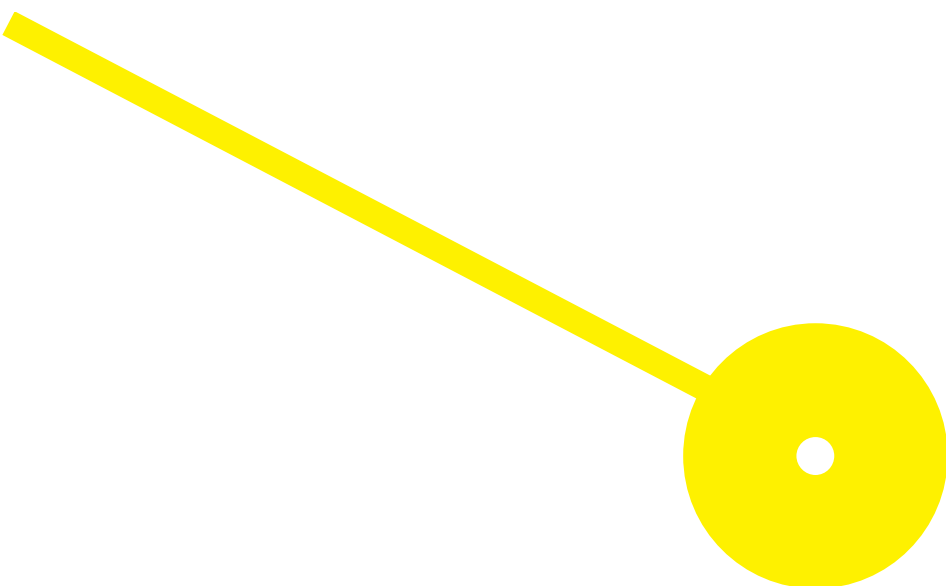




# Doping Genético: De Atleta de Elite a Superatleta

Bárbara Sofia da Cunha Moreira Gomes

10/2021





**ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE**

## **Doping Genético: De Atleta de Elite a Superatleta**

### **Autor**

Bárbara Sofia da Cunha Moreira Gomes

### **Orientadores**

Hugo Daniel Carvalho de Azevedo Rocha, PhD

Técnico Superior de Saúde – Especialista em Genética

Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética – Departamento de Genética Humana

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Regina Augusta Alves Pereira da Silva, PhD

Prof. Coordenadora da Área Técnico-Científica de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica

Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

**Dissertação apresentada(o) para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Técnicas Laboratoriais em Biopatologia – Área de Especialização em Patologia Molecular pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.**

## Agradecimentos

Pratico desporto desde os 11 anos e toda a minha vida girou em torno do voleibol. Em verões de Jogos Olímpicos, o meu mundo parava para eu me sentar à frente da televisão e ver todos aqueles heróis a executar cada movimento na perfeição. Os anos passam e continuo a ter a mesma paixão pelo desporto. O desporto deu-me valores que fazem agora parte de mim, deu-me experiências que me fizeram crescer não só como atleta, mas como pessoa e Mulher e deu-me pessoas que, por mais que tenham saído da minha vida, deixaram as suas marcas na minha essência. E por isso decidi usar o desporto, a minha grande paixão, como tema principal da minha tese de mestrado.

Aos meus pais, por me terem incentivado a perseguir o meu sonho. É graças a eles que continuo a lutar por atingir os meus objetivos.

À minha irmã, por ter estado do meu lado nos dias mais difíceis.

Às mulheres que partilharam o campo e o balneário durante esta época tão atípica e difícil. Sem saberem, foram o meu maior suporte.

Ao professor Hugo, pelo entusiasmo que me transmitia a cada reunião de tese.

Saio uma mulher mais culta e informada depois de escrever esta revisão bibliográfica.

## **Resumo**

O doping é uma realidade que existe desde tempos antigos e prevalece até aos dias de hoje. Com o desenvolvimento da ciência no campo das terapias génicas, surge, em paralelo, a possibilidade de essas terapias serem utilizadas para melhorar a performance dos atletas de elite, tornando-os em superatletas, com o atrativo de ainda não existir um procedimento padronizado e de confiança para detetar a infração

O objetivo desta dissertação é fazer um estado-d'arte da bibliografia relevante sobre o tema desde 2010, de forma a ser uma ferramenta de apoio para estudos práticos posteriores. Assim, os fundamentos teóricos dos métodos de transferência do material genético para o organismo do atleta, das técnicas de edição génica, dos possíveis genes alvo a serem utilizados e dos métodos de deteção podem ser encontrados neste trabalho.

**Palavras-chave:** doping; doping genético; vetores virais; edição génica; genes alvo; PCR; passaporte biológico.

## **Abstract**

Doping is a reality that has existed since ancient times and prevails to this day. With the development of science in the field of gene therapies, there is, in parallel, the possibility of these therapies being used to improve the performance of elite athletes, turning them into super athletes, with the attraction of not yet having a standardized and reliable procedure to detect the infringement.

The main objective of this dissertation is to make a state-of-the-art of the relevant bibliography on the subject since 2010, to be a support tool for further practical studies in this matter. Thus, the theoretical foundations of methods for transferring genetic material to the athlete's body, gene editing techniques, possible target genes to be used and detection methods can be found in this work.

**Keywords:** doping; gene doping; viral vectors; gene editing; target genes; PCR; biological passport.

## Índice

<b>1.</b>	Introdução.....	1
<b>2.</b>	Métodos.....	10
<b>3.</b>	Resultados.....	12
<b>3.1.</b>	Métodos de Transferência.....	14
<b>3.2.</b>	Genes Alvo.....	20
<b>3.2.1.</b>	Genes Envolvidos na Melhoria da Resistência .....	20
	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF).....	22
	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-<math>\delta</math></i> (PPAR- $\delta$ ).....	22
	<i>Angiotensin converting enzyme</i> (ACE).....	23
	<i>Cytosolic phosphoenolpyruvate carboxylase</i> (PEPCK-C) .....	23
<b>3.3.</b>	Genes Envolvidos na Melhoria da Força e Potência Muscular .....	24
	<i>Growth Hormone</i> (GH).....	24
	<i>Insulin growth factor 1</i> (IGF-1).....	25
	Miostatina (MSTN).....	26
	<i>Angiotensin converting enzyme</i> (ACE).....	27
	$\alpha$ -Actinina-3 (ACTN3).....	27
	<i>Adenosine Monophosphate Deaminase 1</i> (AMPD1) .....	28
<b>3.4.</b>	Genes Envolvidos na Recuperação de Lesões, Tolerância à Dor e Motivação .....	28
	<i>Fibroblast growth factor 2</i> (FGF2).....	29
	Colagénio 1 (COL1A1) e Colagénio 5 (COL5A1) .....	30
	<i>Matrix Metalloproteinase-3</i> (MMP3).....	31
	Tenascina C (TNC).....	31
	Endorfinas .....	31
	Encefalinas.....	32
	Serotonina.....	32
	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i> (BDNF).....	33
<b>3.5.</b>	Métodos de Detecção de Doping Genético.....	34
<b>3.5.1.</b>	Métodos de Detecção Diretos.....	35
<b>3.5.2.</b>	Métodos de Detecção Indiretos .....	37
<b>4.</b>	Conclusão.....	38

<b>5. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>40</b>
---	-----------

## 1. Introdução

Doping engloba a ocorrência de uma ou mais violações das regras do código anti-doping, definidas pela *World Anti-Doping Agency* (WADA) (1). Por norma, estas violações são o uso de substâncias ou métodos que permitem aumentar tanto a capacidade física como mental do atleta, dando-lhe vantagem sobre outros atletas (2). Este código anti-doping foi redigido pela primeira vez em 2003, mas a utilização de substâncias para melhorar a performance desportiva existe desde os Jogos da Antiga Grécia (1,3,4). Para ganhar vantagem em relação aos oponentes, inicialmente, os atletas estudavam as melhores dietas para obterem o pico de forma durante as competições (3,4). Estas substâncias potenciadoras baseavam-se em extratos de plantas, como a muscarina presente em alguns cogumelos, folhas de coca, fluídos, tais como sangue e sémen, e órgãos de animais e até mesmo de outros Humanos (3,4). Na Grécia Antiga percebeu-se, indiretamente, os efeitos benéficos da testosterona na melhoria do desempenho desportivo, através da observação dos animais após a castração e, por esta razão, os atletas começaram a ingerir os testículos de animais e de humanos e, muitos séculos mais tarde, explicados pela ciência (4,5). Este tipo de doping esteve presente durante todas as épocas, desde a Grécia e Roma Antigas até à atualidade. Ao mesmo tempo, outras substâncias e métodos foram descobertos e passaram a integrar a lista de substâncias e métodos utilizados como doping. É em 1896 que, em Atenas, reemergiram os Jogos Olímpicos Modernos, fundados por Pierre de Coubertin, que lutou para que não houvesse discriminação no desporto e que todos os atletas procurassem a excelência (6). Com este reaparecimento, o desporto voltou a ganhar popularidade e, com este crescimento, a utilização de certas substâncias também reapareceu para dar vantagem aos atletas que as consomem (3,7). No fim do século XIX, a cafeína e o álcool faziam parte das substâncias mais utilizadas pelos atletas. Alguns deles tinham as suas próprias receitas de doping, onde misturavam diferentes estimulantes, como brandy e cocaína. Outros atletas melhoraram os métodos utilizados na Antiga Grécia, seguindo um programa de injeções de sangue das próprias veias testiculares, seguidas de sémen e, por último, líquido proveniente de testículos de cães (4). É apenas no século XX que aparecem os primeiros casos de doping com esteróides anabólicos e testosterona, sendo possível observar fisiculturistas com músculos largos e deformados, consequência da utilização dessas substâncias. Durante o século XX, as anfetaminas começaram a fazer parte da rotina dos atletas, principalmente dos ciclistas e, nas décadas de 60 e 70, todos os ciclistas consumiam esse estimulante. Na década seguinte, as substâncias preferenciais eram os esteróides anabólicos e a cortisona e todos os atletas tinham uma "dieta de drogas" muito extensa (4). Para além disso, vários atletas tiveram efeitos adversos como consequência do abuso destas substâncias, o que levou à criação de organizações com o intuito de erradicar a utilização das mesmas, através de listas de substâncias proibidas e de programas anti-doping (3,4). Faziam parte das primeiras listas substâncias como os agentes anabólicos, hormonas, diuréticos, estimulantes e narcóticos e métodos como as transfusões de

sangue (4). Em 1967, o primeiro teste de controlo de atletas foi realizado pelo Comité Olímpico Internacional, após o decorrer das competições (3). Em 1989, foram implementados testes de controlo de doping fora do período competitivo, depois de ter havido evidência de que muitos dos atletas planeavam a toma destas substâncias de forma a não serem detetadas nos testes feitos durante as competições (3). A primeira Conferência Mundial sobre Doping no Desporto foi realizada na década seguinte, depois da *Tour de France* de 1998, onde foi descoberto que vários ciclistas utilizavam substâncias proibidas (3). Nessa Conferência, decorrida na Suíça, foi redigida a Declaração de Lausanne, que culminou na fundação de uma organização independente, a *World Anti-Doping Agency*, responsável por monitorizar os três ideais fundamentais do Código Anti-Doping: aceitação, implementação e conformidade (1,3).

O Código Anti-Doping é o documento universal pelo qual é regido o Programa Anti-Doping e tem como objetivo proporcionar a todos os atletas a participação num ambiente desportivo livre de substâncias e métodos ilícitos, promovendo a saúde, a igualdade e a justiça entre todos os atletas (1). Este Código foi redigido primeiramente em 2003, mas foi a partir de 2004 que entrou em vigor. Desde essa data, foi revisto e corrigido quatro vezes, tendo sido revisto a última vez no período de novembro de 2019 a junho de 2020 e adotado a partir de 1 de janeiro de 2021 (1,8).

Desde a criação da WADA e do Código Anti-Doping, no início do século XXI, as várias organizações desportivas e federações têm, em conjunto, lutado para diminuir a incidência e prevalência da utilização de doping no meio desportivo. No entanto, é difícil definir com certeza a percentagem de atletas que utilizam intencionalmente as substâncias proibidas, estimando-se que ronde os 14% a 57% (9). Estas estimativas são feitas a partir de testes-padrão que, embora anónimos, não são precisos, pela falta de respostas com veracidade e objetividade e, também, pela falta de conhecimento acerca do doping por parte dos participantes (9). Por outro lado, a percentagem de atletas que testam positivo nos controlos anti-doping tem-se mantido baixa (cerca de 2%), devido à janela de deteção baixa no que diz respeito a substâncias proibidas específicas, à capacidade analítica dos laboratórios acreditados pela WADA e também pela incapacidade de distinguir a utilização dessas substâncias com o cariz de doping ou médico (9). Para diminuir a prevalência do doping no desporto, é necessário entender que os números são diferentes dependendo da modalidade desportiva e que o aumento dos controlos anti-doping pode não influenciar o aumento de casos detetados nem a diminuição do número de atletas que consomem as substâncias consideradas doping (9,10). Isto significa que efetivamente existem diferenças na utilização de doping entre desportos coletivos e individuais, sendo mais prevalente em desportos individuais, como o ciclismo e boxe (9,10). Por outro lado, o aumento da frequência dos controlos anti-doping não vai diminuir a percentagem de atletas que utiliza estas substâncias, uma vez que a grande maioria dos atletas tem poucos conhecimentos relativamente ao doping e aos problemas de saúde que podem vir a desenvolver ao utilizar essas substâncias promotoras da performance (10). Apesar da WADA e das organizações nacionais anti-doping terem alguns planos educativos, segundo Morente-Sánchez e Mikel

Zabala, “para diminuir o fenômeno de doping, programas de prevenção e de informação, iniciados com atletas em idade jovem e envolvendo outros participantes (por exemplo, os médicos dos atletas, os treinadores ou a família), são necessários para estabelecer e manter atitudes e comportamentos corretos” (10).

O doping é a utilização de substâncias ou métodos que permite melhorar as capacidades físicas e mentais do atleta, isto é, que podem atuar de forma a melhorar a resistência e a força e potência muscular, a acelerar o processo de recuperação de lesões, a aumentar a tolerância à dor e permitir que o atleta atinja um estado de bem-estar psicológico que o permita manter-se motivado (7,11). Atualmente, a lista de substâncias e métodos proibidos está dividida em três categorias: substâncias e métodos proibidos durante e fora da competição, substâncias e métodos proibidos durante a competição e substâncias e métodos proibidos em desportos específicos (tabelas 1, 2 e 3) (12,13). Algumas das substâncias mais utilizadas como doping pertencem ao grupo dos agentes anabólicos, tais como os esteróides anabólicos androgénicos, de onde faz parte a hormona testosterona (1,14). Este grupo de substâncias permite o aumento da massa muscular, estando este aumento diretamente relacionado com a dose de substância consumida. Normalmente, não são substâncias utilizadas sozinhas, mas sim combinadas com outros grupos de drogas, como, por exemplo, medicamentos diuréticos, para acelerar o processo de perda de gordura e de água (14). Outro agente anabólico muito utilizado é a hormona do crescimento, que pode ser combinada com a utilização de esteróides anabólicos. Esta substância beneficia a função e o ganho de massa muscular pelo estímulo da síntese proteica e conservação das proteínas durante a atividade física em jovens indivíduos. Contudo, estes efeitos não são tão vinculados em atletas de alta competição, que têm o estímulo do exercício físico diariamente, uma vez que a hormona do crescimento têm uma maior influência na produção de colagénio e não nas proteínas miofibrilares, presentes nas fibras musculares esqueléticas (14). Outros exemplos de agentes dopantes são a insulina e o fator de crescimento semelhante ao *insulin growth factor 1* (IGF-1), a eritropoietina (EPO) e os agentes beta-adrenérgicos, e são utilizados com diferentes finalidades. A insulina e o IGF-1 estimulam o anabolismo muscular e aumentam a disponibilidade de glucose para os músculos durante a prática desportiva. A EPO permite o aumento da capacidade de transporte de oxigénio do sangue para os músculos, levando, conseqüentemente, ao aumento da capacidade de resistência do atleta. Por fim, os agentes beta-adrenérgicos são utilizados pela sua capacidade broncodilatadora, anabólica e anti-inflamatório, bem como por aliviar a ansiedade (14).

Desde que a WADA foi fundada até a atualidade, houve vários progressos na medicina, nomeadamente na área da terapia génica, sendo definida pela transferência de material genético, como DNA ou RNA, ou células geneticamente modificadas, para o organismo humano, com o objetivo de tratar e/ou prevenir doenças, uma vez que esse material genético vai promover a síntese endógena de proteínas deficitárias (3,11,31–33). Apesar de terem sido feitos muitos avanços nesta área e de já existirem vários fármacos aprovados para uso terapêutico humano, ainda existem algumas limitações e riscos que têm de

ser ultrapassados antes da terapia génica poder ser utilizada de forma mais abrangente no tratamento de várias doenças. A grande maioria dos fármacos aprovados pela FDA estão relacionados com as células progenitoras hematopoiéticas derivadas do sangue do cordão umbilical, como é o caso dos produtos ALLOCORD, CLEVECORD e DUCORD, utilizados em pacientes com patologias do sistema hematopoiético, sejam estes herdados, adquiridos ou resultantes de tratamentos mieloablativos(34–37). Estes três fármacos são usados em terapias alogénicas de células progenitoras hematopoiéticas de sangue do cordão umbilical geneticamente modificadas para expressar o marcador celular de superfície CD34. Estes fármacos são indicados para uso em procedimentos de transplante de células progenitoras hematopoiéticas de dadores não relacionados, em conjunto com um regime apropriado preparativo apropriado para a reconstituição hematopoiética e imunológica destes pacientes. A utilização destas terapias pode acarretar alguns riscos, como reações de hipersensibilidade, reações de infusão, síndrome e falência do enxerto, malignidades com origem no dador e transmissão de infeções e de doenças genéticas raras, e pode originar reações adversas, como hipertensão, vômitos, náusea, bradicardia e febre. Em casos piores, pode levar à morte (38–40). Outros fármacos existentes são o IMLYGIC, que são vírus *herpes simplex* atenuados e modificados geneticamente e cujo objetivo é o tratamento local de lesões irrissecáveis em pacientes com melanoma após cirurgia inicial, o KYMRIAH, que está direcionado para o tratamento de pacientes até aos 25 anos com recaídas de leucemia linfoblástica aguda precursora de células B ou pacientes adultos com recaídas de linfomas de células B grandes, linfomas de células B de alto grau e linfomas de células B grandes derivados de linfomas foliculares, e utiliza células T autólogas modificadas através de um vetor lentiviral que codifica o recetor de antígeno quimérico anti-CD19, o LUXTURNA, que visa o tratamento de pacientes diagnosticados com distrofia retinal associada a mutação bialélica no gene *RPE65* através de vírus adeno-associados que fazem a transferência do gene alvo para o hospedeiro, o MACI, que são condrócitos autólogos cultivados numa membrana de colagénio suíno, utilizados para o tratamento de defeitos cartilagosos do joelho em adultos, e o ZOLGENSMA, adequado para o tratamento de crianças com menos de dois anos com atrofia muscular espinhal resultante de mutações bialélicas no gene *SMN1* e que segue o mesmo princípio do LUXTURNA (41–50).

**Tabela 1** Substâncias e métodos proibidos pela WADA durante e fora da competição. Na coluna da função, o ponto 1 refere-se às funções que os medicamentos podem ter na prática clínica; o ponto 2 é referente à função de melhoria da performance desportiva.

CATEGORIA	SUBSTÂNCIAS	FUNÇÃO	EXCEÇÕES DE UTILIZAÇÃO	RISCOS ASSOCIADOS	ANO DE ENTRADA NA LISTA	REFERÊNCIAS
S0	Substâncias Aprovadas	Não	Qualquer substância utilizada sem aprovação médica para uso terapêutico humano.		2011	(12,13)
S1	Agentes Anabólicos	1. Tratamento de doenças como hipogonadismo masculino e osteoporose. 2. Aumento da massa magra e força muscular.	-	Nos homens, complicações cardiovasculares, disfunção sexual, ginecomastia; Nas mulheres, diminuição da glândula mamária, crescimento do clitóris.	1975	(12,13,15-18)
S2	Hormonas peptídicas, fatores de crescimento, miméticos (EPO, GH, FGFs, IGF-1, etc.)	1. Tratamento de doenças como anemia, hipogonadismo masculino e deficiência de hormona do crescimento; 2. Aumento de oxigénio no sangue; diminuição do tempo de recuperação.	-	Retenção de fluídos; aumento da viscosidade do sangue.	Década de 90.	(12,13,18)
S3	Agonistas $\beta_2$	1. Tratamento de doenças respiratórias, como asma e DPOC. 2. Renovação dos músculos esqueléticos, causa hipertrofia muscular e inibe a sua atrofia, dilatação das vias aéreas.	Inalação de salbutamol, formoterol, salmeterol e vilanterol para efeitos terapêuticos, com doses máximas definidas.	Taquicardia, arritmia ventricular e supraventricular, isquemia do miocárdio.	Década de 90.	(12,18-20)
S4	Moduladores Hormonais e Metabólicos (p.e.: inibidores de aromatase, substâncias anti-estrogénicas, insulina)	1. Dependendo do tipo de modulador, podem ser utilizados para tratar cancro da mama, diabetes e infertilidade feminina, p.e.	A insulina pode ser utilizada com uma isenção de uso terapêutico.	No caso da insulina, pode levar a hipoglicemia.	Tem sofrido atualizações regularmente.	(12-14,21,22)

CATEGORIA	SUBSTÂNCIAS	FUNÇÃO	EXCEÇÕES DE UTILIZAÇÃO	RISCOS ASSOCIADOS	ANO DE ENTRADA NA LISTA	REFERÊNCIAS
		2. Especificação das fibras tipo I para diminuir a fadiga, biogénese mitocondrial, aumento da sensibilidade à insulina.				
S5	Diuréticos e Agentes Mascarantes	1. Tratamento de hipertensão, edema agudo e crónico, insuficiência cardíaca e renal. 2. Redução rápida do peso e aceleração da excreção de outros materiais dopantes do organismo.	-	Hiponatremia, distúrbios do metabolismo de cálcio e de sódio, resistência à insulina.	1988	(12,13,23)
M1	Manipulação de Sangue e seus componentes	Aumento do transporte de oxigénio para os músculos através de dopagem sanguínea autóloga ou homóloga, de utilização de produtos heterólogos ou de programas sequenciais de extração, manipulação e reinfusão do sangue no corpo do atleta.	Oxigenoterapia.	Transmissão de doenças infecciosas, anafilaxia, flebite, septicémia, GvHD, embolia, problemas de armazenamento do sangue.	1985	(12,13,22,24)
M2	Manipulação Química e Física	1. Adulteração das amostras recolhidas para mascarar a utilização de doping. 2. Infusões de fluídos intravenosos com o objetivo de diluir as concentrações de agentes dopantes no sangue.	Infusões feitas em contextos de hospitalização ou investigação clínica.	-	-	(12,13,22)
M3	Doping Genético e Celular	1. Transferência de ácidos nucleicos ou análogos para alterar o genoma ou a expressão génica. 2. Transferência de células normais ou geneticamente modificadas.	-	Resposta imune exacerbada, risco de oncogénese aumentado. Outros riscos estão associados à sequência génica utilizada.	2004	(12,13,22,25)

**Tabela 2** Substâncias e métodos proibidos pela WADA durante a competição. Na coluna da função, o ponto 1 refere-se às funções que os medicamentos podem ter na prática clínica; o ponto 2 é referente à função de melhoria da performance desportiva.

CATEGORIAS	SUBSTÂNCIAS	FUNÇÃO	EXCEÇÕES DE UTILIZAÇÃO	RISCOS ASSOCIADOS	ANO DE ENTRADA NA LISTA	REFERÊNCIAS
S6	Estimulantes (p.e. cafeína, cocaína e anfetaminas)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tratamento de narcolepsia, déficit de atenção ou supressão do apetite.</li> <li>2. Sentido de alerta aumentado, diminuição da fadiga e ativação cardiovascular.</li> </ol>	Clonidina, se prescrito para pessoas hipertensas; derivados do imidazole para uso dermatológico, nasal ou oftálmico.	Complicações cardíacas que podem culminar em morte súbita.	1967	(12,13,26)
S7	Narcóticos (p.e. heroína, morfina, petidina)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Fortes analgésicos utilizados em tratamentos pós-cirúrgicos.</li> <li>2. Diminuição da dor para aguentar mais esforços físicos.</li> </ol>	-	Causa vício.	-	(12,13,22)
S8	Canabinóides (p.e. tetra-hidrocanabinol)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Atenuação dos processos inflamatórios que advêm da prática desportiva, havendo diminuição das dores musculares;</li> <li>2. Diminuição da ansiedade pré-competição e melhoria da qualidade de sono.</li> </ol>	Canabidiol.	Psicose.	-	(12,27,28)
S9	Glucocorticóides (p.e. cortisona)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Diminuição da respostas imunes e inflamatórias, pela sua ação anti-inflamatória e imunossupressora.</li> <li>2. Melhoria do desempenho em exercícios de intensidade submáxima por curtos períodos de tempo.</li> </ol>	-	Insuficiência adrenal, imunodeficiência, osteoporose, perda de massa muscular, desequilíbrios metabólicos.	-	(12,29)

**Tabela 3** Substâncias e métodos proibidos pela WADA em desportos específicos. Na coluna da função, o ponto 1 refere-se às funções que os medicamentos podem ter na prática clínica; o ponto 2 é referente à função de melhoria da performance desportiva.

CATEGORIAS	SUBSTÂNCIAS	FUNÇÃO	EXCEÇÕES DE UTILIZAÇÃO	DESPORTOS COM PROIBIÇÃO DURANTE A COMPETIÇÃO	DESPORTOS COM PROIBIÇÃO DURANTE E FORA DA COMPETIÇÃO	REFERÊNCIAS
P1	Bloqueadores-β	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tratamento de taquiarritmias supraventriculares e arritmias ventriculares.</li> <li>2. Diminuição de sintomas de stress (tremores) antes das competições.</li> </ol>	-	Automobilismo, bilhar, dardos, golfe, esqui e snowboard, desportos subaquáticos.	Tiro com arco, tiro.	(12,30)

Mesmo havendo alguns riscos na utilização destes fármacos, estes não são um problema para atletas que querem vencer provas independentemente das consequências, visto que preferem correr esses riscos para melhorar a sua performance e aumentar a probabilidade de sucesso desportivo (3,51,52).

Com a possibilidade de se utilizar a terapia génica no desporto como doping genético, em março de 2002, a WADA organizou uma reunião com representantes das comunidades científica e desportiva para discutir o aparecimento do doping genético e definir formas de antecipar a utilização desses métodos pelos atletas. Dois anos depois, em 2004, a WADA incluiu o doping genético na lista de substâncias proibidas, na secção *M3 Gene Doping* (31–33,51,53,54). Inicialmente, a WADA definiu doping genético como o “uso não terapêutico de genes, elementos genéticos e/ou células com capacidade de melhorar a performance desportiva(53). Esta definição sofreu diversas alterações ao longo dos anos e, atualmente, a secção *M3 Gene Doping* é definida por:

“Os seguintes, com o potencial de melhorar a performance desportiva, são proibidos:

1. O uso de ácidos nucleicos ou análogos de ácidos nucleicos que possam alterar sequências do genoma e/ou alterar a expressão génica por qualquer mecanismo. Isto inclui, mas não está limitado a, edição génica, silenciamento génico e tecnologias de transferência génica.
2. O uso de células normais ou geneticamente modificadas.” (1,55).

As alterações feitas desde 2004 no código anti-doping têm o intuito de enfatizar o propósito da utilização destas substâncias como potenciadoras da performance e definir que doping genético contempla, também, a transferência de ácidos nucleicos, estes que não estavam previstos na primeira versão do código (53).

Doping genético é, então, a introdução no corpo humano de um transgene ou sequência nucleotídica com o objetivo de permitir a expressão de proteínas deficientes ou ausentes ou modelar a expressão de proteínas funcionais existentes, com o objetivo do atleta adquirir vantagem sobre os seus pares (3,7,11,31,52,54). Na grande maioria dos casos, essa proteína expressa será semelhante à produzida normalmente pelo organismo, sendo este um ponto crucial para a preferência de doping genético em detrimento dos métodos de doping tradicional, uma vez que esta semelhança entre os dois tipos de proteínas dificulta a deteção destas novas metodologias de doping (11,25). Para ocorrer esta transferência génica, o material genético pode estar encapsulado em vírus modificados e não patogénicos ou, por exemplo, em partículas lipídicas, para conseguir ultrapassar a membrana celular (3,31,54).

Até à data, não há evidência de utilização de doping genético por parte de atletas de alta competição. Esta falta de evidência pode dever-se a dois motivos. O primeiro motivo reside no facto de ainda nenhum atleta ter efetivamente usufruído de doping genético e o segundo porque não existem testes que consigam detetar a presença de proteínas recombinantes derivadas de técnicas de terapia génica ou o material genético transferido. Contudo, a primeira ameaça de utilização de doping genético

surgiu com a possibilidade de uso do *Repoxygen* para melhorar a resistência dos atletas em desportos de resistência (56). Este medicamento, fabricado pela *Oxford BioMedical* para tratar doenças como anemia, consistia num vetor viral adeno-associado que continha o gene da eritropoietina. O resultado esperado seria a produção endógena aumentada desta proteína pelo músculo onde seria feita a administração, por injeção, permitindo, assim, um maior aporte de oxigénio a esse músculo, com a particularidade de o próprio medicamento ter a capacidade de ativar e inativar a produção de eritropoietina consoante os níveis de oxigénio no sangue estarem diminuídos ou aumentados, respetivamente (31,32,51–53,56,57). Contudo, este medicamento não chegou à fase dos ensaios clínicos (53). Apesar da WADA considerar a possibilidade de utilização de doping genético desde o início do século XXI, ainda não foi definido um método de deteção viável, isto é, que seja específico, sensível e o menos invasivo possível. Esta situação coloca-se pelo facto do doping genético se basear na terapia génica, isto é, as proteínas produzidas são homólogas às proteínas naturais do organismo, e também porque a injeção do material genético é, muitas vezes, feita de forma intramuscular, tornado a deteção por amostras de sangue e urina difícil. A única forma de detetar seria através de biópsias musculares, o que é impraticável e proibido pela WADA, e, mesmo assim, não há garantias de deteção dos vetores de transferência nessas amostras (3,7,11,31,32,51,52). No entanto, para contornar estas limitações, López et al. diz que “a utilização de estratégias independentes deixa muitas possibilidades por considerar” e, portanto, “a integração de estratégias utilizando várias tecnologias devia ser considerada”, tais como estratégias baseadas na combinação de métodos como NGS e vários tipos de PCR, tais como o *Multiplex PCR*, que permite amplificar várias sequências de DNA em simultâneo, e o dPCR, a terceira geração de PCR, que ultrapassa problemas como a reduzida quantidade de material genético alvo e os inibidores de PCR, permitindo a absoluta quantificação da amostra alvo (57).

O objetivo desta dissertação é fazer um estado d-arte do doping genético na atualidade, compilando os métodos de transferência e de deteção possíveis e, também, os genes determinantes na melhoria da performance desportiva e os riscos de saúde que podem advir da sua utilização.

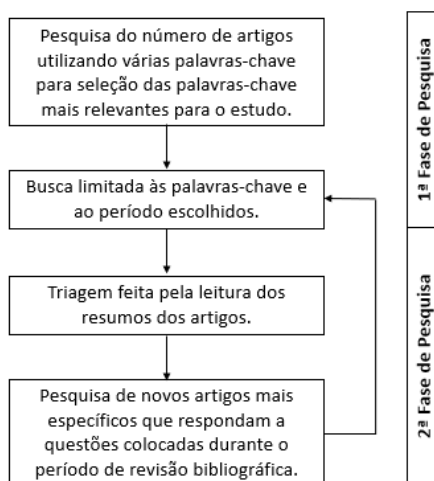
## **2. Métodos**

Esta dissertação é um estado d-arte sobre doping genético, tendo a recolha de informação baseando-se em artigos científicos originais e de revisão, publicados em revistas científicas indexadas, jornais científicos e teses publicadas entre 2010 e 2021. Entre estas publicações, podem ser encontrados artigos de revisão sobre doping genético e também artigos originais e de revisão sobre métodos de transferência de material genético, genes envolvidos na performance desportiva e que podem ser utilizados como doping genético, problemas de saúde relacionados com a utilização de doping genético e métodos de deteção de doping genético.

A pesquisa de artigos para o estudo foi feita através das plataformas digitais PubMed (*US National Library of Medicine*) e da Mendeley Search, utilizando, inicialmente, as palavras-chave “*gene doping*”, “*genetic doping*”, “*gene doping in sports*”, “*gene therapy as doping*”, “*gene doping and performance*”, “*improved performance by gene doping*” e “*genes for sports performance enhancement*”. Através do número de artigos existentes para cada palavra-chave, foram escolhidas as palavras-chave com maior relevância e direcionadas para o estudo, sendo elas “*gene doping in sports*”, “*gene therapy as doping*” e “*gene doping and performance*”. De seguida, foi feita uma segunda pesquisa com estas palavras-chave, com o objetivo de definir se o estudo seria pertinente na atualidade. Esta pesquisa baseou-se no número de artigos publicados em cada ano utilizando as palavras-chave escolhidas.

Após este estudo e limitando a busca às palavras-chave e ao período de tempo escolhidos, foram selecionados os artigos com resumos relacionados com os objetivos do presente trabalho. Esta triagem teve o objetivo de eliminar artigos que não respondiam a nenhuma questão de doping genético, isto é, que não eram artigos de revisão sobre doping genético, ou artigos de revisão ou originais que não falavam sobre os genes envolvidos na performance desportiva, métodos de transferência ou de detecção desses genes.

Por fim, alguns artigos foram pesquisados durante o período de revisão e redação bibliográfica. Esses artigos foram pesquisados utilizando palavras-chave mais específicas para o tópico em estudo, como “*gene transfer methods and gene doping*”, “*genetics and genomics in sports*” e “*gene doping detection methods*”, tendo como método de triagem o mesmo utilizado anteriormente (figura 1).



**Figura 1** Fluxo de pesquisa de publicações nos motores de busca.

### 3. Resultados

Numa fase inicial, foi feita uma pesquisa com várias palavras-chave com o objetivo de determinar qual o conjunto de palavras mais relevante para o estudo. As palavras-chave teriam de abranger tanto artigos de revisão sobre doping genético, mas também artigos mais específicos e direcionados para um determinado tema subjacente ao tema central de doping genético. Assim sendo, após a busca inicial na plataforma online PubMed, foram obtidos os resultados do gráfico 1. Pelo número de publicações para cada busca, foram definidas como palavras-chave relevantes para o estudo as seguintes: “*Gene Doping in Sports*”, “*Gene Therapy as Doping*” e “*Gene Doping and Performance*”.

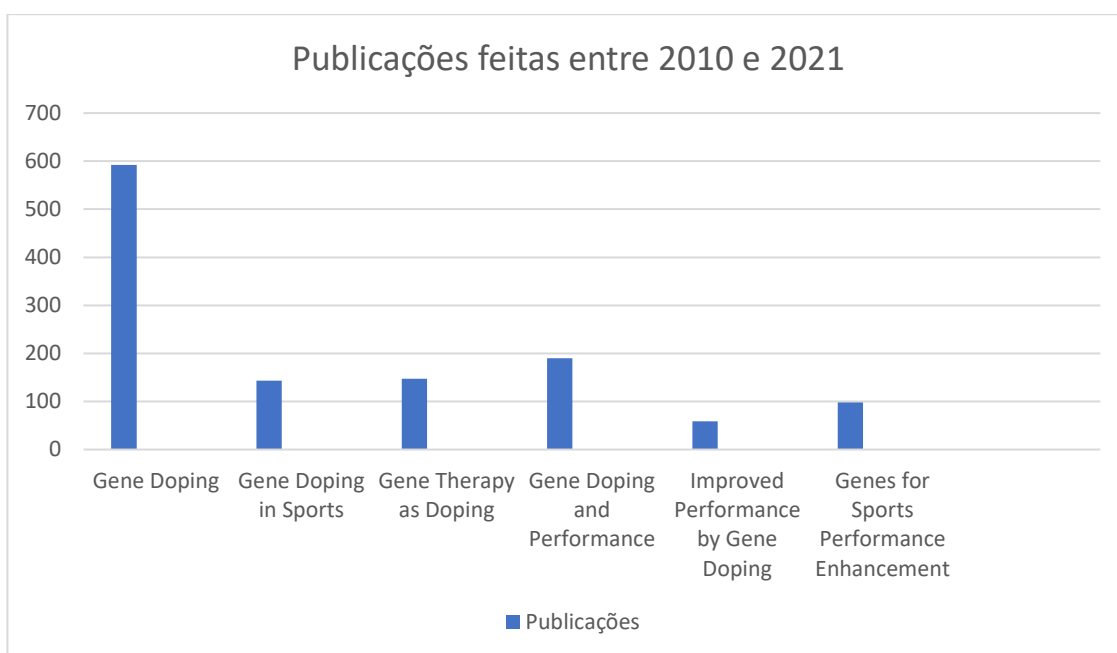
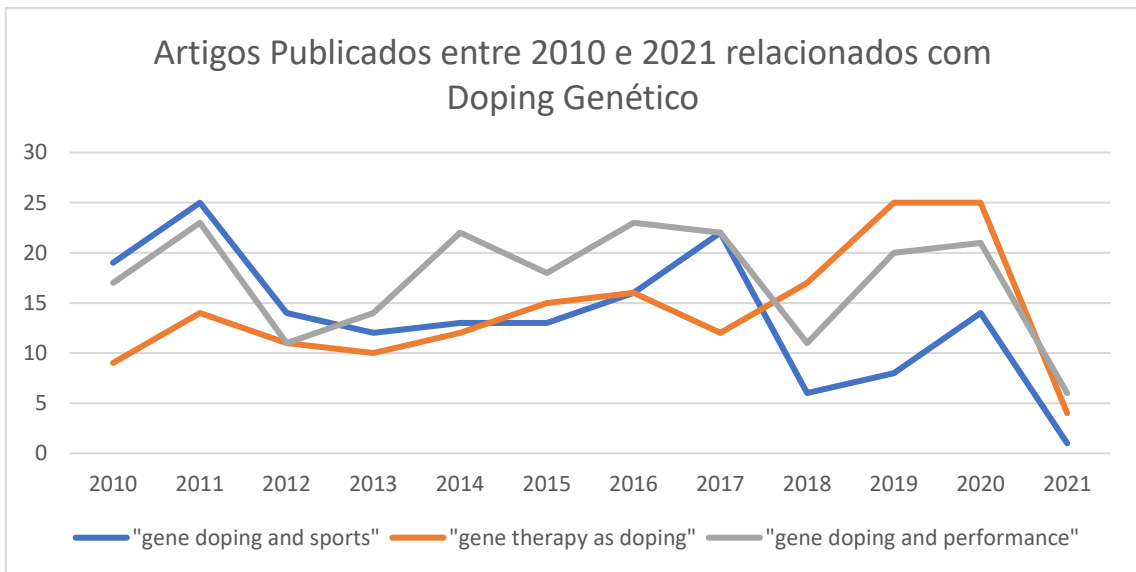


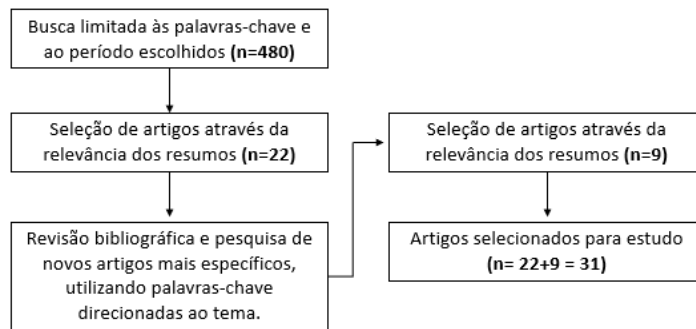
Gráfico 1 Publicações encontradas entre 2010 e 2021 para as palavras-chave pesquisadas.

A segunda pesquisa foi realizada para se definir se o estudo sobre doping genético seria pertinente, verificando-se que sim, uma vez que todos os anos são publicados vários artigos sobre o tema (gráfico 2).

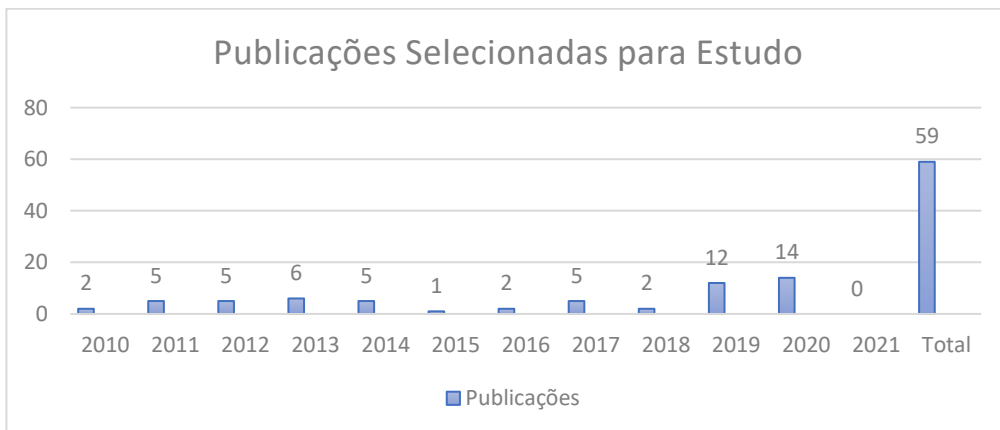
Por fim, foram selecionados os artigos para estudo com base no título e, posteriormente, pelo conteúdo do resumo dos primeiros artigos selecionados. Durante o período de revisão da literatura escolhida, utilizando as novas palavras-chave, procedeu-se a uma nova pesquisa e escolha de artigos relevantes para o estudo. O fluxo de pesquisa, bem como o número de artigos selecionados, está descrito na figura 2. No gráfico 3, observa-se o número de artigos escolhidos para estudo por cada ano, dentro do período escolhido.



**Gráfico 2** Artigos encontrados entre 2010 e fevereiro de 2021 com as palavras-chave definidas.



**Figura 2** Esquema representativo do fluxo de pesquisa juntamente com o número de artigos selecionado em cada etapa.



**Gráfico 3** Número de publicações selecionadas para estudo por ano de publicação.

### 3.1. Métodos de Transferência

O doping genético tem, como fundamento, as técnicas de terapia gênica. Desta forma, os métodos de transferência utilizados no doping serão semelhantes aos métodos já empregues na terapia gênica. A entrega do material genético no organismo pode ser feita de diversas formas, estando esses métodos divididos em métodos de transferência direta ou *in vivo* e métodos de transferência *ex vivo*, através de células que, normalmente, são células estaminais derivadas do paciente ou, neste caso, do atleta (7,52,53,58). Os métodos de entrega *in vivo* baseiam-se na entrega de material genético diretamente no organismo, isto é, na corrente sanguínea, no tecido ou no órgão alvo (7). Para este processo ocorrer, é necessário que o transgene alvo seja inserido num vetor de entrega e que este vetor seja injetado no corpo do paciente (58). Por outro lado, nos métodos de entrega *ex vivo*, é necessária uma colheita de células do paciente para serem modificadas geneticamente, através da inserção do transgene de interesse, utilizando também um vetor de entrega (7,51,53,58). Após o crescimento destas células modificadas *in vitro*, são selecionadas as células viáveis para serem introduzidas no organismo do paciente (7,51).

Os vetores de entrega são cruciais para o sucesso da transferência do gene de interesse independentemente do método de entrega utilizado e é necessário que estes vetores satisfaçam alguns requisitos. Um vetor de entrega precisa de ser eficiente na entrega do gene de interesse sem ser reconhecido pelo sistema imune do hospedeiro, isto é, não pode induzir respostas imunes ou iniciar processos inflamatórios. Deve aumentar as funções normais pretendidas, corrigir deficiências ou inibir atividades patogénicas, e deve permitir a expressão do gene durante um longo período de tempo (59).

Os vetores podem ser divididos em vetores não virais e vetores virais. Os vetores não virais podem ser lipossomas, plasmídeos, vesículas lipídicas, moléculas de DNA simples e complexos de DNA e proteínas. Estes vetores apresentam uma menor citotoxicidade, a sua preparação é mais fácil e barata e a probabilidade de contaminação é menor do que noutros métodos, mas a sua eficiência é reduzida, uma vez que a sua duração é menor e os efeitos são apenas no local da injeção (7,32). Os vetores não virais podem ser, ainda, divididos consoante o seu sistema de entrega, isto é, se são métodos químicos e utilizam transportadores químicos que neutralizam a carga negativa dos seus ácidos nucleicos (Tabela 4), ou físicos que causam dano local e reversível da membrana celular para permitir a entrada do material genético na célula (Tabela 5) (7).

**Tabela 4** Métodos de entrega químicos utilizados na transferência de material genético.

MÉTODO	CARACTERÍSTICAS	VANTAGENS	DESVANTAGENS	REFERÊNCIAS
LÍPIDOS CATIÓNICOS (LIPOSSOMAS)	Ácidos nucleicos incorporados em lipídios.	Método seguro e com baixa citotoxicidade.	Eficiência baixa a média, imunogénico, dispendioso.	(52,60)
POLÍMEROS CATIÓNICOS	Ácidos nucleicos combinados com policatiões.	Elevada eficiência <i>in vitro</i> , fácil de manipular, pouco dispendioso.	Citotoxicidade dependente de dose elevada, ativação do complemento, baixa eficiência <i>in vivo</i> .	(52,60)
COMBINAÇÃO DE COMPLEXOS LIPÍDICOS E POLIMÉRICOS	Vetor com núcleo de policatiões e DNA, envolto por lipídios.	Elevada eficiência <i>in vitro</i> , fácil de manipular.	Eficiência baixa a média, imunogénico, dispendioso.	(60)
MATERIAIS TRANSPORTADORES (NANOPARTÍCULAS, NANOEMULSÕES, MICROBOLHAS, MATERIAIS BIOLÓGICOS)	Ácidos nucleicos ou vetores não virais ligados a estes materiais por ligações covalentes ou não covalentes.	Propriedades do material utilizado.	Baixa eficiência	(60)

**Tabela 5** Métodos de entrega químicos utilizados na transferência de material genético.

MÉTODO	CARACTERÍSTICAS	PRÓS	CONTRAS	REFERÊNCIAS
INJEÇÃO POR AGULHA DE DNA/RNA SIMPLES		Método seguro e fácil.	Eficiência de transfeção baixa.	(60)
GENE GUN	Injeção de partículas de ouro revestidas de DNA através da membrana celular.	Baixa citotoxicidade, entrega direta de genes no citoplasma e no núcleo.	Baixa eficiência, penetração superficial nos tecidos.	(52,60)
INJEÇÃO DE JATO	Injeção potente de soluções com DNA simples nos tecidos.	Sem utilização de agulha, fácil de controlar, seguro.	Dano dos tecidos, eficiência moderada.	(52,60)
ELETROPORAÇÃO	Aplicação de campos elétricos para aumentar a permeabilidade da membrana celular e facilitar a absorção dos transgenes.	Altamente efetivo, boa eficiência, transferência de DNA de maior tamanho.	Acessibilidade de elétrodos, procedimento cirúrgico necessário, dano dos tecidos.	(7,52,60)

MÉTODO	CARACTERÍSTICAS	PRÓS	CONTRAS	REFERÊNCIAS
ULTRASSOM	Aumento da permeabilidade da membrana celular.	Não invasivo, eficiente e seguro.	Baixa eficiência.	(52,60)
MAGNETOFEÇÃO		Não invasivo, elevada precisão, baixa citotoxicidade.	Transfeção transiente.	(60)

Os vetores virais são transportadores eficientes com inúmeras vantagens, como a grande capacidade de armazenamento de transgenes, o tropismo para um tipo celular específico e a expressão prolongada do gene, uma vez que alguns destes vetores podem integrar o genoma do hospedeiro, fazendo parte do mesmo, e sendo transmitidos às células-filhas, aquando da divisão celular(7,32,52,58). Estes vetores são derivados de vários tipos virais, que foram modificados geneticamente para não se replicarem, o que os torna menos imunogénicos(51,52). Para ocorrer a transferência do gene de interesse, o vetor viral deve ser introduzido no organismo, onde estes entram nas células e libertam o gene, este que vai ser expresso pela utilização da maquinaria bioquímica celular(3,52). Vetores virais derivados de retrovírus integram o seu material genético nos cromossomas da célula humana, enquanto vetores virais derivados de adenovírus apenas introduzem o gene no núcleo sem ocorrer a integração do mesmo num cromossoma (tabela 6) (3,52,53,58,61). Contudo, a recombinação endógena viral pode acontecer, aumentando o risco de mutagénese de inserção, pela potencial interrupção de genes essenciais para a sobrevivência da célula (61). Para além desta consequência, os vetores virais podem ser reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro, resultando numa resposta imune exacerbada, o que, por si só, diminui a eficiência deste vetor e, consequentemente, a eficiência da transferência do transgene para o organismo(7,32,59).

A transferência de material genético, apresenta desafios que devem ser ultrapassados para que ocorra o sucesso da mesma. Consequentemente, estes desafios estarão presentes quando se fala de doping genético, uma vez que este método de doping é baseado na terapia génica. Um dos principais desafios será a durabilidade da expressão génica. Ao utilizar doping genético, existe uma forte possibilidade de o atleta querer que a expressão génica seja de longa duração. Este efeito pode ser alcançado por várias tomas de doping genético ou integração do gene num cromossoma, permitindo uma ativação mais prolongada do gene introduzido no organismo (7,52). Neste último caso, um dos efeitos secundários que podem ocorrer é a mutagénese de inserção, com a possibilidade de desenvolvimento de várias patologias, como por exemplo o cancro, devido à desregulação ou ativação de oncogenes, resultante da falta de controlo da zona onde o gene é inserido (7,32,52).

**Tabela 6** Propriedades dos vetores virais utilizados na terapia gênica e, conseqüentemente, no doping genético.

	<b>ADENOVÍRUS</b>	<b>VÍRUS ADENO- ASSOCIADOS</b>	<b>RETROVÍRUS</b>	<b>LENTIVÍRUS</b>	<b>HERPES VÍRUS</b>	<b>PLASMÍDEO</b>
<b>ÁCIDOS NUCLEICOS</b>	DNA	DNA	RNA	RNA	DNA	DNA
<b>CAPACIDADE</b>	Elevada	Pequena	Pequena	Elevada	Elevada	Ilimitada
<b>INTEGRAÇÃO NO GENOMA</b>	Não	Muito raro	Sim	Sim	Sim	Não
<b>DURAÇÃO DA EXPRESSÃO</b>	Transiente	Longa em células quiescentes	Longa	Longa	Transiente	Transiente
<b>EFEITOS ADVERSOS</b>	Resposta inflamatória, se em altas doses	Resposta inflamatória suave	Mutagênese e resposta inflamatória	Mutagênese	Resposta inflamatória	Não tem
<b>TRANSMISSÃO PARA A LINHA GERMINATIVA</b>	Não	Pode ocorrer	Pode ocorrer	Sim	Não	Não
<b>OUTRAS CARACTERÍSTICAS</b>	Eficiência média, infeta apenas células mitóticas.	Eficiência variável	Infeta apenas células mitóticas	Eficiência elevada, não necessita de células em divisão	Eficiência elevada.	
<b>REFERÊNCIAS</b>	(7,51,59)					

Outro desafio pode ser a modulação da expressão gênica do gene de interesse, o que impede prever a quantidade de proteína produzida nem a duração desta expressão. Por fim, existe ainda o risco de integração do material genético em células da linha germinativa, permitindo a transmissão gênica para as gerações futuras (32).

Outro ponto a ter em conta aquando da transferência do material genético é a resposta imune, principalmente quando o vetor utilizado para esta transferência é viral (52). Se ocorrer esta resposta imunitária, haverá a diminuição da eficácia do doping genético, como uma maior dificuldade na repetição de administração do transgene no organismo (32,52,53). A utilização de vetores não virais pode diminuir a probabilidade de indução de resposta imune, mas não a elimina por completo (32,52). O facto de haver produção de uma proteína que pode ter ligeiras diferenças comparativamente à proteína endógena também pode induzir resposta imune (32). A utilização de alguns métodos, como os lipossomas catiónicos, induzem uma rápida produção de citocinas pro-inflamatórias pelas células imunes, estimuladas pelos grupos CpG não metilados dos plasmídeos de DNA (52). Com todos estes pontos contra, o maior desafio é manter a segurança do indivíduo que usufrui do procedimento, desde a manipulação dos vetores em laboratório, até à possível resposta imune desencadeada pelo vetor (7,32,52). Durante este século, uma nova abordagem que permite a manipulação de qualquer gene à escolha num vasto leque de tipos de células e organismos, tem sido estudada, sendo-lhe dada o nome de edição gênica. Esta técnica é baseada na utilização de nucleases, compostas por domínios de ligação a sequências específicas de DNA que estão fundidas com módulos de clivagem não específicos (62). As nucleases utilizadas nas técnicas de edição gênica são as meganucleases (MNs), as *zinc-finger nucleases* (ZFNs), as *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) e as *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) e a CRISPR-Cas9 (3,62,63). O mecanismo base de disrupção gênica ou recombinação homóloga é subjacente a todas elas. Isto é, todas as nucleases promovem a quebra da cadeia dupla em locais específicos do genoma e consequente ativação dos mecanismos de reparação celular do DNA (62–64). Esta reparação pode ser feita por dois mecanismos diferentes, dependendo da presença ou ausência de moléculas dadoras de DNA adequadas (63,64). Assim, se essas moléculas dadoras existirem, existe uma reparação baseada na homologia das cadeias e, portanto, um evento de edição gênica. Por outro lado, se não estiverem presentes essas moléculas, vai existir uma união de extremidade não homóloga, levando a eventos de disrupção gênica pela inserção e/ou deleção de nucleótidos (62–64). Assim sendo, estas novas técnicas têm diversas funções, como introdução ou substituição de genes e inserção ou deleção precisa de segmentos de DNA com vários comprimentos (tabela 7) (3).

**Tabela 7** Técnicas de edição gênica utilizando nucleases.

NUCLEASE	MNS	ZFNS	TALENS	CRISPR-CAS9
<b>CARACTERÍSTICAS GERAIS</b>	Endodesoxirribonucleases naturais encontradas em microorganismos, mitocôndrias eucariotas e cloroplastos.	Fusão do domínio de clivagem de DNA não específico da endonuclease de restrição da FokI com proteínas <i>zinc-finger</i> .	Fusão do domínio de clivagem da FokI e os domínios de ligação ao DNA das proteínas TALE, estas que contêm cerca de 35 domínios de aminoácidos que reconhecem, cada um, um único par de base.	Sistema de imunidade adquirido das bactérias, composto pela nuclease Cas9 e <i>single-guide</i> RNA (sgRNA). O sgRNA é uma molécula de RNA projetada para reconhecer a sequência alvo, para clivagem pela nuclease Cas9.
<b>VANTAGENS</b>	Locais de reconhecimento com grande comprimento; baixa citotoxicidade em mamíferos.	Especificidade dos domínios de dedos de zinco desenhados direcionam o domínio de clivagem para o local de interesse; design de ZFNs específicos para os diferentes locais de interesse; fácil entrega <i>in vivo</i> através de métodos físicos e vetores virais de transdução.	Menos dispendioso; mais seguro; mais eficiente; sem clivagens fora do alvo, logo, menos citotoxicidade; design simples.	Manipulação de uma sequência curta de RNA; design rápido e rentável; aplicado a vários tipos celulares;
<b>DESVANTAGENS</b>	Número limitado de sequências alvo disponíveis; preparação das enzimas difícil; baixa eficiência de edição.	Especificidade dependente da triplete alvo e das sequências adjacentes do genoma, provocando toxicidade nas células pelas clivagens fora do alvo; apenas um único alvo de cada vez.	Tamanho grande, impedindo a sua transferência <i>in vivo</i> , elevada possibilidade de recombinação.	Dificuldade na transferência <i>in vivo</i> devido ao tamanho da nuclease Cas9.
<b>REFERÊNCIAS</b>	(63,65)	(62–65)	(62–65)	(62–65)

## **3.2. Genes Alvo**

A performance desportiva é um conjunto de características influenciadas não só por fatores genéticos, mas também por fatores ambientais e, com o decorrer das décadas, têm sido realizados vários estudos com o objetivo de identificar quais os genes mais relevantes para um fenótipo atlético de elite. Os estudos têm comprovado que efetivamente existem genes relevantes para o desempenho desportivo de excelência, podendo variar consoante o desporto (51,66,67). Dentro destes genes relacionados com a performance desportiva, existem já vários polimorfismos estudados e definidos e que vão influenciar o fenótipo do atleta. Por exemplo, o gene ACTN3 está relacionado com a velocidade, mas dependendo do polimorfismo presente nesse gene, o atleta pode ser um excelente velocista ou um exímio corredor de longas distâncias. Assim sendo, existem cerca de 100 marcadores genéticos relacionados com a endurance dos atletas e, pelo menos, 69 marcadores genéticos ligados à potência (68).

De forma geral, qualquer gene envolvido na locomoção, no aporte de oxigénio, na coordenação neuromuscular, na reparação e crescimento muscular ou alívio de dor pode ser um alvo de doping genético, tal como acontece com outros tipos de doping (52). No entanto, à semelhança das terapias dirigidas, o sucesso do doping genético vai depender da correta escolha de genes de acordo com o desporto que o atleta pratica (51). Assim sendo, atletas que pratiquem modalidades de resistência, como atletismo ou natação, terão, como alvo, genes envolvidos no aporte de oxigénio e na redução da fadiga, enquanto atletas de modalidades de força ou agilidade preferirão genes envolvidos na estimulação de massa muscular e aceleração do processo de recuperação de lesões (51,67).

Apesar de existir um leque diversificado de genes que podem ser utilizados como doping genético para as diferentes modalidades, acredita-se que há uma maior probabilidade de utilizar determinados genes (7,52,69).

### **3.2.1. Genes Envolvidos na Melhoria da Resistência**

Atletas que pratiquem desportos de resistência, como algumas modalidades do atletismo e da natação, vão sofrer adaptações a esse estímulo, estas que estão relacionadas com o metabolismo celular e com a função cardiovascular. Fatores como a proporção de fibras musculares de contração lenta e a taxa máxima de consumo de oxigénio ( $VO_2max$ ) são, então, cruciais para perceber como poderá ser o desempenho do atleta em provas de resistência (69,70). Existem, também, factores que influenciam a  $VO_2max$ , sendo estes o fluxo sanguíneo muscular, o próprio sistema respiratório, a circulação sanguínea e o metabolismo muscular, que estão estreitamente relacionados com a densidade capilar nos músculos esqueléticos, o número de mitocôndrias nos miócitos, o *output* cardíaco, os níveis de hemoglobina e a atividade das enzimas oxidativas (70).

## **Eritropoietina (EPO)**

De todos os genes possivelmente utilizados como doping genético, a EPO é dos mais conhecidos, uma vez que a sua utilização como doping já existia no passado (67). A EPO é uma glicoproteína composta por 165 aminoácidos sintetizada pelos rins, principalmente pelo cortex, em resposta a baixos níveis de oxigénio no sangue (51,52,71). É quando os níveis de oxigénio estão diminuídos que a EPO é produzida e libertada, ocorrendo a ligação com o seu recetor, EPOr. É esta ligação que vai estimular a eritropoiese, aumentando assim o aporte de oxigénio aos músculos (51,71). Este aumento do aporte de oxigénio é explicado pela atuação da EPO ao nível da regulação da eritropoiese que ocorre na medula óssea, permitindo o aumento da hemoglobina e dos hematócitos (11,67,71).

A rEPO foi introduzida como droga proteica no final dos anos 80, para o tratamento da anemia causada por diversas doenças, como a doença crónica renal, o HIV e o cancro, permitindo que haja outra alternativa para os transplantes de sangue. (52,71,72). A rEPO tem, então, as mesmas funções que a EPO endógena, permitindo, assim, o aumento da capacidade de resistência do atleta, melhorando a sua performance, uma vez que permitem o aumento do aporte de oxigénio aos músculos sem que ocorra hipóxia (51). Desta forma, atletas e treinadores com objetivos imorais vêem nesta hormona um passaporte para um melhor desempenho nas competições (71). A primeira utilização ilícita de rEPO foi documentada no Tour de France de 1989 e, desde então, não foi um caso único (51).

Os atletas que utilizam a rEPO usufruem, então, do aumento da capacidade máxima de consumo de oxigénio do corpo, permitindo melhorias na capacidade de resistência do atleta (71). No entanto, os malefícios trazidos por esta mesma utilização podem ser inúmeros e podem variar entre sintomas ligeiros ou levar até mesmo à morte (7,71). A estimulação da eritropoiese feita pela utilização de rEPO vai aumentar a viscosidade do sangue e, por consequência, há o aumento do risco de bloqueio da microcirculação, insuficiência cardíaca, derrames, embolia e hipertensão (51). Para além destes efeitos adversos, o indivíduo pode sentir sintomas gripais, reações alérgicas e anafiláticas, possibilidade de progressão tumoral em indivíduos com tumores e aplasia eritrocitária pura (71).

Outra característica atrativa da rEPO para os interessados na utilização de doping é a dificuldade de a detetar através dos métodos de deteção utilizados pelas entidades anti-doping. Esta dificuldade reside na difícil distinção entre a EPO (endógena) e a rEPO (droga), no curto tempo de vida da proteína no soro e na impossibilidade de deteção na urina 3 a 4 dias após a injeção (71).

## ***Hypoxia Inducing Factor (HIFs)***

Os HIFs são fatores de transcrição associados a stress hipóxico (69). Estes são libertados quando o organismo enfrenta situações de baixos níveis de oxigénio e vão ativar a transcrição de outros genes

envolvidos no controlo da hipóxia, da angiogénese, da ativação da eritropoiese e da regulação do metabolismo da glicose (7,52,69). Em condições de oxigénio normais, estes fatores são desativados, sendo apenas ativados em condições de hipóxia. Dentro dos HIFs, o HIF-1 está presente em quase todos os tecidos do organismo, principalmente nos rins e no coração, enquanto o HIF-2 está limitado a alguns tecidos, como as células endoteliais (32,69).

A estimulação da expressão de HIFs através de doping genético em condições normais de oxigénio pode melhorar as capacidades de resistência do atleta (7,52). Estes fatores de transcrição estimulam, também, genes associados com a adaptação metabólica das células, a angiogénese, a apoptose e a carcinogénese. Assim sendo, estas alterações podem levar a enfartes do miocárdio, derrames ou cancro (7,32,52).

### ***Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)***

O VEGF promove a angiogénese, ou seja, a formação de novos vasos sanguíneos através da ramificação de vasos já existentes e, também, funciona como um fator de sobrevivência de células endoteliais (7,51,52,67,72). Estas características trazem vantagens para um atleta de resistência que usufruir de doping genético utilizando vetores com este gene. A angiogénese vai permitir uma maior difusão de oxigénio pelos tecidos e, conseqüentemente, uma maior disponibilidade de oxigénio para a produção de energia, aumentando, assim, as capacidades de resistência do atleta (72). Adicionalmente, um maior fluxo de sangue nos músculos adia a fadiga, sendo muito vantajoso para atletas de resistência, uma vez que vão sentir menos exaustão comparativamente a um atleta que não usufrua de doping genético (51).

Por estimular a angiogénese, o VEGF pode ainda ser utilizado para acelerar os processos de cura de lesões (67). Com tudo, a utilização de VEGF como doping genético pode causar efeitos secundários, tais como doenças neoplásicas, respostas imunes e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos (7,51).

### ***Peroxisome proliferator-activated receptor- $\delta$ (PPAR- $\delta$ )***

O PPAR- $\delta$  tem principal relevância no que diz respeito à melhoria da resistência dos atletas (52,69). Estes recetores estão envolvidos no metabolismo mitocondrial e o PPAR- $\delta$  regula a expressão de outros genes relacionados com o metabolismo de lípidos e hidratos de carbono (51,69). A ativação do PPAR- $\delta$  está, então, relacionada com diminuição de ganho de peso, aumento da resistência do músculo esquelético, aumento da sensibilidade à insulina, melhoria da função cardiovascular e diminuição da inflamação aterogénica (52).

A melhoria da resistência é explicada pela influência que estes recetores têm na alteração das fibras músculo-esqueléticas tipo I, de contração rápida, em fibras musculares de tipo II, de contração lenta (32,67). Assim, a sobre-expressão deste gene pode aumentar a proporção de fibras tipo II em relação às de tipo I, sendo vantajoso para atletas de resistência (67,69).

A transferência deste gene para o organismo humano aponta para a sobre-expressão de hormonas sexuais e, também, em cancro do cólon (7).

### ***Angiotensin converting enzyme (ACE)***

O gene ACE codifica uma enzima capaz de transformar a angiotensina I em angiotensina II, que é um vasoconstrictor (69). Desta forma, a ACE está envolvida na regulação da pressão sanguínea, aumentando a mesma (7,69). A mesma enzima atua, também, na diminuição da pressão sanguínea, pela inativação da bradicinina, aumentando, assim, a proporção de fibras musculares de contração lenta (7). Assim, a ACE pode estar associada à melhoria da resistência, mas também à melhoria da eficiência de *sprints*, dependendo do polimorfismo presente no gene (7,32,66,69). O polimorfismo de inserção/deleção (I/D) neste gene foi o primeiro polimorfismo associado ao atletismo e diferentes genótipos vão estar, então, associados a diferentes características (66). A inserção de um fragmento neste gene está associada ao desempenho desportivo de resistência, enquanto que a deleção desse mesmo fragmento está associada ao desempenho relacionado com a força e potência (32,52,66). A inserção do fragmento nos dois alelos traduz-se fenotipicamente em baixa atividade da enzima e esta característica é frequentemente encontrada em maratonistas, triatletas e remadores, todos eles atletas de modalidades que requerem resistência, uma vez que existe correlação com o aumento da eficiência muscular (66,69).

Uma vez que este gene codifica uma enzima relacionada com a regulação da pressão sanguínea, uma das consequências poderá ser o aparecimento de angioedemas (7).

### ***Cytosolic phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCK-C)***

A PEPCK-C é uma enzima reguladora da gluconeogénese, sendo crucial para a homeostasia da glucose (7,51).

Apesar de o seu papel como potenciador de performance ainda não estar definido e de não existirem quaisquer ensaios clínicos no que diz respeito à sua utilização nas terapias génicas, estudos em ratinhos apontam para uma melhoria da resistência e diminuição da gordura corporal, uma vez que o aumento de triglicéridos potencia a performance desportiva (51,67).

Também ainda não há certezas quanto aos efeitos negativos que este gene possa ter no corpo humano, derivado da sua utilização incorreta, mas sabe-se que a sua sobre-expressão pode resultar em hiperglicemia (7,51).

### **3.3. Genes Envolvidos na Melhoria da Força e Potência Muscular**

Na fisiologia desportiva, potência e força são categorizadas como características musculares diferentes. No entanto, no que diz respeito aos estudos genéticos, estes fenótipos são estudados em conjunto e descritos como o status de força/potência (força/velocidade) do atleta (70). Contrariamente aos desportos de resistência, os desportos que requerem velocidade e força, como os 100 metros no atletismo e o halterofilismo, são esforços de curta duração que precisam de desenvolver força máxima num curto espaço de tempo, ativando, assim, fontes anaeróbicas de ATP (70).

Apesar de já terem sido descritos vários marcadores genéticos para a força e potência muscular, existem marcadores que são mais significativos do que outros. Assim, nestes desportos, as características musculares preponderantes são a proporção de fibras musculares tipo II, estas que são fibras de contração rápida e que determinam a força contrátil e permitem gerar força máxima num curto período de tempo, e também a área transversal do próprio músculo (70).

#### ***Growth Hormone (GH)***

A GH é uma hormona peptídica produzida pelas células somatotrópicas da glândula pituitária anterior e, no adulto, é importante para a manutenção da composição corporal, bem-estar, performance física e saúde cardiovascular (51,52,73,74). A sua produção é estimulada por hormonas produzidas pelo hipotálamo, tais como a hormona libertadora da GH, a somatostatina e a grelina, e a libertação destas hormonas está dependente de fatores como o sono, o exercício, a idade, o sexo e os níveis de IGF-1 (51,52,73). Apesar da sua utilização como substância melhoradora do desempenho estar muito disseminada pelo mundo do desporto e de haver relatos de vários atletas de elite que consumiram esta substância, como os velocistas Ben Johnson e Marion Jones, medalhistas nos Jogos Olímpicos, não há evidência científica que suporte os pressupostos teóricos de que a GH ajuda a melhorar a performance desportiva em atletas de elite (52,73). Contudo, estudos demonstraram que é possível aumentar a produção de IGF-1 indiretamente através do aumento da produção endógena de GH, e a GH é de aquisição mais fácil que a IGF-1, o que pode justificar o abuso desta hormona (51,73).

A GH tem um papel importante na manutenção da composição corporal no adulto, uma vez que tem um efeito lipolítico muito forte. Como efeito, a utilização de GH pode resultar na perda de massa gorda

e aumento da massa magra. Este efeito de lipólise ocorre pela redução da ação de enzimas lipogénicas e pelo aumento de produção de outras hormonas lipolíticas e também pela expressão aumentada de recetores adrenérgicos nos adipócitos (73). A GH induz, também, a captação de glicose e de aminoácidos, estimulando a síntese proteica e, desta forma, aumenta a força muscular e é por essa razão que é utilizada por atletas como os velocistas (51).

O abuso de GH aumenta o risco de resistência à insulina, intolerância à glicose, edema periférico e artralgias (52,73,74). Como os genes da GH e da IGF-1 são genes anti-apoptóticos e mitogénicos, a carcinogénese é um risco potencial, embora existam apenas evidências para o IGF-1 e não ao GH (73).

### ***Insulin growth factor 1 (IGF-1)***

O IGF-1 é um péptido estruturalmente semelhante à insulina que é produzido após a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-fígado. O hipotálamo produz a hormona libertadora da GH, que estimula a pituitária a produzir e libertar GH e esta, por fim, vai estimular a produção de IGF-1 pelo fígado (11,51,67).

O aumento de IGF-1 permite a hipertrofia muscular e reparação muscular após danos derivados de sobrecarga ou stress. Esta hipertrofia leva, conseqüentemente, a um aumento de potência e força muscular (51). Os níveis de IGF-1 aumentados também retardam a perda e atrofia muscular em momentos de paragem de prática de exercício físico, o que foi verificado em estudos conduzidos em ratinhos nessas condições (11). Para estes efeitos serem significativos, a concentração desta proteína tem de ser elevada, uma vez que o seu período de semi-vida é curto e tem uma rápida depuração. A introdução deste gene e não da proteína recombinante apresenta uma solução, garantindo a manutenção de concentrações altas da proteína IGF-1 e, visto que os efeitos estão restritos ao músculo alvo, torna a transferência deste gene um método relativamente seguro (52). Para além de ser mais seguro, este método provou obter melhores resultados na regeneração muscular pós-lesão do que a administração sistémica da proteína IGF-1 (52).

No entanto, elevadas concentrações de IGF-1 podem trazer vários problemas para a saúde dos atletas, uma vez que pode ocorrer resistência à insulina, hipoglicemia, distúrbios de crescimento e problemas cardiovasculares, como hipertrofia cardíaca (51,52). À semelhança do gene da GH, o gene que codifica a IGF-1 é promotor da progressão do ciclo celular e inibe a apoptose, o que pode acionar outros fatores de crescimento e até mesmo interagir com vias envolvidas na carcinogénese e, conseqüentemente, contribuir para o cancro (52).

## Miostatina (MSTN)

A MSTN é um membro da superfamília dos fatores transformadores de crescimento (TGF- $\beta$ ) e atua como um regulador negativo do crescimento das células musculares, isto é, a sua presença limita o crescimento muscular (11,31,52,67,72). Este controlo do anabolismo muscular é feito através da inibição da ativação das células mio-satélite e também da diminuição do potencial de hiperplasia e hipertrofia das fibras musculares (32). Assim sendo, o bloqueio desta proteína leva ao aumento da massa e força muscular, sendo indicada para atletas que precisam de força muscular e não potência/velocidade (51).

A MSTN ganhou foco quando, em 2004, foi reportado um caso de uma criança com deficiência na miostatina. A criança alemã nasceu com mutações em ambas as cópias do gene MSTN, o que possibilitou que tivesse, aos 4.5 anos de idade, uma constituição física semelhante a um halterofilista e com a capacidade de segurar em halteres de 3kg com os braços esticados. A mãe da criança, uma antiga atleta profissional, foi estudada e apresentava a mesma mutação em apenas uma das cópias (31,32,52).

A inibição *in vivo* da MSTN é um potencial alvo de doping genético e existem diversas formas estudadas para o fazer (figura 3). No entanto, estes métodos foram estudados exaustivamente apenas em animais e nenhum deles foi estudado em humanos (32,51).

A utilização de bloqueadores de MSTN e consequente sub-expressão aumentam o risco para um défice de funções cardíacas e respiratórias. Por outro lado, a sobre-expressão da MSTN pode induzir caquexia e está relacionada, também com obesidade e diabetes (51).

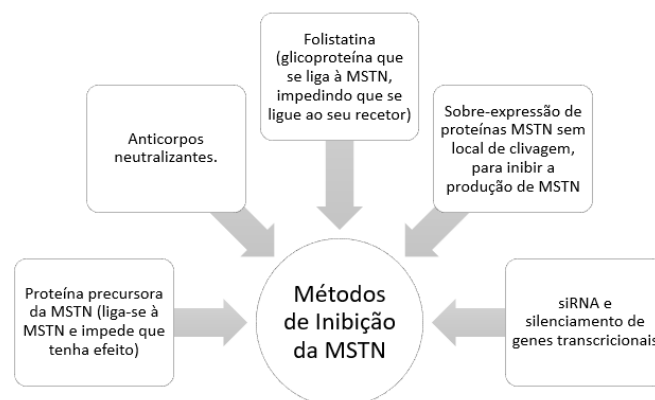


Figura 3 Métodos estudados para a inibição da miostatina.

## **Angiotensin converting enzyme (ACE)**

A ACE é uma enzima com funções reguladoras da pressão sanguínea e importante para a eficiência cardiorrespiratória. Neste gene, podem ocorrer polimorfismos de inserção ou deleção, originando genótipos de inserção/inserção (I/I), inserção/deleção (I/D) ou deleção/deleção (D/D) (66). Alguns estudos revelam que o genótipo I/I está associado a atletas de resistência, os genótipos I/D e D/D estão associados a atletas mais predispostos a desportos de potência e velocidade (32,66,69).

Para além de regular a pressão sanguínea, a ACE também influencia as funções músculo-esqueléticas. A ACE promove a conversão de angiotensina I em angiotensina II, esta que, em paralelo com as funções vasoconstritoras, também atua como fator de crescimento muscular envolvido na hipertrofia muscular induzida pela sobrecarga (75). De facto, o alelo D está associado a uma maior atividade da ACE, resultando em maiores concentrações de angiotensina II e, conseqüentemente, a uma maior proporção de fibras musculares de contração rápida, essenciais para a velocidade e potência muscular (66,75).

## **$\alpha$ -Actinina-3 (ACTN3)**

A ACTN3 é uma proteína sarcomérica restrita às fibras musculares de tipo II, as fibras de contração rápida. Estas fibras geram força a altas velocidades durante atividades explosivas ou de potência (51,66,75,76). Nas fibras, o  $\alpha$ -actinina-3 liga os filamentos de actina uns aos outros na linha Z do sarcómero (51,69). Para além das funções estruturais, esta proteína também tem um papel importante no metabolismo muscular (51).

Foi descrito um único polimorfismo no exão 16 deste gene, que leva a um codão stop prematuro (X) em vez da arginina (R), no aminoácido 577 (R577X). Segundo a literatura, o alelo R é vantajoso para a performance desportiva, principalmente em atletas de modalidades explosivas e de velocidade, e o genótipo RR está presente em muitos dos genomas de atletas de elite dessas mesmas modalidades. Pelo contrário, o genótipo XX está associado a baixas capacidades de sprint e pouca força muscular (66,69,76,77). O polimorfismo R577X leva à diminuição da proteína ACTN3, havendo substituição dessa proteína pela ACTN2 e conseqüente transformação das fibras musculares de contração rápida em fibras de contração lenta, melhorando a capacidade de resistência e não de velocidade (51,77).

O gene ACTN3 é o único em que a associação entre o genótipo e o desempenho desportivo está comprovado por estudos científicos, desde testes feitos a atletas olímpicos, como em modelos feitos em ratinhos *knockout* (66,75).

Apesar de ainda não terem sido feitos ensaios de terapias génicas utilizando este gene, todos os estudos apontam para que o aumento das cópias de ACTN3 pode ser utilizado como doping para atletas

de velocidade e a diminuição dessas cópias pode ser utilizado para melhorar as capacidades de resistência (51).

### ***Adenosine Monophosphate Deaminase 1 (AMPD1)***

A AMPD é uma enzima que participa na regulação do metabolismo de energia do músculo durante a prática de exercício físico, pois converte a adenosina monofosfato, esta que aumenta durante o exercício, em inosina monofosfato, levando, assim, à produção de ATP (69,78). Esta reação coincide, também, com o início do ciclo das purinas, das quais fazem parte os nucleótidos adenina e guanina, tendo um papel preponderante na recuperação de adeninas (78). A atividade da AMPD no músculo esquelético é diminuída pela atividade física e a sua expressão é dependente da composição das fibras musculares e, também, da própria intensidade da atividade física.

A AMPD1 é a isoforma específica das fibras musculares, sendo predominante nas fibras musculares de contração rápida. À semelhança do ACTN3, foi descrita uma mutação nonsense, que converte a glutamina num codão stop prematuro (c.34C>T), resultando na interrupção da síntese proteica e, conseqüentemente, numa proteína deficiente (78). Assim, na população, pode-se encontrar indivíduos sem a mutação (CC), com mutação em heterozigotia (CT) e com mutação em homozigotia (TT) (69,78,79). Indivíduos TT apresentam níveis de atividade muito baixos de AMPD1 e os indivíduos CT apresentam níveis um pouco mais altos, enquanto que os indivíduos CC apresentam níveis de atividade elevados, tendo uma maior proporção de fibras de contração rápida e maior disponibilidade para modalidades que requerem potência e velocidade. Os indivíduos com mutação experienciam câibras musculares, dor e fadiga prematura durante a prática desportiva (69,78,79). Um estudo feito em jogadores de futebol mostrou que atletas com genótipos TT e CT precisam de mais tempo de recuperação entre treinos e jogos e, como o tempo de descanso que lhes é dado não é suficiente, estes atletas estão mais propensos a adquirir lesões do que os atletas sem mutação no gene AMPD1 (79).

Por fim, a frequência de alelos mutados em atletas de elite é mais baixa do que na população em geral (78).

### **3.4. Genes Envolvidos na Recuperação de Lesões, Tolerância à Dor e Motivação**

Outros fatores que influenciam o desempenho do atleta nos treinos e competições é a sua predisposição genética para lesões, o tempo que demoram a recuperar de lesões entre treinos e jogos, a tolerância à dor e a própria motivação.

O risco de tendinopatias (lesões nos tendões) pode alterar consoante as variantes nos genes dos fatores de crescimento dos fibroblastos (FGF), do colagénio I (COL1A1), do colagénio V (COL5A1), da metaloproteinase-3 da matriz (MMP3) e da tenascina C (TNC) (67,69). Alguns polimorfismos ocorrentes nestes genes estão associados a lesões em tendões como o tendão de Aquiles e o ligamento cruzado anterior (LCA), assim como com a recuperação de outros tipos de lesões (69).

A dor é um fator muito presente durante a prática desportiva de alta competição. Treinar e jogar com dor é uma realidade para a maior parte dos atletas e é um sinal de alerta para que o atleta reduza a intensidade dos seus esforços. Esta realidade influencia negativamente a performance do atleta, apesar de os atletas serem treinados psicologicamente para aguentar a dor. No entanto, há certas situações em que há necessidade de recorrer à administração de medicamentos anti-inflamatórios e analgésicos (11,51,72). A possibilidade de aumentar a tolerância à dor através do aumento da expressão de genes como as encefalinas e as endorfinas pode trazer vantagens consideráveis aos atletas que deles usufruam (51).

Por fim, o stress, a pressão e as emoções inerentes à competição desportiva, por um lado, podem motivar os atletas, mas, por vezes, podem ter o efeito oposto. A capacidade de resistir às situações de pressão pode, também, estar “escrita” nos nossos genes, e polimorfismos em genes como a serotonina e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) podem ser determinantes para essa resistência emocional e psicológica (69).

### ***Fibroblast growth factor 2 (FGF2)***

O FGF2 é um dos 22 fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) presentes no Homem, expressos durante o desenvolvimentos dos tecidos e durante o período adulto (51,80). Estes fatores interagem com recetores membranares específicos (FGFR) e medeiam vários processos biológicos, tais como a angiogénese, a mitogénese, a regulação metabólica, a diferenciação, a migração celular e a reparação de lesões (80).

A expressão do FGF2 está presente em quase todos os tecidos e tem um papel importante na cicatrização de tendões e ossos, reparação de ossos e cartilagem, e regeneração nervosa. No que diz respeito ao processo de recuperação de tendões e ligamentos pós-lesão, a expressão do FGF2 aumenta naturalmente, promovendo a proliferação e migração celular, a angiogénese e a produção de fibras de colagénio tipo I e III (80). Relativamente ao processo de reparação da cartilagem, o FGF2 é um fator de crescimento endógeno da cartilagem articular e, após uma lesão neste tecido, a libertação do FGF2 permite aumentar a expressão do gene dos condrócitos. Neste caso em específico, o FGF2 pode ter duas funções distintas, dependendo do FGFR a que se ligam. Ocorrendo a ligação FGF2-FGFR3, há a reparação dos danos da cartilagem. Por outro lado, a ligação FGF2-FGFR1 promove a degradação da cartilagem (80). A

angiogénese promovida pela libertação de FGF2 vai ser essencial para o aumento de vascularização do tecido muscular e, conseqüentemente, para a sua recuperação pós-treino ou pós-lesão (51).

A utilização deste gene no doping genético tem, como objetivo, acelerar a recuperação do atleta. No entanto, pode implicar um aumento de vascularização de tumores existentes, proteinúria por formação anormal da rede capilar ou estimular remodelações patogénicas do coração (51).

## **Colagénio 1 (COL1A1) e Colagénio 5 (COL5A1)**

Os genes COL1A1 e COL5A1 são responsáveis por codificar as cadeias  $\alpha 1$  das fibras de colagénio tipo I e tipo V, respetivamente, estas que são a unidade formadora dos tendões e ligamentos (81). Vários estudos tentaram encontrar uma correlação entre certos polimorfismos nesses genes e o aparecimento de lesões em tendões, tais como o tendão Aquiles e o LCA (81,82).

As fibras de colagénio tipo I são predominantes na estrutura de todos os tendões e ligamentos e cada fibra tem duas cadeias: a cadeia  $\alpha 1$  e a cadeia  $\alpha 2$ , na proporção de 2:1. Alterações no gene COL1A1, vai causar o comprometimento estrutural de toda a fibra de colagénio de tipo I. O polimorfismo mais comumente encontrado e estudado neste gene ocorre no intrão 1, onde há a troca de uma guanina por uma timina na posição 1245 (1245G/T). Este polimorfismo causa falhas na transcrição do gene, levando a uma alteração na proporção de cadeias  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , resultando numa proteína madura diferente da habitual e, por conseguinte, numa fibra de colagénio com estrutura alterada. Alguns estudos demonstram que este polimorfismo será benéfico para a prevenção de lesões e que genótipos TT estão relacionados com o risco reduzido de lesões em tendões ou ligamentos (66,81).

O colagénio tipo V é uma fração mais pequena do colagénio fibrilar e está presente no tecido conjuntivo intramuscular. No entanto, é um elemento crítico da estrutura das fibras de colagénio e, por conseguinte, dos tendões, ligamentos e outros tecidos conjuntivos. O COL5A1 está descrito como um gene envolvido em lesões musculares, bem como na rigidez muscular passiva e a flexibilidade articular. O polimorfismo mais comum neste gene é a alteração da citosina por uma timina (rs12722) e está associado com a alteração da estabilidade do mRNA do COL5A1, havendo evidência que o alelo T permite maior estabilidade ao mRNA e, conseqüentemente, maior produção de cadeia  $\alpha 1$  de colagénio tipo V. À semelhança do que acontece com o COL1A1, este polimorfismo traduz-se numa alteração do colagénio e, por conseguinte, em alterações estruturais da própria fibra de colagénio tipo V, associadas a maior rigidez muscular, flexibilidade articular diminuída e maior risco de lesões musculares (82).

### **Matrix Metalloproteinase-3 (MMP3)**

O gene MMP3 codifica a metaloproteinase da matriz 3, que é um membro das endopeptidases de zinco que clivam proteínas do tecido conjuntivo e da matriz extracelular. Desta forma, tem funções de remodelação e manutenção de tendões, bem como de reparação dos mesmos, e de regulação da homeostasia da matriz extracelular através de atividades proteolíticas (83,84). Este gene aparece subexpresso em tendinopatias e em ruturas de tendão completas (83).

Vários estudos mostraram correlação entre alguns polimorfismos deste gene e lesões nos tendões e ligamentos. Alguns dos polimorfismos, como o rs679620 G>A, em homozigotia, estão associados a ruturas dos tendões, principalmente do tendão de Aquiles (83,84).

Existe a hipótese de que a expressão aumentada do gene MMP3 é imprescindível para a remodelação dos tecidos conjuntivos inerentes aos tendões e ligamentos e, também, para a prevenção de alterações patológicas nos tendões (83). Sendo assim, este gene poderá ser utilizado como doping genético em situações de lesões nos tendões para acelerar o processo de recuperação.

### **Tenascina C (TNC)**

O gene TNC codifica outro tipo de glicoproteínas, a tenascina C, que está presente no tecido conjuntivo denso dos tendões e, à semelhança das metaloproteinases da matriz, vai ter funções de remodelação da matriz extracelular e participam nas vias de sinalização celular, mediando a resposta a cargas mecânicas e modulando as propriedades elásticas e biomecânicas do tendão (85).

A expressão deste gene encontra-se elevada durante a embriogénese, uma vez que está envolvido na morfogénese dos órgãos, e muito baixa na fase adulta, à exceção de estados patológicos, em que há um aumento da expressão do gene TNC em resposta a lesões ou infeções. Na fase adulta, este gene é expresso essencialmente nas inserções dos tendões e ligamentos, bem como nas regiões miotendinosas e osteotendinosas (85).

Existem alguns genótipos relacionados com o aumento do risco de lesão nos tendões e ligamentos, sendo eles o genótipo CC do polimorfismo rs13321 G>C, o genótipo AA do polimorfismo rs2104772 T>A (85).

### **Endorfinas**

As endorfinas são neuropéptidos secretados pela glândula pituitária anterior em resposta ao exercício físico e stress físico e psicológico, e ligam-se aos recetores opioides, promovendo efeitos analgésicos e, conseqüente alívio da dor (72,86). De entre estas, a  $\beta$ -endorfina é a hormona da felicidade

mais importante e é libertada pela glândula pituitária para a corrente sanguínea e, também, pelos neurónios hipotalâmicos para o cérebro e medula espinal (86).

A libertação de endorfinas vai depender do tipo e intensidade de exercício físico praticado (86). As endorfinas têm ainda outras funções, como o retardamento da fadiga muscular, a diminuição da dor por acumulação de ácido láctico e da dor causada por lesões antigas (51).

Utilizar estas propriedades para melhorar a performance desportiva através da inserção de cópias destes genes no organismo do atleta, é um atrativo enorme para os atletas, uma vez que aumentam o seu limiar de dor, diminuem a sensação de dor de lesões que eventualmente possam ter e a utilização destes genes como doping é muito difícil de detetar, pelo facto de serem direccionados para o cérebro (51,52,72).

## Encefalinas

As encefalinas, tal como as endorfinas, são hormonas que funcionam como opioides naturais, diminuindo a sensação de dor e retardo da fadiga muscular. Também têm a função de diminuir a dor provocada pela formação e acumulação de ácido láctico nos músculos e mascarar dores relacionadas com lesões antigas (51).

Ensaio clínico utilizando o vetor viral *Herpes Simplex* para transferir os genes da proencefalina para o organismo já foram feitos, sendo estes direccionados para diminuir a dor causada por cancro (51). Utilizam estes vetores virais uma vez que o vírus *Herpes Simplex* (HSV) é neurotrópico, isto é, tem como principal alvo os neurónios. Assim, o vetor consegue entrar nas terminações dos neurónios do local da injeção e viajam retrogradamente até aos corpos dos mesmos, onde o transgene é expresso em encefalina, permitindo a diminuição da percepção de dor (11).

Este tipo de terapia génica tem como objetivo diminuir a dor crónica provocada por cancro. Transferindo para o desporto, a dor que os atletas sentem é, muitas das vezes, aguda, ou seja, confinada a um período de esforço e não constante. Sendo assim, o doping genético teria de ser aplicado de forma a insensibilizar o atleta durante esses períodos de dor aguda (11).

## Serotonina

A monoamina serotonina (5-hidroxitriptamina) é um neurotransmissor com um papel importante na regulação do sistema neuro-hormonal, influenciando o humor, o apetite, a alegria, o sono, as atividades fisiológicas e as atividades cognitivas efetivas na aprendizagem e memória. Esta hormona tem como

precursor o aminoácido triptofano. A quantidade de aminoácido essencial livre presente no plasma sanguíneo vai influenciar a produção de serotonina (86).

Vários estudos vieram comprovar que exercícios aeróbicos, como a corrida, a natação e o ciclismo, aumentam a produção de serotonina e, conseqüentemente, melhoram o humor dos indivíduos (86).

Existem evidências de que polimorfismos nas regiões reguladoras do gene da serotonina, originando alelos maiores (L) ou menores (S), estão associados com o controle emocional daquele indivíduo. Um estudo feito em atletas do sexo feminino demonstrou que atletas com o genótipo SS tinham níveis menores de irritação e pessimismo, comparativamente com as atletas com genótipos LS e LL (69). Assim sendo, este gene poderá ser utilizado para diminuir os níveis de stress dos atletas durante os períodos competitivos que, naturalmente, são períodos de maior pressão.

### ***Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)***

O BDNF é uma neurotrofina presente no cérebro e nos nervos periféricos envolvida no crescimento e na manutenção de neurónios saudáveis e é predominante no sistema nervoso central (69,86,87). Faz parte de um leque de moléculas de produção aumentada após a prática de exercício físico, tendo funções anti-depressivas (86)As funções do BDNF estão alargadas a outros tecidos, como os músculos esqueléticos, tendo também efeitos reguladores do sistema imune (69,87). O BDNF também é secretado por células T e B ativadas, com a função de promover a sobrevivência dos neurónios (87). No cérebro, esta neurotrofina tem a responsabilidade de potenciar a proliferação e diferenciação das células progenitoras de neurónios, o crescimento e a regeneração dos neurónios, a sobrevivência neuronal e a remodelação e plasticidade sináticas a longo prazo (69).

A prática de exercício pode ter dois efeitos opostos nos níveis de BDNF, facto que leva a dois cenários completamente diferentes: treinar regularmente aumenta os níveis da neurotrofina no cérebro e, dessa forma, aumenta a motivação e bem-estar do indivíduo, e estes níveis permanecem durante duas semanas após a paragem; por outro lado, o excesso de treino diminui os níveis de BDNF, o que aumenta a falta de motivação, a ansiedade e a irritação (69).

Há evidências científicas que polimorfismos neste gene, principalmente G196A, afeta a resposta psicológica ao stress e à motivação para a prática de exercício, tendo efeitos nos pensamentos positivos/negativos do atleta durante os períodos competitivos. Desta forma, um atleta pode ser guiado para ter melhores emoções durante os períodos de maior pressão, como as competições, podendo alcançar, assim, um melhor desempenho e, conseqüentemente, melhores resultados (69).

### 3.5. Métodos de Detecção de Doping Genético

A deteção da utilização de doping genético é uma das prioridades das organizações desportivas, nomeadamente da WADA, uma vez que tem o objetivo de melhorar o desempenho desportivo dos atletas que o utilizam e, também, porque não existe um método ou conjunto de métodos de deteção descritos como viáveis ou eficazes (3,51,52). Apesar de o doping genético ter sido incluído na lista de substâncias e métodos proibidos da WADA em 2003, ainda não existem evidências da sua utilização pelos atletas, o que levanta a questão se os atletas ainda não utilizam doping genético para melhorar a performance ou se as organizações anti-doping falham na sua deteção (88)

A WADA está, atualmente, a financiar vários estudos de forma a encontrar métodos viáveis e eficazes para detetar a utilização de doping genético. No entanto, há múltiplos aspetos a ter em conta e que dificultam todo este processo. A maior dificuldade é o facto de as proteínas transgénicas serem semelhantes às versões endógenas da proteína. Outra dificuldade reside no facto de essas mesmas proteínas poderem ser secretadas ou não pelas células e poderem ser encontradas no plasma sanguíneo ou não. No caso de serem secretadas para a corrente sanguínea, há a possibilidade de estas serem detetadas em amostras biológicas e serem diferenciadas das proteínas endógenas através de pequenas diferenças estruturais. Por outro lado, se as proteínas expressas não forem secretadas e permanecerem dentro das células, a sua deteção é apenas possível através de amostras de tecido, isto é, biópsias, sendo este um método obviamente rejeitado pelos atletas, uma vez que os vai impedir de competir (11,31,52). Para se otimizar a deteção deste tipo de doping, vai ser necessário utilizar uma combinação de métodos diretos e métodos indiretos. Os métodos diretos são todos aqueles que visam a deteção de proteínas recombinantes ou de vetores de inserção de genes. Por outro lado, os métodos indiretos detetam alterações associadas ao doping genético, como alterações no sistema imune após a utilização de doping genético ou alterações no transcriptoma de um determinado tipo celular (51,72).

Para qualquer método ser viável e eficaz, principalmente se for um método direto que depende exclusivamente da quantidade e qualidade das cópias de transgene e proteínas transgénicas circulantes no plasma sanguíneo, há alguns aspetos pré-analíticos a ter em conta, tais como a amostragem, que vai depender da qualidade da colheita, acondicionamento e preparação das amostras e da extração de material genético ou de proteínas. Estas condicionantes são de extrema importância, uma vez que a concentração de transgene circulante após doping genético no sangue é incerta, logo, quanto mais bem executado o procedimento for, desde o momento da colheita até à técnica utilizada para a deteção, maior a taxa de sucesso do mesmo, uma vez que a perda de DNA durante este procedimento ronda os 20% e os 90% da quantidade inicial. Más condições de acondicionamento e transporte das amostras podem, também, aumentar a ocorrência de hemólise, inibindo o PCR, este que será o método mais presente na fase analítica do procedimento (57).

Para além da colheita de sangue comumente realizada, foi estudada a utilização das *dried blood spots* (DBS), uma vez que é um método de colheita sanguínea muito menos invasivo e que pode ser utilizado para pesquisa de utilização de doping genético. Vários estudos noutras áreas provaram a eficácia deste método na deteção de DNA e, também, a estabilidade do mesmo DNA, sem serem necessárias condições específicas de acondicionamento e transporte dessas amostras, podendo ser uma excelente alternativa como método de colheita de sangue em atletas durante o período competitivo (57).

### 3.5.1. Métodos de Deteção Diretos

Os métodos de deteção diretos são todos aqueles que permitem a deteção da proteína transgénica e do vetor utilizado para a transferência deste mesmo gene para o organismo (72).

No que diz respeito à deteção de proteínas transgénicas produzidas após a utilização de doping genético, é importante ter em conta o fundamento base deste tipo de doping: a terapia génica. Assim sendo, o objetivo destas terapias é a produção de uma proteína funcional e semelhante às proteínas endógenas, de forma a minimizar os efeitos colaterais que possam advir da terapia. Com isto, quando se fala em doping genético, este é um dos maiores atrativos, uma vez que a deteção da utilização de doping será muito difícil, porque técnicas invasivas no desporto, como colheitas de biópsias, são desaconselhadas (31,52).

Assim sendo, os métodos utilizados para detetar as proteínas transgénicas têm de se basear em diferenças estruturais entre essas proteínas e as proteínas endógenas, estas diferenças que vão ser mínimas (52,88). Apesar da causa destas diferenças ainda não estar totalmente compreendida, acredita-se que poderá estar relacionada com diferentes modificações pós-traducionais das proteínas expressas por diferentes células (52). Um dos exemplos mais conhecidos é o da EPO, onde há diferenças na glicosilação e, conseqüentemente, no comportamento isoelétrico das mesmas (32,88). Estas diferenças foram detetadas por Lasne aquando de estudos levados a cabo em macacos. Foi inserido o gene da EPO nos músculos dos macacos e foram analisados os padrões isoelétricos das isoformas da proteína EPO antes e após a injeção. Foram observadas, efetivamente, diferenças nos padrões isoelétricos após a injeção, explicadas pela diferente glicosilação pós-transcricional das moléculas de EPO, estas que foram detetadas utilizando a técnica *Western Blot*. No entanto, estas diferenças continuam a ser provadas unicamente em testes em macacos no que diz respeito à EPO. Em humanos, o único teste foi feito com a GH, o que não permite assumir que estas alterações ocorram em todos os casos de doping genético com outros genes alvo (88).

O rt-PCR é um método muito utilizado, uma vez que permite a deteção de mRNA transcrito por um gene candidato e até mesmo os próprios vetores, estes que passam para a corrente sanguínea, não

sendo necessário fazer um exame tão invasivo como uma biópsia muscular (3,89). Geralmente, o doping genético é detetado por PCR quantitativo (qPCR) e utiliza *primers* desenhados para diferentes exões do gene a pesquisar e sondas de hidrólise desenhadas para junções exão-exão. Assim sendo, será necessário escolher a sequência-alvo, ou seja, a sequência a flanquear pelos *primers* para posterior amplificação, esta que irá corresponder às junções exão-exão, uma vez que os transgenes introduzidos nos vetores virais não têm intrões. No entanto, estas junções exão-exão já são conhecidas e, portanto, é possível contornar este método de detecção pela inserção de mutações silenciosas nestas zonas, ou seja, mutações que não alteram a proteína final, mas resultam numa sequência de nucleótidos diferentes, levando a resultados falsos negativos, uma vez que o PCR é um método muito sensível e a amplificação será interrompida com a existência dessas mutações. Para evitar estes casos, há estudos que utilizam painéis de NGS com as junções exão-exão dos genes pesquisados como alvo, diminuindo a probabilidade de ocorrência de falsos negativos (89). A ocorrência de falsos negativos continua a ser uma possibilidade, uma vez que a concentração de um transgene no plasma sanguíneo após a utilização de doping genético não é ainda conhecida (57).

Algumas das estratégias que podem ser utilizadas para detecção direta da utilização de doping genético terão como fundamento o PCR, como o o *digital droplet* PCR (ddPCR), o qPCR microfluidico e a *next-generation sequencing* (NGS) (90). Estes métodos vão permitir a quantificação de transgene presente na amostra. Contudo, todos estes métodos foram estudados apenas para poucos genes alvo, como a EPO, IGF1 e GH, o que não garante que seja possível testar desta forma todos os outros genes potenciais (57). Os métodos já estudados são o qPCR para as sequências nas junções exão/exão e também qPCR para essas mesmas sequências, mas com alvos de amplificação de diferentes tamanhos, seguido de análise dos tamanhos dos fragmentos. Estes métodos podem ser feitos com amostras sanguíneas. Outros métodos possíveis são a amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP), que pode ser executada em amostras de sangue com EDTA e DBS, e também o *Next-Generation Sequencing* (NGS) direcionado para os genes EPO, IGF1 e GH, que foram os únicos ainda estudados (57).

Outra estratégia passa por mudar o alvo, isto é, em vez de se direcionar a pesquisa para a detecção dos transgenes, direciona-se para a detecção de vetores virais, pois os vetores podem ser detetados na corrente sanguínea. No entanto, a persistência do vírus no organismo pode variar de horas a meses, enviando os resultados e aumentando, assim, a probabilidade de ocorrência de falsos negativos. As amostras biológicas podem ser sangue, urina e até mesmo saliva, tendo o vírus tempos de permanência diferentes em cada tipo. A ocorrência de falsos positivos também é possível, em casos em que o atleta tem infecção vírica (51).

Os controlos anti-doping têm, também, de considerar os casos de doping genético que utilizam técnicas de edição génica, como o CRISPR-Cas9. Nestes casos, a pesquisa deve ser direcionada para as proteínas mais comumente utilizadas nestas técnicas, como a proteína Cas9 derivada da *Streptococcus*

*pyrogenes* (SpCas9), uma vez que é uma enzima exógena e, portanto, um dos principais alvos para a detecção. Uma das formas de detetar esta enzima é executar uma abordagem analítica *bottom-up* em amostras de plasma sanguíneo, tendo início na purificação de imunoafinidade, seguida de digestão trípica e terminando numa análise de *high-performance liquid chromatography-mass spectrometry* (HPLC-MS). Com esta análise, há a separação e purificação da enzima alvo através de anticorpos monoclonais anti-CRISPR-Cas9 com esferas magnéticas acopladas aos mesmos, seguida da digestão de outras proteínas que possam continuar a contaminar a produto final. Desta forma, quando for feita a HPLC-MS, é possível detetar a presença da SpCas9, caso ela esteja presente na amostra em estudo, com uma baixa probabilidade de haver contaminação por outras proteínas (91).

Outra estratégia mencionada em alguns estudos são os códigos de barras. Neste caso, é inserida uma sequência oligonucleotídica única e curta em cada transgene ou vírus, de forma a facilitar a detecção dos mesmos através de técnicas PCR. No entanto, esta alternativa requer coordenação por parte das federações e organizações desportivas e anti-doping com as empresas farmacêuticas, o que é bastante difícil de conseguir e, para além disso, é uma alternativa fácil de contornar, uma vez que os transgenes e vetores virais para uso de doping genético serão manipulados em condições clandestinas e, por conseguinte, podem evitar a introdução destes códigos de barras (32,51,52).

### **3.5.2. Métodos de Detecção Indiretos**

Os métodos indiretos baseiam-se nas reações que a inserção de um transgene através de um vetor viral pode provocar no organismo do atleta, desde a resposta imune a alterações proteómicas. Outro método que vai ser descrito é o Passaporte Biológico.

É necessário ter em conta que cada vírus desencadeia uma reação imune específica no hospedeiro e, logicamente, um vetor viral e um transgene irão provocar também uma resposta imune que poderá ser detetada e distinguida de uma resposta imune comum. Uma das dificuldades desta abordagem é distinguir ambas as reações imunes e perceber se a reação detetada é própria de uma infeção vírica ou de doping genético (51,52).

A expressão de um transgene vai levar a alterações na expressão de outros genes e suas proteínas, e de metabolitos bioquímicos. De maneira geral, a expressão de um determinado gene pode condicionar a expressão de outros genes relacionados com o primeiro. Falando de doping genético, a expressão de um transgene vai condicionar a expressão de outros genes endógenos relacionados com o mesmo, levando a alterações no perfil de expressão génica desses mesmos genes endógenos. Uma das formas de fazer este perfil de expressão génica é utilizando DNA *microarrays* ou painéis de NGS para comparar simultaneamente os padrões de expressão de mRNA de vários genes, podendo ser criados *chips* direcionados para a detecção de doping genético com vários genes alvo, como o gene “principal”

(aquele que se suspeita de ter sido utilizado como doping) e os genes associados com a sua expressão (52). Por outro lado, o perfil proteômico, através da análise feita por espectrometria de massa, permite estudar as alterações globais nas proteínas. Combinando a espectrometria de massa e a cromatografia, é possível obter rapidamente um perfil de expressão de proteínas de um vasto espectro de amostras biológicas. No entanto, para poderem ser métodos confiáveis, é necessário estabelecer intervalos de referência para a população em geral e atletas de elite, tendo em atenção o sexo, a raça, a idade e o desporto praticado (52).

Com estes intervalos de referência definidos e estudados, é possível criar um passaporte biológico para o atleta. O passaporte biológico já existe e apresenta dois módulos: o módulo hematológico e o módulo esteróide. A primeira referência a este passaporte surgiu no início do século XXI, com o objetivo de monitorizar os marcadores hematológicos que permitiam detetar a utilização de doping sanguíneo. Em 2009, surge o primeiro Passaporte Biológico do Atleta, contendo unicamente o módulo hematológico. Mais tarde, em 2014, surge o módulo esteróide, com o mesmo intuito do módulo anterior. As diretrizes pelas quais se rege o passaporte têm o objetivo de facilitar o intercâmbio de informação e o reconhecimento dos dados, aumentando a probabilidade de sucesso das operações anti-doping. Com a utilização do passaporte, é possível identificar os atletas que requerem mais atenção por parte das organizações anti-doping, uma vez que as informações do mesmo permitem direcionar as investigações posteriores de forma mais efetiva. Portanto, este método poderá ser um importante aliado aos métodos científicos mencionados anteriormente, se direcionado para um módulo genético(92). Para aumentar as probabilidades de sucesso deste método, devem ser privilegiados os testes em atletas sinalizados em vez de testes em atletas aleatórios. Assim sendo, todo o processo deve seguir um procedimento bem definido pela WADA. Os passos deste processo são a escolha do atleta para ser testado por uma associação anti-doping, a escolha do momento ideal para recolher o teste, a emissão da solicitação de colheita da amostra pela associação anti-doping responsável pelo caso, a localização do atleta, a colheita da amostra biológica, o acondicionamento e transporte da amostra para o laboratório, o teste da amostra no laboratório, a análise dos resultados com resultados de testes anteriores e a redação do relatório com as informações obtidas através do estudo das amostras (92).

No momento, estas *guidelines* existem apenas para os módulos hematológico e esteróide. No entanto, seria um método a estudar para detetar e controlar a utilização de doping genético.

#### **4. Conclusão**

O doping não é um problema recente. Desde a Antiga Grécia que o Homem sente a necessidade de vencer e, muitos deles, querem atingir esse fim independentemente dos meios para o fazer. Desde o início deste século, com o desenvolvimento das terapias génicas, o doping tomou proporções ainda

maiores, com a possibilidade de modificar o genoma dos atletas e, conseqüentemente, dar-lhes aquilo que lhes faltava para serem excelentes na modalidade que praticam. Apesar de todos os esforços da WADA e das organizações anti-doping mundiais, ainda não existem métodos de detecção fiáveis disponíveis para detetar doping genético. Em 2021, ainda não é possível afirmar que o doping genético não é uma realidade.

Por fim, acredito que a melhor ferramenta para diminuir a utilização de todo e qualquer tipo de doping é pela educação de jovens atletas e, também, de todo o indivíduo envolvente no processo de formação dos atletas, como os treinadores, os fisioterapeutas, os médicos e os dirigentes. Dando a estes jovens toda a informação disponível sobre o doping e, principalmente, os possíveis riscos que a utilização do mesmo pode trazer à saúde do atleta, está-lhes a ser dada a melhor ferramenta de combate ao doping: o conhecimento fundamentado. Obviamente, visto que os programas educativos sobre o doping ainda não são suficientemente valorizados, é necessário encontrar formas científicas de detetar e punir os atletas que violam as regras implementadas pela WADA, através dos controlos anti-doping e das sanções regulamentadas pela WADA.

Como Pierre de Coubertin, o fundador dos Jogos Olímpicos Modernos, disse: “um mundo melhor só poderá ser criado por indivíduos melhores”, física, psicológica e mentalmente.

## 5. Referências Bibliográficas

1. Anti-doping W. Code 2021. 2021;0–119. Available from: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021\\_code.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021_code.pdf)
2. Unal M, Ozer Unal D. Gene doping in sports. *Sports Medicine*. 2004;34(6):357–62.
3. Cantelmo RA, da Silva AP, Mendes-Junior CT, Dorta DJ. Gene doping: Present and future. *European Journal of Sport Science* [Internet]. 2019;0(0):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/17461391.2019.1695952>
4. Holt RIG, Erotokritou-Mulligan I, Sönksen PH. The history of doping and growth hormone abuse in sport. *Growth Hormone and IGF Research*. 2009 Aug;19(4):320–6.
5. Rogol AD, Miller GD, Eichner D. Growth hormone, growth hormone secretagogues, and insulin-like growth factor-1 in sports: prohibited status, therapeutic use exemptions, and analytical detectability. Vol. 9, *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*. Elsevier Ltd; 2019. p. 8–13.
6. International Olympic Committee. 1896 Olympic Games. <https://olympics.com/pt/olympic-games/athens-1896>. 2021.
7. Brzezińska E, Domańska D, Jegier A. Gene doping in sport – Perspectives and risks. *Biology of Sport*. 2014;31(4):251–9.
8. Code WA. 2021 World Anti-Doping Code – Changes from November 2019 to June 2020. 2021;(June 2020).
9. Plara M, Del J. Analysis of doping control test results in individual and team sports from 2003 to 2015. 2020;9:160–9.
10. Morente-Sánchez J, Zabala M. Doping in Sport: A Review of Elite Athletes' Attitudes, Beliefs, and Knowledge. *Sports Medicine*. 2013;43(6):395–411.
11. Gould D. Gene doping: Gene delivery for olympic victory. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2013;76(2):292–8.
12. World Anti-Doping Agency. International Standard Prohibited List. 2021. p. 13–13.
13. Beotra A. Drug Abuse in Sports: An Overview. *Journal of Postgraduate Medicine, Education and Research*. 2013 Jun;47(2):94–8.
14. Birzniece V. Doping in sport: Effects, harm and misconceptions. *Internal Medicine Journal*. 2015;45(3):239–48.
15. Hirsch I. Manual MSD [Internet]. Hipogonadismo Masculino . 2019 [cited 2021 Jul 16]. Available from: <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/profissional/dist%C3%BArbios-geniturin%C3%A1rios/endocrinologia-reprodutiva-masculina-e-dist%C3%BArbios-relacionados/hipogonadismo-masculino>

16. Leder BZ. Optimizing Sequential and Combined Anabolic and Antiresorptive Osteoporosis Therapy. Vol. 2, JBMR Plus. Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 62–8.
17. Bhasin S, Calof OM, Storer TW, Lee ML, Mazer NA, Jasuja R, et al. Drug Insight: testosterone and selective androgen receptor modulators as anabolic therapies for chronic illness and aging.
18. Birzniece V. Doping in sport: Effects, harm and misconceptions. *Internal Medicine Journal*. 2015;45(3):239–48.
19. Ortega V, Genese F. Manual MSD [Internet]. Tratamento Farmacológico da Asma. 2019 [cited 2021 Jul 16]. Available from: [https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/dist%C3%BArios-pulmonares/asma-e-doen%C3%A7as-relacionadas/tratamento-farmacol%C3%B3gico-da-asma#v31727207\\_pt](https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/dist%C3%BArios-pulmonares/asma-e-doen%C3%A7as-relacionadas/tratamento-farmacol%C3%B3gico-da-asma#v31727207_pt)
20. Wannenes F, Magni L, Bonini M, Dimauro I, Caporossi D, Moretti C, et al. In Vitro Effects of Beta-2 Agonists on Skeletal Muscle Differentiation, Hypertrophy, and Atrophy.
21. Sanchis-Gomar F, Lippi G. TELMISARTAN AS METABOLIC MODULATOR: A NEW PERSPECTIVE IN SPORTS DOPING? [Internet]. Available from: [www.nasca-jscr.org](http://www.nasca-jscr.org)
22. Barnes KP, Rainbow CR. Update on Banned Substances 2013. *Sports Health*. 2013 Sep;5(5):442–7.
23. Dušan A. Upotreba diuretika kao doping u sportu Kratak sadržaj. Vol. 64, *Arh.farm.* 2014.
24. Plumb JOM, Otto JM, Grocott MPW. “Blood doping” from Armstrong to prehabilitation: Manipulation of blood to improve performance in athletes and physiological reserve in patients. Vol. 5, *Extreme Physiology and Medicine*. BioMed Central Ltd.; 2016.
25. Wells DJ. Gene doping: Possibilities and practicalities. *Medicine and Sport Science*. 2009;54:166–75.
26. Docherty JR. Pharmacology of stimulants prohibited by the World Anti-Doping Agency (WADA). Vol. 154, *British Journal of Pharmacology*. 2008. p. 606–22.
27. McCartney D, Benson MJ, Desbrow B, Irwin C, Suraev A, McGregor IS. Cannabidiol and Sports Performance: a Narrative Review of Relevant Evidence and Recommendations for Future Research. Vol. 6, *Sports Medicine – Open*. Springer; 2020.
28. Murray RM, Quigley H, Quattrone D, Englund A, Forti M di. Traditional marijuana, high-potency cannabis and synthetic cannabinoids: increasing risk for psychosis.
29. Vernec A, Slack A, Harcourt PR, Budgett R, Duclos M, Kinahan A, et al. Glucocorticoids in elite sport: current status, controversies and innovative management strategies – a narrative review. Vol. 54, *British Journal of Sports Medicine*. BMJ Publishing Group; 2020. p. 8–12.
30. GEPIREMEN A. The World Anti-Doping Code: Truths and Wrongs. *Bezmialem Science* [Internet]. 2018 Nov 7;6(4):301–4. Available from: [http://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article\\_20080/BAS-6-301-En.pdf](http://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_20080/BAS-6-301-En.pdf)

31. Battery L, Solomon A, Gould D. Gene doping: Olympic genes for Olympic dreams. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 2011;104(12):494–500.
32. Fischetto G, Bermon S. From gene engineering to gene modulation and manipulation: Can we prevent or detect gene doping in sports? *Sports Medicine*. 2013;43(10):965–77.
33. Wells DJ. Gene doping: The hype and the reality. *British Journal of Pharmacology*. 2008;154(3):623–31.
34. FDA. DUCORD (HPC Cord Blood) [Internet]. 2019. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/ducord-hpc-cord-blood>
35. FDA. ALLOCORD (HPC Cord Blood) [Internet]. 2019. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/allocord-hpc-cord-blood>
36. FDA. Approved Cellular and Gene Therapy Products [Internet]. 2021. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products>
37. FDA. CLEVECORD (HPC Cord Blood) [Internet]. 2019. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/clevecord-hpc-cord-blood>
38. Fda. ALLOCORD, HPC, Blood Cord [Internet]. Available from: [www.fda.gov/medwatch](http://www.fda.gov/medwatch)
39. Fda, Cber. CLEVECORD, HPC (Hematopoietic Progenitor Cell), Cord Blood [Internet]. Available from: [www.fda.gov/medwatch](http://www.fda.gov/medwatch).
40. Fda, Cber. DUCORD, HPC (Hematopoietic Progenitor Cell), Cord Blood [Internet]. Available from: [www.fda.gov/medwatch](http://www.fda.gov/medwatch).
41. FDA. IMLYGIC [Internet]. 2019 [cited 2021 Mar 17]. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/imlygic-talimogene-laherparepvec>
42. FDA. KYMRIAH [Internet]. 2019 [cited 2021 Mar 17]. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/kymriah-tisagenlecleucel>
43. FDA. LUXTURNA [Internet]. 2018 [cited 2021 Mar 17]. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/luxturna>
44. FDA. MACI [Internet]. 2019 [cited 2021 Mar 17]. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/maci-autologous-cultured-chondrocytes-porcine-collagen-membrane>
45. FDA. ZOLGENSMA [Internet]. 2020 [cited 2021 Mar 17]. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/zolgensma>

46. Fda, Cber. MACI Autologous Cultured Chondrocytes on Porcine Collagen Membrane [Internet]. Available from: [www.MACI.com](http://www.MACI.com)
47. FDA. IMLYGIC [Internet]. Available from: [www.fda.gov/medwatch](http://www.fda.gov/medwatch).
48. Cber, Fda. ZOLGENSMA [Internet]. Available from: [www.fda.gov/medwatch](http://www.fda.gov/medwatch).
49. Cber, Fda. LUXTURNA [Internet]. Available from: [www.fda.gov/medwatch](http://www.fda.gov/medwatch).
50. Cber, Fda. KYMRIAH [Internet]. Available from: [www.fda.gov/medwatch](http://www.fda.gov/medwatch).
51. van der Gronde T, de Hon O, Haisma HJ, Pieters T. Gene doping: An overview and current implications for athletes. *British Journal of Sports Medicine*. 2013;47(11):670–8.
52. Thieme D, Hemmersbach P. Handbook of Experimental Pharmacology: Preface. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2010;195:485–512.
53. Neuberger EWI, Simon P. Gene and Cell Doping: The New Frontier – Beyond Myth or Reality. *Medicine and Sport Science*. 2017;62:91–106.
54. Haisma HJ, de Hon O. Gene doping. *International Journal of Sports Medicine*. 2006;27(4):257–66.
55. WADA. Prohibited List Online [Internet]. Available from: <https://www.wada-ama.org/en/content/what-is-prohibited/prohibited-at-all-times/gene-and-cell-doping>
56. Rogers K. No Title [Internet]. *Encyclopedia Britannica*. 2018 [cited 2021 Mar 15]. Available from: <https://www.britannica.com/science/gene-doping>.
57. López S, Meirelles J, Rayol V, Poralla G, Woldmar N, Fadel B, et al. Gene doping and genomic science in sports: Where are we? *Bioanalysis*. 2020;12(11):801–11.
58. Collins M, Thrasher A, Collins M. Gene therapy : progress and predictions. 2015;
59. Sciences RB, Melo R de, Paiva A. Gene therapy : advances , challenges and perspectives. 2017;15(3):369–75.
60. Pahle J, Walther W, Pahle J, Walther W. Expert Opinion on Biological Therapy Vectors and strategies for nonviral cancer gene therapy Vectors and strategies for nonviral cancer gene therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy* [Internet]. 2016;16(4):443–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1517/14712598.2016.1134480>
61. Wang D, Gao G. STATE-OF-THE-ART HUMAN GENE THERAPY: PART I. GENE DELIVERY TECHNOLOGIES.
62. Manuscript A. *NIH Public Access*. 2014;31(7):397–405.
63. Zhang H, Zhang Y, Yin H. Genome Editing with mRNA Encoding. *Molecular Therapy* [Internet]. 2019;27(4):735–46. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.01.014>
64. Fernández A, Josa S, Montoliu L. A history of genome editing in mammals. *Mammalian Genome*. 2017;0(0):0.
65. Khalil AM. The genome editing revolution : review. 2020;

66. John R, Dhillon MS, Dhillon S. Genetics and the Elite Athlete: Our Understanding in 2020. *Indian Journal of Orthopaedics* [Internet]. 2020;54(3):256–63. Available from: <https://doi.org/10.1007/s43465-020-00056-z>
67. McKanna TA, Toriello H v. Gene Doping: The Hype and the Harm. Vol. 57, *Pediatric Clinics of North America*. 2010. p. 719–27.
68. MIYAMOTO–MIKAMI E, FUKU N. Genetics and Genomics in Sports. *Juntendo Medical Journal*. 2020;66(Suppl.1):72–7.
69. Pokrywka A, Kaliszewski P, Majorczyk E, Acny ZZ. Genes in sport and doping. Vol. 30, *Biology of Sport*. 2013. p. 155–61.
70. Szalata M, Słomski R, Balkó Š, Balkó IVA. Advances in athlete genomics in 2019. Vol. 26, *Trends in Sport Sciences*. University School of Physical Education; 2019. p. 55–61.
71. Jacob J, John Mj, Jaison V, Jain K, Kakkar N. Erythropoietin use and abuse. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2012;16(2):220.
72. Oliveira RS, Collares TF, Smith KR, Collares T v., Seixas FK. The use of genes for performance enhancement: Doping or therapy? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2011;44(12):1194–201.
73. Sonksen P, Holt R, Erotokritou–Mulligan I. Growth hormone doping: a review. *Open Access Journal of Sports Medicine*. 2011;99.
74. Momaya A, Fawal M, Estes R. Performance–Enhancing Substances in Sports: A Review of the Literature. Vol. 45, *Sports Medicine*. Springer International Publishing; 2015. p. 517–31.
75. Papadimitriou ID, Lucia A, Pitsiladis YP, Pushkarev VP, Dyatlov DA, Orekhov EF, et al. ACTN3 R577X and ACE I/D gene variants influence performance in elite sprinters: A multi–cohort study. *BMC Genomics*. 2016 Apr 13;17(1).
76. Garton FC, Houweling PJ, Vukcevic D, Meehan LR, Lee FXZ, Lek M, et al. The Effect of ACTN3 Gene Doping on Skeletal Muscle Performance. *American Journal of Human Genetics* [Internet]. 2018;102(5):845–57. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.03.009>
77. Massidda M, Corrias L, Scorcu M, Vona G, Calò MC. ACTN–3 and ACE genotypes in elite male Italian athletes. *Anthropological Review*. 2012;75(1):51–9.
78. Ginevičiene V, Jakaitiene A, Pranculis A, Milašius K, Tubelis L, Utkus A. AMPD1 rs17602729 is associated with physical performance of sprint and power in elite Lithuanian athletes. *BMC Genetics*. 2014 May 17;15.
79. McCabe K, Collins C. Can Genetics Predict Sports Injury? The Association of the Genes GDF5, AMPD1, COL5A1 and IGF2 on Soccer Player Injury Occurrence. *Sports*. 2018 Mar 5;6(1):21.

80. Zhang J, Liu Z, Li Y, You Q, Yang J, Jin Y, et al. FGF2: A key regulator augmenting tendon-to-bone healing and cartilage repair. Vol. 15, *Regenerative Medicine*. Future Medicine Ltd.; 2020. p. 2129–42.
81. Wang C, Li H, Kang C, Wu B, Liu H. Association of polymorphisms rs1800012 in COL1A1 with sports-related tendon and ligament injuries: a meta-analysis [Internet]. Vol. 8, *Oncotarget*. 2017. Available from: [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)
82. Miyamoto-Mikami E, Miyamoto N, Kumagai H, Hirata K, Kikuchi N, Zempo H, et al. COL5A1 rs12722 polymorphism is not associated with passive muscle stiffness and sports-related muscle injury in Japanese athletes. *BMC Medical Genetics*. 2019 Dec 2;20(1).
83. Briški N, Vrgoč G, Knjaz D, Janković S, Ivković A, Pećina M, et al. Association of the matrix metalloproteinase 3 (MMP3) single nucleotide polymorphisms with tendinopathies: case-control study in high-level athletes. *International Orthopaedics*. 2021 May 1;45(5):1163–8.
84. Brazier J, Antrobus M, Stebbings GK, Day SH, Heffernan SM, Cross MJ, et al. Tendon and Ligament Injuries in Elite Rugby: The Potential Genetic Influence. *Sports*. 2019 Jun 4;7(6):138.
85. Lulińska-Kuklik E, Laguette MJN, Moska W, Weber-Rajek M, Ficek K, Puchala R, et al. Are TNC gene variants associated with anterior cruciate ligament rupture susceptibility? *Journal of Science and Medicine in Sport*. 2019 Apr 1;22(4):408–12.
86. Sharifi M, Hamedinia MR, Hosseini-Kakhak SA. The Effect of an Exhaustive Aerobic, Anaerobic and Resistance Exercise on Serotonin, Beta-endorphin and BDNF in Students. *Physical Education of Students*. 2018 Sep 30;22(5):272–7.
87. Brunelli A, Dimauro I, Sgrò P, Emerenziani G, Magi F, Baldari C, et al. Acute exercise modulates BDNF and pro-BDNF protein content in immune cells. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2012 Oct;44(10):1871–80.
88. Neuberger EWI, Simon P. Gene and Cell Doping: The New Frontier – Beyond Myth or Reality. *Medicine and Sport Science*. 2017;62:91–106.
89. de Boer EN, van der Wouden PE, Johansson LF, van Diemen CC, Haisma HJ. A next-generation sequencing method for gene doping detection that distinguishes low levels of plasmid DNA against a background of genomic DNA. *Gene Therapy* [Internet]. 2019;26(7–8):338–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41434-019-0091-6>
90. Maniego J, Pesko B, Habershon-Butcher J, Huggett J, Taylor P, Scarth J, et al. Screening for gene doping transgenes in horses via the use of massively parallel sequencing. *Gene Therapy*. 2021;
91. Paßreiter A, Thomas A, Grogna N, Delahaut P, Thevis M. First Steps toward Uncovering Gene Doping with CRISPR/Cas by Identifying SpCas9 in Plasma via HPLC-HRMS/MS. *Analytical Chemistry*. 2020 Dec 15;92(24):16322–8.
92. WADA. Athlete Biological Passport Operating Guidelines. 2019.