

REVISIÓN DEL ESTADO DEL CONOCIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DEL DOPAJE GENÉTICO EN DEPORTISTAS DE ÉLITE

REVIEW OF THE STATE OF KNOWLEDGE FOR THE DETECTION OF GENE DOPING IN ELITE ATHLETES

Trabajo Fin de Grado. Biotecnología

Autora: Cristina Lafuente Torres

Director: Javier Miana Mena



ÍNDICE

1. Resumen/ Abstract	1
2. Introducción	2
2.1 Deporte actual.....	2
2.2 Agencia Mundial Antidopaje (WADA).....	2
3. Dopaje convencional	4
4. Terapia génica	5
5. Dopaje genético	7
5.1 Genes candidatos.....	8
5.2 Detección del dopaje genético.....	10
5.2.1 Directos.....	11
5.2.2 Indirectos.....	12
5.3 Ensayos de laboratorio para la detección de dopaje genético.....	12
5.3.1 EPO.....	12
5.3.2 IGF-1.....	13
5.3.3 Antagonistas de la miostatina.....	14
5.3.4 Antagonistas del gen PPAR-delta.....	14
5.4 Riesgos.....	15
6. Búsqueda bibliográfica	17
Discusión.....	19
7. Conclusión/ Conclusion	20
8. Valoración personal	21
9. Bibliografía	22

1. Resumen

El dopaje es un método prohibido que está en auge a nivel mundial entre los deportistas. La Agencia Mundial Antidopaje pretende erradicarlo debido a sus riesgos en la salud. Concretamente, el dopaje genético se define como el uso no terapéutico de genes, elementos génicos o células que tienen la capacidad de aumentar el rendimiento atlético. Varios genes relacionados con el rendimiento deportivo han sido propuestos: EPO, HIF-1, IGF-1, GH, miostatina, VEGF, PPAR-delta, ACE, endorfina, PEPCK-C y ACTN3. Se pueden introducir en el organismo de manera directa, o modificando uno de estos genes endógenos *in vitro* o bloqueando el gen endógeno.

Este trabajo pretende recopilar la información referida a los métodos de detección del dopaje genético, entre los que destacan la detección mediante mediciones del nivel plasmático, diferencias entre intrones, modificaciones postraduccionales y cambios en el proteoma. Para ello se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica sobre ensayos realizados para la detección del dopaje genético. La mayor parte de los estudios incluidos parecen indicar que todavía queda mucha investigación pendiente para lograr detectar este tipo de dopaje en los controles antidopaje certificados. Para la búsqueda se utilizaron las bases de datos Web of Science, Scopus, PubMed y World Wide Science, y los buscadores de AlcorZey Scholar Google, y tras la búsqueda se incluyeron un total de 47 artículos.

Palabras clave

Dopaje genético; Transferencia génica; Dopaje deportivo

1. Abstract

Doping is a prohibited method that is booming worldwide among athletes. The World Anti-Doping Agency intends to eradicate it due to its health risks. Specifically, genetic doping is defined as the non-therapeutic use of genes, genetic elements or cells that have the capacity to improve athletic performance. Several genes related to sports performance have been proposed: EPO, HIF-1, IGF-1, GH, myostatin, VEGF, PPAR-delta, ACE, endorphin, PEPCK-C and ACTN3. They can be introduced into the body directly, or by modifying one of these endogenous genes *in vitro* or by blocking the endogenous gene.

This project aims to compile the information referring to the detection methods of genetic doping, among which the detection by measurements of plasma level, differences between introns, post-translational modifications and changes in the proteome are prominent. For this purpose, a bibliographic review has been carried out on tests performed to detect genetic doping. Most of the included studies seem to indicate that there is still a lot of research pending to detect this type of doping in certified anti-doping controls. The Web of Science, Scopus, PubMed and World Wide Science databases, and AlcorZe and Scholar Google search engines were used for the search, and a total of 47 articles were included.

Key words

Gene doping; Transgene; Doping detection; Doping control; Gene therapy

2. Introducción

2.1 Deporte actual

Es sabido por todos que la práctica habitual de ejercicio mejora la calidad de vida de los individuos. Tanto es así, que la Comisión Europea reclama esfuerzos para promover el deporte y alerta de los peligros que conlleva la inactividad física, ya que aumenta la tasa de mortalidad a nivel mundial en un 20-30% y el riesgo de padecer enfermedades del tipo cardiovasculares, diabetes o cáncer (1). Pero en el presente trabajo no nos centraremos en el deporte amateur, sino que vamos a profundizar en la práctica fraudulenta del dopaje realizado en el ámbito del deporte de élite.

Así pues, se pueden diferenciar 2 grupos de entre los deportistas, el primero hace mención a aquellos que realizan una actividad física amateur, con el simple objetivo de divertirse, mientras que el segundo grupo son los deportistas de élite, que compiten buscando las mejores clasificaciones. Estos últimos se denominan de alto rendimiento, y se dedican de manera profesional a entrenar y competir. Es el Consejo Superior de Deportes quien les da el título acreditativo de deportistas de alto rendimiento. Así, el 12 de junio de 2018 se acreditaron 536 nuevos deportistas de élite en España (2).

El dopaje es una técnica totalmente injustificada, pero algunos deportistas pueden sentirse muy presionados desde el punto de vista social, económico, competitivo, etc... de manera que recurren a la práctica de este fraude, pudiendo poner en riesgo su salud para que sus objetivos se cumplan.

El dopaje queda definido por la AEPSAD (Agencia Estatal Antidopaje) como “la presencia de una sustancia prohibida [...] en la muestra biológica de un deportista, el uso de una sustancia o método prohibido, negarse a pasar un control antidopaje o eludirlo, o el incumplimiento de la localización del deportista” (3). El dopaje deportivo no es algo actual, si no que ya se comenzó a reconocer en el año 776 a.C. con el inicio de los Juegos Olímpicos de la Antigua Grecia, cuando se suministraban estimulantes naturales a los atletas (4).

2.2 Agencia Mundial Antidopaje (WADA)

Esta agencia surgió en 1999 para que los deportistas pudieran participar en un ambiente libre de dopajes y poder estar en igualdad de condiciones. Entre sus funciones está la de acreditar los laboratorios mundiales antidopaje, y crear una lista de sustancias y métodos prohibidos que se revisan periódicamente, en las que se pueden diferenciar según si las pruebas se realizan en competición, en deportes puntuales o en general en cualquier ámbito y modalidad (5). A continuación, se enumeran las sustancias y métodos que siempre están prohibidos por la WADA:

- Agentes anabolizantes: aumentan los procesos anabólicos del organismo estimulando la síntesis proteica, como por ejemplo la testosterona (aumenta la resistencia) (5) (6).
- Hormonas peptídicas, factores de crecimiento y relacionados: estimulan las glándulas endocrinas, como la corticotropina (produce euforia), la eritropoyetina/ EPO (aumenta la cantidad de eritrocitos), la hormona del crecimiento (aumenta la masa muscular) o los glucocorticoides (aumentan el umbral de dolor) (5) (6).

- Agonista beta-2-adrenérgico: disminuye el ritmo cardíaco, interesante en deportes de precisión como el tiro con arco (5) (6).
- Moduladores hormonales y metabólicos: regulan el metabolismo muscular (5) (6).
- Diuréticos y agentes enmascarantes: regulan la masa corporal provocando la salida de agua de las células y perfilando el músculo (5) (6).
- Manipulación de la sangre y sus componentes (5).
- Manipulación química y física: como modificar la orina mediante proteasas (impiden detectar la EPO) (5) (6).
- Dopaje genético: como las células modificadas genéticamente (5). Es el método que profundizaremos en este trabajo.

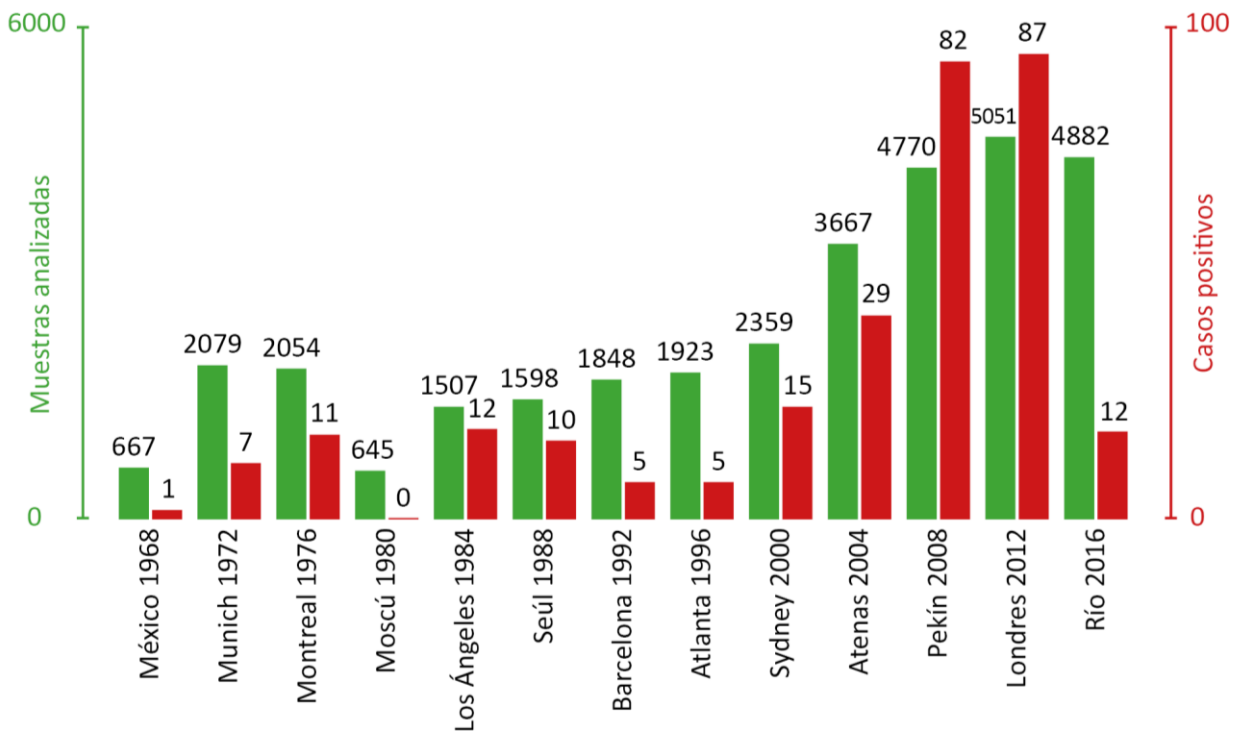
Los medicamentos que contengan alguna de estas sustancias deberán tener una autorización de uso terapéutico (AUT) para poder ser utilizado por el deportista (5). Por ejemplo, solamente en España en 2017 se aprobaron 259 AUTs (3).

El mayor porcentaje de dopaje a nivel mundial en 2017, un 44% del total, proviene de los anabolizantes, y le siguen diuréticos y agentes enmascarantes con un 15%, un 14% estimulantes, y por debajo quedan moduladores hormonales (8%), glucocorticoides (5%), cannabinoides (4%), agonistas beta-2- adrenérgicos (4%), hormonas peptídicas (3%), narcóticos (2%), beta bloqueantes (0,3%), y la manipulación física y química (0,02%), mientras que el alcohol y la manipulación de sangre se quedaron en 0% (5).

En la misma línea que la WADA se encuentra a nivel nacional la AEPSAD (Agencia Estatal Antidopaje), y sigue los mismos objetivos que WADA, ya que esta última reúne todos los Estados que realicen controles antidopaje (3). Según ellas, los efectos secundarios del uso del dopaje son, entre otros, problemas de crecimiento, tumores hepáticos, hipertensión, hipercoagulación, y agresividad, además en hombres se puede encontrar cáncer de mama, hipogonadismo, o atrofia de testículos, y en mujeres se incrementa el vello, se engrosa la voz y hay problemas de menstruación (3).

Actualmente ambas agencias realizan estudios sobre el dopaje en dos entornos: el convencional y el genético. Ambas formas de dopaje pretenden mejorar el rendimiento del individuo en áreas como la respiración, fuerza, resistencia, elasticidad, concentración y potencia. Sin embargo, no siguen el mismo procedimiento, ya que el dopaje convencional utiliza sustancias que son por sí solas las causantes de la modificación del metabolismo, a diferencia del dopaje genético que es indirectamente el efector de estas modificaciones, ya que se introduce un gen modificado en el organismo y es éste el efector (5).

Analisis del dopaje en los Juegos Olímpicos



Gráfica 1. Análisis de los casos positivos de dopaje según los Juegos Olímpicos cuatrienales de verano desde el inicio del estudio hasta la actualidad, datos obtenidos del COI y actualizados en febrero 2018 (7).

3. Dopaje convencional

Primero vamos a profundizar en este tipo de dopaje, que es el más usado a nivel mundial desde hace décadas hasta la actualidad. Se observó por primera vez a nivel deportivo el inconveniente de usar estos estimulantes durante el Tour de Francia de 1967 con la muerte súbita de un ciclista, causada por el consumo de anfetaminas (sustancia ilegal), y a partir de entonces se tomó especial precaución en el deporte de élite mediante los controles antidopaje creados por la WADA, que se impulsaron fundamentalmente en los Juegos Olímpicos (Gráfica 1). Desde el año siguiente, 1968, hasta la actualidad se llevan rigurosos controles para evitar los positivos y disminuir el número de deportistas dopados. Desde 1968, momento en el que se realizaron por primera vez controles antidopaje en unas Olimpiadas, hasta la actualidad, la WADA ha luchado por minimizar las prácticas de dopaje entre los deportistas de élite.

Los deportes donde más abundan las sustancias nombradas anteriormente son la halterofilia, natación, ciclismo y fútbol, aunque está presente en todas las modalidades deportivas sin excepción, incluso a nivel no profesional también se utiliza el dopaje (3). Por ejemplo, el año pasado se detectaron en España 27 casos positivos en ciclismo (de 990 muestras analizadas), seguido de atletismo con 4 positivos de 519, kickboxing con 3, fútbol, fútbol americano y remo con 2 cada uno, y automovilismo, béisbol, deportes de discapacidad intelectual, deportes para ciegos, esgrima,

halterofilia, karate, squash y triathlon con un positivo; el resto de deportes salieron impunes (3). El total de análisis se muestra en la tabla 1.

En los análisis de muestras de sangre no hubo ningún caso positivo, sólo en muestras de orina, y este valor representa un 3.3% del total, un dato muy representativo cuando hablamos de métodos prohibidos en el deporte, donde los deportistas no están cumpliendo con las normas establecidas.

A nivel mundial en 2017 la WADA reportó también los datos de todos los laboratorios acreditados para los análisis antidopaje, y concluyeron lo siguiente: aumentó un 7,1% la cantidad de muestras examinadas, pasando de 300.565 en 2016 a 322.050 en 2017, y disminuyó el número de positivos pasando de 1,60% en 2016 a 1,43% en 2017 (5).

	Orina				Sangre			
	En competición		Fuera de competición		En competición		Fuera de competición	
	Muestras analizadas	Casos positivos	Muestras analizadas	Casos positivos	Muestras analizadas	Casos positivos	Muestras analizadas	Casos positivos
Nacional	1721	34	781	2	97	0	135	0
Internacional	775	23	111	1	24	0	29	0
Total muestras analizadas	3388				285			
Total casos positivos	60				0			

Tabla 1. Análisis del Laboratorio de Control de Dopaje de la AEPSAD en 2017 (entre mayo y diciembre). Número de ensayos efectuados y casos positivos en dopaje en las muestras de orina y sangre, en competición y fuera, a nivel nacional de las pruebas nacionales e internacionales (3).

Dentro de estas cifras no están incluidos los casos de dopaje genético, ya que todavía no está suficientemente desarrollado como para poder realizar las pruebas pertinentes de control antidopaje, aunque sí que se sospecha de su uso en deportistas de élite ya que diversos entrenadores han recurrido a científicos que se encargan de estudiar la terapia génica relacionada para pedir información sobre la técnica e intentar comprarla (8).

4. Terapia génica

Es un tratamiento utilizado para curar las enfermedades genéticas que hasta ahora sólo se había logrado paliar sus síntomas, y se consigue mediante la introducción de un gen artificial y exógeno que restablecerá la función del gen mutado del paciente. Esta técnica, hasta ahora terapéutica, podría estar usándose también con fines de dopaje deportivo. En este sentido, las estrategias que sigue la terapia génica y que podrían aprovecharse en el mundo del deporte serían:

1. Introducir directamente el gen de interés no defectuoso en el organismo.

2. Extraer el tejido defectuoso y modificarlo *in vitro* y reintroducirlo reparado. En este caso se necesitará de vectores para su reintroducción, que puede ser por inyección directa al núcleo del DNA o RNA, por bombardeo de partículas a alta velocidad que contienen el gen, por vectores plasmídicos mediante un virus, que es lo más utilizado por su eficacia.

Los vectores virales son virus modificados (ni infecciosos ni patógenos) para poder introducir el gen de interés en la célula hospedadora de manera específica, y existen 5 grupos fundamentales (9):

- Retrovirus: posee 2 copias de ssRNA que pasarán a dsDNA mediante la retrotranscriptasa para integrarse en el genoma huésped, es pequeño, no lisa las células e infectan cualquier célula de mamífero, pero tiene poca capacidad de inserto. Dentro de este grupo se encuentra el Lentivirus, es también ssRNA y no requiere división celular para acceder al genoma.
- Adenovirus: es dsDNA se produce en grandes cantidades, amplio rango de actuación, no es patógeno.
- Adenoasociados: es ssDNA, no es patógeno ni inmunogénico, de fácil manejo
- Herpesvirus: es dsDNA con gran capacidad de inserto y es muy estable en el huésped pero es muy grande
- Vaccinia virus: es dsDNA, también es grande y con gran capacidad de inserto, no es patógeno pero produce alta respuesta inmune.

Es necesario que todos estos vectores sean estables en el huésped, específicos, regulables, que puedan penetrar tanto células procariontas como eucariotas, que no generen respuesta inmune ni efectos secundarios (9).

3. Bloquear oncogenes propios que producen cáncer: se han conseguido grandes avances mediante los virus y derivados, pero también han surgido problemas relacionados con la seguridad de introducir virus en el organismo al poder ocasionar respuestas inmunes. Así pues, se han desarrollado otras técnicas óptimas basadas en el DNA, que se asemejan a la maquinaria celular, como la del bloqueo de genes endógenos, y esto es posible gracias al uso en terapia génica de pequeños ácidos nucleicos exógenos que silencian la expresión de estos genes a nivel transcripcional o post-transcripcional (10). Un ejemplo son los RNAs interferentes (RNAi).

Como hemos dicho anteriormente, la terapia génica, y en concreto la edición génica también puede ser utilizada en otros campos de la biología como es la mejora humana, lo que ya no forma parte de la terapia génica puesto que no pretende una cura sino simplemente una mejora, es decir, potenciar al máximo las características de un individuo para conseguir un mejor desarrollo físico. La eugenesia es la ciencia centrada en la mejora del ser humano, se basa en la modificación genética mediante la recombinación de DNA, la clonación humana, la transgénesis o mutaciones puntuales, entre otras. También se puede aplicar en el campo del deporte, donde cada vez se ponen en práctica más procedimientos para conseguir altos rendimientos físicos para el deportista mediante el dopaje genético, objeto de estudio en este Trabajo de Fin de Grado.

5. Dopaje genético

Se define según la WADA como el “uso no terapéutico de genes, elementos génicos o células que tienen la capacidad de aumentar el rendimiento atlético”. Por tanto, al igual que las otras sustancias nombradas anteriormente también pertenece al grupo de métodos prohibidos desde que se inició su estudio en el año 2003. En este sentido se han realizado estudios sobre el dopaje genético. Así, en uno de los primeros trabajos dentro de este campo, realizado en 2004 se encontró que había una relación directa entre la modificación de un gen del ratón con la mejora de la resistencia muscular: el gen que codifica el PPAR-delta (receptor activado por proliferadores peroxisomales). Realizado en el Instituto Médico Howard Hughes (HHMI), el proceso de modificación de este gen en ratones llevó al resultado de una mejora del doble de la resistencia habitual del animal encarrera (de 900 m a 1800m) ya que incrementaba la capacidad muscular dado que el gen PPAR-delta aumentaba la proporción de fibras musculares lentas. A este animal lo denominaron “ratón de maratón” (11).

No está comprobado que a día de hoy los deportistas utilicen el dopaje genético porque no se han hecho controles antidopaje genético, pero la WADA prefiere adelantarse a los hechos y actuar antes de que sea realidad en el deporte de élite haciendo estudios para su detección en laboratorios mundiales (12).

El dopaje genético se utilizaría principalmente para que los beneficios se reflejen a largo plazo, sin tener que depender de dosis cada poco tiempo.

Dentro de los objetivos del dopaje genético estarían, en primer lugar, aumentar el rendimiento del músculo (aumento de fuerza, resistencia a la fatiga, etc...). El hecho de trabajar con este tejido como órgano diana tiene muchas ventajas ya que es muy abundante y tiene una sencilla accesibilidad a la hora de administrar vectores. Como veremos más adelante, los genes nombrados en el siguiente apartado tienen como diana el músculo en su expresión proteica (12). Las técnicas más utilizadas en los estudios realizados es el uso de vectores víricos, pero también está en auge la introducción directa de DNA plasmídico, que normalmente se introduce vía intramuscular, ya que la administración intravenosa que se ha experimentado en animales requiere mucho volumen y muchas inyecciones. Se debe aumentar la dosis de toma cuanto mayor es el organismo en cuestión, ya que los estudios varían desde ratones hasta primates (12).

Un segundo objetivo sería conseguir una rápida y eficaz reparación física tras una lesión, algo esencial en el deporte de la que se encarga la terapia génica. Para este objetivo los deportistas podrían utilizar el dopaje genético ya que se busca una mejora en los genes implicados en este proceso de reparación del hueso, ligamento, tendón o cartílago (12). Para el desarrollo del hueso se activan los genes que generan una diferenciación desde las células mesenquimáticas a osteoblastos, *in vivo* mediante la introducción del gen de interés por vectores rAAV (virus adeno-asociados) o por electroporación (se aumenta la permeabilidad de la membrana con un campo eléctrico para acceder al interior celular). En un experimento se demostró que los factores de crecimiento introducidos de manera exógena en animales consiguieron mejorar su tasa de curación frente a las fracturas, pero su uso era limitado porque tenían una vida media muy corta y se necesitaban métodos muy sofisticados para esta terapia (13). Sin embargo, hay menos ensayos científicos volcados en estudiar la recuperación en ligamentos, tendones o cartílagos ya que los dos primeros tienen dificultad para curarse espontáneamente y se pueden lesionar fácilmente durante el deporte, mientras que el

cartílago suele sufrir daños cuando hay una lesión deportiva, y como no es un tejido vascularizado no se puede curar por sí solo (14).

5.1 Genes candidatos

El triunfo de un atleta está condicionado tanto por su ambiente como por su genética: el ambiente lo guía el clima, la salud física, la dieta, la biomecánica y el entrenamiento, mientras que la genética viene ya determinada y no es un factor externo. Los genes del organismo modulan distintas funciones, de entre los relacionados con el rendimiento deportivo, hay reconocidos actualmente más de 200. Pero por falta de ensayos clínicos no todos ellos se pueden utilizar para reintroducirlos en el organismo de forma recombinante como hace el dopaje genético, así que la cifra de genes candidatos para este método se reduce considerablemente.

Entre los genes que mejoren el rendimiento interesaría, por ejemplo, modificar aquellos relacionados con la captación de oxígeno y la fatiga en los deportes que requieren mucha resistencia física como son la natación de larga distancia o las maratones (deportes aerobios). Las carreras de velocidad o la halterofilia (deportes anaerobios) son otros ejemplos de deportes explosivos que exigen mucha potencia muscular, por lo que buscarán genes que aumenten su masa muscular, e incluso disminuir el tiempo de recuperación muscular tras una lesión. Por tanto, cada deporte y modalidad tendrá sus objetivos específicos (15).

En la tabla 2 se muestran los genes estudiados por los laboratorios antidopaje hasta el momento, que tienen repercusiones en las funciones celulares relacionadas con el músculo y la respiración fundamentalmente (16). En dicha tabla se muestran las respuestas esperadas, es decir, cómo se alcanzarían los objetivos marcados del uso del dopaje genético en un tejido. Un efecto beneficioso en un deportista es aquel que hace mejorar su rendimiento, es decir, aumenta su resistencia al dolor, a la fatiga, incrementa su fuerza, potencia y masa muscular.

Por ejemplo, la endorfina disminuye el dolor, por lo que se puede exprimir más el cuerpo hasta sus límites físicos sin que el cerebro frene al organismo. Así, si se incrementa el umbral del dolor durante el deporte, se puede rendir más y obtener mejores marcas (12). Mediante terapia génica también se ha conseguido aliviar el dolor crónico bloqueando nervios dañados utilizando los genes que codifican proteínas analgésicas como son el ácido glutámico descarboxilasa (GAD), preproencefalina e interleucina 4 (IL-4). En 2003, se realizó un estudio con roedores para verificar estos hechos: para la transfección del gen de interés se usaron tanto vectores plasmídicos como virales, y entre estos últimos el mejor aspirante fue el virus del herpes simple (rHSV). Éste contenía DNA complementario para GAD, preproencefalina e IL-4, y al introducirlo en la célula huésped se consiguió expresar localizadamente el transgen y reducir la respuesta al dolor crónico, neuropático (del sistema nervioso) y debido a un cáncer de hueso (17).

Gen de interés	Respuesta fisiológica esperada	Efectos adversos
EPO	Estimula la producción de glóbulos rojos que aumenta la oxigenación de sangre Aumenta la resistencia en un 20% (18)	Aumenta la viscosidad sanguínea e hipertensión Insuficiencia cardíaca Fuerte respuesta inmune
HIF-1	Regula la transcripción en elementos de respuesta a hipoxia (EPO, VEGF) Estimula la glucólisis, angiogénesis y eritropoyesis Aumenta la resistencia	Aumenta la viscosidad sanguínea e hipertensión Neoplasia
IGF-1/GH	Regula el crecimiento y desarrollo celular (IGF-I) Aumenta la lipólisis, la síntesis de proteínas y la glucogenólisis (GH) Aumenta la fuerza y masa muscular Acelera la regeneración tisular Modula la respuesta inmune	Acromegalia y cardiomegalia Resistencia a insulina y diabetes Hipertensión intracraneal Retención de líquidos Dolor articular y muscular (osteoporosis)
Miostatina	Regula negativamente el crecimiento y diferenciación de las células musculares Disminuye la fuerza y masa muscular	Disminuyen las funciones cardíacas y respiratorias Daño a ligamentos, tendones y huesos
VEGF	Estimula angiogénesis y vasculogénesis Inhibe la apoptosis Aumenta la resistencia	Neoplasia Respuesta inmune
PPAR delta	Regula la producción de peroxisomas: regula la oxidación de ácidos grasos y aumenta la actividad mitocondrial y la captación muscular de glucosa Mejora las fibras musculares lentas y disminuye las fibras musculares rápidas* Disminuye cansancio Aumenta la velocidad y resistencia en un 67% (19)	Sobreexpresión de hormonas sexuales
ACE	Regula presión sanguínea ajustando nivel de angiotensina II y aumenta la proporción de fibras musculares lentas Aumenta la fuerza y resistencia	Angioedema
Endorfina	Disminuye dolor y cansancio Aumenta la resistencia	Riesgo de hipervolemia Muerte súbita
PEPCK-C	Regula glucogenogénesis y ciclo de Krebs Aumenta la resistencia	Hiperglicidemia
ACTN3 (20)	Aumenta la proporción de fibras musculares rápidas y estimula su metabolismo de glucosa Disminuye cansancio Aumenta la fuerza	Muerte súbita

Tabla 2. Genes y sus funciones y efectos adversos utilizados en los controles para el dopaje genético. Abreviaciones: EPO, eritropoyetina; HIF, factor inducible por hipoxia; IGF-1 factor de crecimiento insulínico tipo I; GH, hormona de crecimiento; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; PPAR delta, receptor activado por proliferadoresperoxisomales; ACE, enzima convertidora de angiotensina; PEPCK-C, fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa; ACTN3, alfa-actinina 3.

** Las fibras musculares rápidas están relacionadas con la fuerza explosiva y la velocidad mientras que las fibras lentas lo hacen en resistencia frente a fatiga.*

Otra sustancia muy utilizada a nivel mundial con fines terapéuticos es la hormona de crecimiento, pero además en el mundo del deporte también es un recurso habitual desde hace más de 30 años. El beneficio de este nuevo método innovador es que se puede usar toda la genética disponible para proveer esta sustancia sin tener que obtenerla directamente de un individuo, es decir, antes se obtenía sólo mediante la extracción de la hipófisis de personas fallecidas y por ello era un método muy costoso y tenía pues un suministro muy limitado, pero hoy en día se puede recurrir a la biología molecular para su obtención (5).

El factor de crecimiento insulínico tipo I aumenta la fuerza y masa muscular, la lipólisis y la síntesis de proteínas (tabla 2), y mejora la calidad del músculo (21). En ratón se vio que tras incorporar cDNA del gen IGF-1 mediante un virus adeno-asociado en el músculo, se producía hipertrofia muscular, neovascularización (formación de nuevos vasos sanguíneos) y una transición de las fibras musculares rápidas a las lentas. Tras realizar una prueba de esfuerzo de natación en estos animales, se observó que triplicaban el tiempo de resistencia a la fatiga (22).

No obstante, no hay que olvidar que el uso de estos genes candidatos (tabla 2) tiene el riesgo de producir efectos secundarios en el organismo: el caso de hipertensión es consecuencia de un aumento del nivel de eritrocitos en sangre, el de acromegalia por la diferenciación celular, el de muerte súbita causa de ignorar el dolor y por forzar los órganos al máximo, y que se genere una respuesta inmune se debe principalmente a que el organismo entiende como ajeno el nuevo gen introducido, e intenta destruirlo, por lo que es esencial que las proteínas que se expresan de manera artificial sean lo más similares a la endógena para que no se de esta reacción adversa.

5.2 Detección del dopaje genético

La detección se basa en estudiar las diferencias entre un genoma normal y uno modificado mediante pruebas moleculares. Para ello se extrae el material genético (DNA o RNA) de muestras del tejido o de sangre del individuo y se amplifica mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o su variante PCR con retrotranscriptasa. El producto de amplificación contendrá las secuencias de interés que se estudian mediante polimorfismos de un único nucleótido (SNPs), sondas, biosensores, marcadores, u otras técnicas moleculares (10).

No hay ningún método certificado por la WADA para la detección de dopaje genético a día de hoy, pero hay varios estudios enfocados en ello. Cualquier método existente debe ser específico, así pues, quizá deba surgir un método para cada tipo de proteína modificada. Además, debe proporcionar resultados relativamente rápidos, es decir, que se pueda estudiar un caso de este tipo en semanas, para que no se alargue el proceso y se pueda juzgar al atleta pocotiempos después de su infracción. También debe dar resultados de confianza, sin que surjan posibles falsos positivos. Los métodos de detección han de estar al alcance de todos los laboratorios, y por tanto, fáciles de usar y económicamente rentables para poder llevarlos a cabo a nivel mundial.

Podemos hacer una división simple entre los métodos directos e indirectos. Los primeros estudian la sustancia como tal mientras que los segundos lo hacen con su respuesta en el organismo. Citamos los métodos a continuación:

5.2.1 Métodos Directos

- Nivel plasmático: se hace una extracción de sangre y se lleva a cabo una electroforesis (en gel, en matriz porosa o en disolución) para separar las proteínas del plasma en un campo eléctrico por diferencia de masa, siendo las más pequeñas las que eluyen antes. Sin embargo, no es un buen método de detección de dopaje genético ya que hay muchas proteínas que están en niveles muy inferiores a los detectables y las variaciones fisiológicas en estos niveles pueden dar falsos resultados. Para el caso por ejemplo de la hormona de crecimiento o la eritropoyetina sí que podría usarse debido a las diferentes isoformas que tiene la proteína, ya que su proporción cambiará cuando se introduzca la proteína exógena y modifique alguna isoforma de la endógena (23).
 - Biopsia: se extrae parte de un tejido y el método dependerá de éste. Así se pueden ver los virus o genes transferidos exógenos en el atleta, el problema es que es muy invasivo, y ningún atleta está dispuesto a realizarla por sus repercusiones fisiológicas, así que se requieren otros que se basen en la sangre, orina, saliva o similar (24).
 - Virus: se pueden detectar en la sangre, se amplifica bien por PCR para detectar DNA o RNA o con otros métodos para detectar proteínas virales. Dependerá dónde esté el virus modificado para que su presencia varíe de tiempo, en la saliva sólo están varios días mientras que en la orina son semanas. Sin embargo, esto podría llevar a falsos positivos si este atleta está infectado del virus natural y se piensa que se ha dopado genéticamente con el mismo virus modificado (15).
 - Intrones: son regiones de DNA no codificantes que se pierden antes de la traducción genética. El DNA complementario o cDNA carece de intrones, a diferencia del DNA genómico, por lo que esta diferencia se puede visualizar mediante una amplificación por PCR sabiendo que normalmente el material genético usado para el dopaje genético es cDNA. En el caso de que sean genes que posean intrones será más difícil usar una PCR porque se da el splicing alternativo que generará distintas isoformas de la proteína. En conclusión, se puede utilizar como detección, pero pronto se buscará un dopaje basado en el DNA genómico para que no sirva el método de la PCR con intrones (15).
- La ACE o enzima convertidora de angiotensina I regula la conversión de angiotensina I a angiotensina II que aumenta la vasoconstricción y por ende la presión arterial. En 2005 se realizó un estudio en deportistas caucásicos sobre la detección del dopaje genético utilizando los polimorfismos existentes en el gen ACE y sus dos alelos I (insertion) y D (deletion), que se diferenciaban por la presencia o ausencia, respectivamente, de un fragmento de 287pb en un intrón del gen de la ACE. Concluyeron que había una relación entre la capacidad atlética y el genotipo del gen de la ACE en deportistas caucásicos, pero no entre atletas kenianos. La inserción se asoció a una menor actividad de ACE en el suero y tejido, que se observó en atletas de resistencia mientras que la deleción se asoció a deportistas de velocidad y de fuerza (25).
- Modificaciones postraduccionales: son esenciales para tener proteínas funcionales. Como cada tipo celular tiene su propia modificación, se pueden distinguir las proteínas endógenas de las modificadas mediante isoelectroenfoque (electroforesis para separar moléculas cargadas). El problema surge cuando el virus tiene como diana moléculas muy específicas (26).

- Código de barras del DNA: es una biblioteca que almacena la información genética en forma de DNA de todos los taxones conocidos hasta el momento. Si se introducen aquí los productos génicos modificados se puede ayudar a la detección mediante PCR, pero los de dopaje no suelen tener un código de barras (27).

5.2.2. Métodos Indirectos

- Reacción inmune: es la activación del sistema inmune del organismo con la presencia de antígenos, y su posterior cascada bioquímica. Los virus, vectores plasmídicos o proteínas modificadas son agentes exógenos, el organismo los reconoce como extraños e inicia esta reacción inmune en el hospedador. Al igual que antes surge el problema de que es difícil distinguir si la reacción inmune es causada por un virus natural del que está infectado el atleta o si es un virus dopante modificado (26).
- Cambios en el proteoma: el uso del dopaje puede cambiar la transcripción de otras proteínas a su vez, así que al comparar los niveles de proteína y la tasa de transcripción se puede encontrar un resultado fiable, pero queda el riesgo de tener un falso positivo o falso negativo cuando se les juzga a los atletas como dopados cuando en realidad solo ha sido este cambio en el proteoma o transcriptoma la consecuencia de una lesión o modificaciones en los entrenamientos, simplemente (28).

En resumen, los métodos de detección del dopaje genético son aún poco precisos, y por otro lado surgen falsos positivos en las pruebas, por lo que hay que verificar bien cada método según en qué se estudie y después poder aplicarlo al atleta. Es por esto que puede haber más métodos en desarrollo, pero no será hasta su verificación completa por parte de los laboratorios antidopaje, es decir, que se puedan testar en los controles antidopaje como fiables, cuando por fin se hagan públicos para todo el mundo (29).

5.3 Ensayos de laboratorio para la detección de dopaje genético

El estudio del dopaje genético está en continua evolución gracias a los ensayos realizados en los laboratorios antidopaje certificados por la WADA. Mediante la búsqueda bibliográfica realizada se extrajeron ciertos artículos siguiendo estas líneas sobre experimentación de genes conocidos que tienen efectos estimulantes en el deporte llevados a cabo entre 2004 y 2018, coincidiendo con el inicio de la prohibición del dopaje genético por la WADA. Los artículos recopilados se van a organizar según el gen que se quiere modificar, que será el de EPO, ECA, IGF-1, antagonistas de la miostatina y del gen PPAR-delta.

5.3.1 EPO

La EPO es una sustancia prohibida por la WADA porque estimula la producción de eritrocitos y como consecuencia habrá mayor disponibilidad de oxígeno en sangre y el atleta gana resistencia frente a la fatiga. Se puede introducir en el organismo EPO exógeno con efectos dopantes para obtener estos resultados mediante dopaje convencional, o bien mediante el dopaje genético se puede introducir la eritropoyetina de manera indirecta introduciendo el gen que la sintetiza, y en ambos casos se

generará un aumento de EPO en el organismo (5). En el primer caso se necesitan hasta 12 dosis de EPO por semana para que el organismo responda al estímulo, y es el gran inconveniente del dopaje convencional, ya que en el segundo caso solo una dosis del gen modificado de EPO puede llegar a durar cuatro meses en el organismo con los mismos efectos que tendría el primer instante, el gen no necesita de tantas suministraciones intravenosas y los beneficios se pueden reflejar a largo plazo (30).

Para este trabajo se han extraído tres artículos sobre experimentación animal para ver los resultados revelados de la introducción del gen EPO en el animal.

En 2004 se realizó un estudio en macacos ya que tienen un genoma muy similar al humano, para ver qué diferencias se podían encontrar entre la EPO exógena y la endógena. Se llevó a cabo un isoelectroenfoque del cDNA de la EPO recombinante administrado en el músculo del macaco. Este método consigue separar las moléculas según su carga. Después se recogió una muestra de orina del animal antes y después de la inyección de EPO. Se observó que la EPO endógena difería de la EPO recombinante mediante un perfil isoeléctrico, y que probablemente era el resultado de modificaciones postraduccionales, que son dependientes del tejido y la especie (31).

En 2011 se realizó una valoración también en estos primates sobre el método de introducción del gen de eritropoyetina más eficaz, ya fueran vectores plasmídicos o virales. Se realizó una PCR a tiempo real del DNA plasmídico y del vector rAAV (vector de un virus adeno-asociado recombinado), por separado, inyectados intramuscularmente en una única dosis a un macaco, para ver si estaban presentes a larga instancia en el animal. Ambos vectores transgénicos contenían la secuencia del gen EPO de macaco, y se distinguen del DNA genómico endógeno en que no poseen intrones (el DNA exógeno es cDNA). Después de administrar por separado una cantidad alta de DNA plasmídico y una cantidad baja del vector rAAV, se realizó una extracción de sangre para estudiar el nivel de estos transgenes en los glóbulos blancos. Como resultados obtuvieron que varios meses después de la inyección, se encontraba todavía el vector rAAV en los glóbulos blancos, mientras que el DNA plasmídico había desaparecido, por lo que este método con intrones se podrá utilizar para detectar dopaje genético mediado por rAAV (32).

En 2018 se estudió un método de detección basado en el nivel en plasma del gen EPO. Se utilizaron para ello *micro-mini-pigs*, un cerdo experimental de poco peso (33). Para ello se llevó a cabo una PCR del DNA plasmídico administrado en el músculo del *micro-mini-pig*. Se buscaba detectar el plásmido que contiene el gen de la EPO humana en el cerdo. Se suministró la EPO purificada y se estudió la cantidad presente a distintos tiempos de extracciones mediante una PCR digital (ddPCR), que es cuantitativa. El máximo de detección del gen de interés se dio justo después de la administración intramuscular, y luego fue decreciendo, pero a las 2-3 semanas se volvió a extraer plasma y se comprobó que seguía habiendo señal, por lo que el método fue eficaz en este caso y la inyección dopantes pudo detectarse por ddPCR (34).

5.3.2 IGF-1

En 2012 se consiguió detectar el dopaje genético con el gen IGF-1 mediante el método indirecto sobre los cambios que se dan en el proteoma, en este caso del proteoma del músculo ya que es el tejido que interesa por su aplicación en el dopaje. Se vio que la presencia de IGF-1 regulaba el metabolismo energético del músculo, incrementando los niveles proteicos como por ejemplo de la

glucógeno fosforilasa y la fosfoglucomutasa (enzimas clave en la glucogenólisis), o de la glucólisis como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la enolasa y la piruvatocinasa, o en el metabolismo anaeróbico con la lactato deshidrogenasa. Sin embargo, esta regulación no era igual al día 15 que al mes del inicio del estudio, momento en el que se incrementaron las enzimas del metabolismo aeróbico del piruvato, las relacionadas con el ciclo de Krebs (succinato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa,..) y la fosforilación oxidativa, debido a la mayor disponibilidad de oxígeno (las rutas de Krebs sólo funcionan en presencia de oxígeno). Además, a los 30 días se formó más cantidad de ATP libre para proveer energía al músculo. Se realizó un control en los ratones para comprobar los efectos de IGF-1 en el músculo (22).

En 2017 también se detectó el gen IGF-1 en ratones experimentales. Se efectuó una qPCR en tiempo real, la cual consiste en una amplificación del DNA con medición del producto en cada ciclo mediante un fluoróforo. Primero se clonó el gen en un vector viral adeno-asociado que contiene el marcador de fluorescencia GFP, mientras que el gen de interés tiene una sonda TaqMan añadida para diferenciarlo del gen endógeno, y después se inyectó en el músculo del muslo de un ratón. Para la medición se extrajeron muestras de sangre y del músculo para purificar el DNA y realizar la qPCR. Mediante un análisis de sangre o de orina no se podrían obtener los resultados porque no se encuentra ahí el gen IGF-1 sino en el músculo esquelético. El resultado del estudio fue una detección clara tanto en el músculo como en sangre de este gen exógeno introducido (21).

5.3.3 Antagonista de la miostatina

La miostatina inhibe el crecimiento muscular (tabla 2), por lo que se tendrá que utilizar un antagonista suyo para potenciar la masa muscular.

En 2012 se experimentó con ratones para ver la respuesta al silenciar el gen de miostatina mediante un RNA de horquilla corta interferente expresado en plásmidos recombinantes e inyectado en el músculo de un ratón. Como resultado obtuvieron hasta un 28% de hipertrofia muscular debido a que el bloqueo de miostatina conllevaba un crecimiento de las células musculares, interesante para los deportistas de fuerza. Ya demostrada la capacidad dopante de este bloqueo mediante shRNA quisieron detectarlo en el suero y el tejido muscular, sin embargo, en el primero de ellos no se consiguió detectar, a diferencia del segundo que, si obtuvo resultado la PCR y también en muestras tomadas en la cercanía de ese musculo inyectado, hasta 4 semanas después de la inyección intramuscular. Para conseguir un buen siRNA que silencie el gen se debe estudiar primero una diana en el DNA del gen de miostatina del ratón que sea específica para este siRNA (mediante un programa online). Después se clona en el plásmido, se inyecta y se extrae posteriormente este músculo o el suero para poder purificar el mRNA de miostatina que contiene, y cuantificarlo mediante una PCR semicuantitativa a tiempo real, observando que decrece su nivel comparado con el control. Por tanto, siRNA ejerce un efecto silente en el gen de miostatina en ratones (35).

5.3.4 Antagonista del gen PPAR-delta

Los antagonistas del gen PPAR-delta estimulan la oxidación de ácidos grasos y de glucosa, regulan el metabolismo muscular y aumentan la resistencia física frente a la fatiga (aumentan la proporción de fibras musculares lentas) (tabla 2). A continuación, se desarrollan los ensayos de dos de ellos, GW501516 y AICAR.

En 2004 se detectó GW501516 mediante un método indirecto de modificación postraduccional pero mediante dos aproximaciones diferentes aprovechando que este gen estaba expresado en células de linfocitos leucémicos humanos (U937) y de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). La línea celular U937 se utilizó para detectar la activación de PPAR-delta mediante una qRT-PCR (PCR de transcripción inversa y cuantitativa, es decir, mide la cantidad de expresión del mRNA de un gen diana de PPAR delta), mientras que la línea HepG2 ya expresaba endógenamente el gen PPAR delta, por lo que al añadir el antagonista tendría una respuesta diferente que se midió mediante la actividad luciferasa y se confirmó con una espectrometría de masas. Se concluyó que era mucho más rápido, barato y 10 veces más sensible el método de detección realizado por HepG2 que el de U937, y con el método de la espectrometría de masas se podría obtener fácilmente un resultado fiable (36).

Al igual que el gen GW501516, AICAR también mejora la resistencia frente a fatiga, se demostró en 2008 en un estudio con ratones no entrenados que fueron inyectados en varias dosis el gen AICAR, y como resultados obtuvieron una mejora del 44% de la resistencia inicial del ratón (37).

En 2014 se ensayaron ambos antagonistas para estudiar su efecto en el organismo de ratones experimentales. En el estudio de GW501516 se llegó a la conclusión de que su adición generaba un 70% más de resistencia que sin ella. Por su parte, AICAR es fácilmente cuantificable en sangre, por lo que se realizó un estudio cuantitativo mediante una cromatografía líquida acoplada a una espectrometría de masas, llegando a la conclusión de que se aumenta la resistencia física, al igual que pasaba con GW501516 (38).

Por ejemplo, en 2017 se realizó un estudio que pretendía establecer una cantidad mínima de detección para AICAR, antagonista de PPAR-delta, en los caballos de carreras. Para ello se tomaron muestras de sangre y del plasma de caballos después de una carrera y se realizó una cromatografía en fase líquida acoplada a una espectrometría de masas. Determinaron que el punto de corte para dar positivo sería una concentración en sangre de AICAR igual a 600ng/mL, ya que también existe el gen endógeno que siempre está presente. Cantidades mayores serían indicativo de que hubo dopaje genético. También probaron el tiempo en que puede dar positivo en la prueba después de la inyección de 2g del gen, y salían 4 horas y media de margen para su detección como caso positivo de dopaje genético (39).

En este sentido, existen pruebas deportivas con animales, donde se realizan controles de dopaje convencional en dichos animales puesto que forma parte también del espíritu ético del deporte de élite. Se da fundamentalmente en caballos, perros, camellos, palomas y los toros en España. Pero todavía no se ha desarrollado ningún método de detección para el dopaje genético en este ámbito. No obstante, se están realizando estudios para su detección, fundamentalmente centrada en los caballos de carreras (40).

5.4 Riesgos

Uno de los motivos principales de haber añadido las tecnologías de transferencia genética en la lista de métodos prohibidos por la WADA es el peligro que conlleva en la salud del atleta, incluso puede llevar a la muerte como ya se ha experimentado con situaciones aplicadas en la terapia génica para la cura de enfermedades. Además, existen efectos secundarios de aplicar la transferencia génica en las células, pero no se consiguen estudiar en profundidad debido a que se dan a largo plazo y está muy

poco experimentado en laboratorio, por lo que existe una falta de información, falta de experimentación y falta de tratamientos.

Por otra parte, cualquier tipo de dopaje implica infringir los códigos éticos humanos cuando pretende la mejora física, y esto puede acarrear graves consecuencias también tanto para el atleta dopado, como para los deportistas que no infringen estas normas, como para el ambiente general del deporte actual y sus valores. Ya no hay un juego limpio por parte de todos y todas, sino distinciones en la forma física y los resultados obtenidos.

Sin embargo, los riesgos más llamativos en el suministro de genes modificados son los relacionados con la salud del deportista. Ningún atleta ha sufrido daños por ello durante una competición a día de hoy, o no está demostrado que sea debido al dopaje genético (5). Al igual que la terapia génica a veces no consigue curar la enfermedad que pretende tratar, el uso de la edición génica en la mejora atlética también puede acarrear consecuencias. La diferencia entre ambas es que esta última es de carácter ilegal por lo que no está sujeta a una regulación segura (41).

Uno de los problemas es el silenciamiento génico, ya que una vez insertado el gen puede no tener expresión dentro de la célula infectada así que la efectividad de esta terapia depende de ello (42). Antes hemos hablado de que ciertos virus son inmunogénicos, así que la respuesta inmune que se genere en la célula es otro inconveniente, pero todavía no se sabe solventar (41), al igual que se puede generar una respuesta inmune contra la propia proteína endógena (28). Siempre que se exprese una proteína exógena queda el riesgo de que se dé una sobreexpresión, y es peligroso porque puede darse toxicidad (43).

También hay virus que pueden integrarse en la célula infectada, como los retrovirus, y al hacerlo pueden incrementar la producción de oncogenes que derivan en cáncer (44).

Por otro lado, la modificación de células germinales está prohibida al tener fines reproductivos, pero puede ocurrir cuando se infecta una célula mediante la terapia génica, y esta modificación con un gen exógeno pasará a futuras generaciones (45).

El último riesgo destacable es que este método es muy novedoso y solo se han podido desarrollar estudios a corto plazo, por lo que los efectos que se obtengan a largo plazo son desconocidos, así que puede haber problemas derivados de la terapia génica que no se han identificado por el momento (29).

6. Búsqueda bibliográfica

El objetivo de este Trabajo Fin de Grado es llevar a cabo una revisión bibliográfica exhaustiva mediante el uso de bases de datos científicas que sean fiables para sintetizar la información relacionada con el dopaje genético y su detección molecular. Los resultados obtenidos están datados de artículos publicados entre el año 2002 y 2018.

La información seleccionada para el TFG ha sido extraída de 4 bases de datos, 2 buscadores online y 2 páginas webs. Las bases de datos siguientes están actualizadas constantemente y son de acceso libre y gratuito:

- Web of Science: es una base de datos internacional ampliada a todos los campos del conocimiento, con más de 36 millones de registros desde 1945.
- Scopus: es una base de datos internacional y bibliográfica de revistas científicas que abarca 18.000 títulos.
- PubMed: es una base de datos internacional con 28 millones de artículos de investigación biomédica. Es además el motor de búsqueda de MEDLINE (Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos).
- World Wide Science: es una base de datos científica internacional que agrupa la asociación multilateral de 100 bases de datos de 70 países para poder realizar una búsqueda única unificada. Para evitar las barreras lingüísticas tiene una opción multilingüe que permite realizar una consulta en uno de 10 idiomas preestablecidos y todos los resultados obtenidos se traducirán automáticamente a este idioma.
- AlcorZe: es un buscador de la Universidad de Zaragoza (UZ) que permite acceder a la mayoría de recursos de la Biblioteca de la UZ: catálogo Roble (base de datos de la BUZ), repositorio de documentos ZAGUAN de la UZ y más de 100 bases de datos externas (MEDLINE, Scopus, Dialnet, ScienceDirect,...).
- Scholar Google: es un buscador de Google especializado en información académica, ya sean tesis, artículos científicos, citas, libros, y archivos depositados en repositorios. Tiene un filtro de calidad para la búsqueda, pero existe una falta de control en el proceso de selección de las revistas científicas indexadas (de alta calidad).

Además, se realizó una búsqueda bibliográfica en otras dos bases de datos y un repositorio donde no se obtuvo ningún artículo de interés:

- ScienceDirect: es una base de datos científica internacional con más de 12 millones de artículos. El problema es que la mayoría de resultados necesitan de una suscripción para poder obtener el texto completo.
- SciFinder: es una base de datos científica internacional de literatura química y relacionada, y contiene 48 millones de referencias. Se requiere estar registrado para realizar la búsqueda.
- ZAGUAN: es el repositorio de la UZ abierto a todos sus miembros. Recoge documentos como tesis, trabajos fin de grado y fin de máster, ponencias y revistas.

Para realizar cada búsqueda, tras entrar en la página web correspondiente a la base de datos y registrarse en caso necesario, se escribe en el buscador las palabras clave *gene doping* (o *dopaje genético* si se quieren resultados en castellano) y se aplica el conector booleano “AND” *detection*(o *detección* si se buscan en castellano) para obtener los artículos que contuvieran ambos términos.

Se puede hacer una búsqueda avanzada para poder filtrar los resultados obtenidos: según el idioma del texto, el año de publicación, la disponibilidad del texto (texto completo, sólo resumen, ...), el tipo de artículo, o las bases utilizadas. Para este TFG se han filtrado siempre resultados para artículos publicados a partir del año 2000, que sólo fueran textos en inglés o castellano, y que tengan el texto completo (gráfico 2).

Con la búsqueda booleana inicial en total se obtuvieron 2415 artículos, pero pasaron varios filtros para seleccionar los que serían útiles, ya que había muchos que no eran relevantes, y hubo 20 duplicados. Por tanto, quedaron 46 artículos para su revisión, pero después de haberlos revisado se excluyeron otros 13 artículos porque no era información relevante para el trabajo. Por otro lado, a partir de la bibliografía de los artículos revisados, añadieron 14 nuevos artículos a la bibliografía de este TFG, por tratar de temas relacionados.

En total he conseguido recopilar 47 artículos sobre la detección de dopaje genético para este Trabajo de Fin de Grado, de los cuales sólo 4 eran en castellano y el resto en inglés. Además, en la bibliografía hay 2 páginas webs actualizadas.

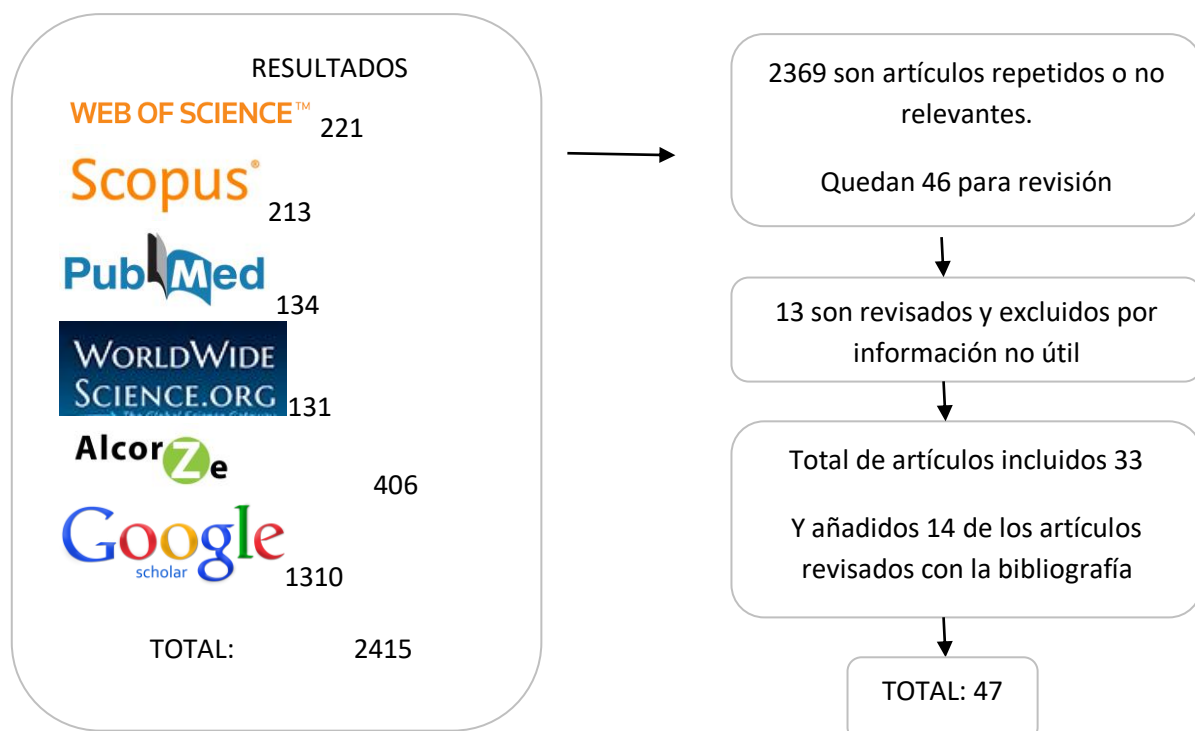


Gráfico 2. Diagrama de flujo del proceso de búsqueda.

6.1 Discusión

Los resultados incluidos en la revisión bibliográfica se han centrado en los métodos de detección del dopaje genético, aunque también se ha extraído información sobre el dopaje convencional. El problema fundamental para encontrar información precisa ha sido la falta de información sobre la detección del dopaje genético y las pocas conclusiones que a día de hoy se han sacado. Sobre el dopaje convencional hay mucha investigación científica, pero por desgracia no pasa lo mismo con el genético.

Para establecer un orden en la adquisición de información detallada primero se ha realizado una búsqueda general sobre la materia del dopaje, para ello se ha indagado en las páginas webs citadas en bibliografía (5) (3), donde se informa al público general sobre este tema y comienza a profundizar en todo tipo de dopaje, sustancias dopantes, laboratorios antidopaje, el código que defiende,...

Cuando ya se tiene suficiente información de base se ha comenzado el análisis sobre el dopaje genético, recopilando aquellos artículos que tenían estudios relacionados. Sin embargo, no he recopilado mucha información aquí y aquellos artículos que hablaban de la detección de este tipo de dopaje no especificaban sobre los métodos llevados a cabo, y han quedado pocos artículos que detallaran ejemplos sobre métodos de detección.

Además, los estudios sobre la detección del dopaje genético son muy recientes por lo que no hay apenas artículos concluyentes. Se necesita mucha investigación todavía para saber qué métodos pueden ser utilizados para la detección de dopaje genético en los deportistas, y estudiar detalladamente los efectos que tiene en el organismo del sujeto de estudio. Como consecuencia de esto, el dopaje genético no se ha implantado como una práctica habitual en la competición de élite, aun así se han tomado precauciones y se ha prohibido su utilización. El futuro del dopaje genético es incierto puesto que no hay evidencias de que se consiga desarrollar de manera segura sin que acarree los riesgos que hoy en día conlleva, dado que sus efectos secundarios pueden aparecer a largo plazo y todavía muchos son desconocidos por los científicos implicados en su estudio. Sin embargo, biotecnólogos y otras ramas de la ciencia siguen estudiando la terapia génica para encontrar métodos precisos de biología molecular que puedan utilizarse en los controles antidopaje.

7. Conclusión

- No se puede confirmar que se esté realizando dopaje genético actualmente en competición porque no hay pruebas que lo corroboren. Esto se puede deber a lo novedoso de la tecnología aplicada, la falta métodos fiables para su detección, y a la propia naturaleza del dopaje genético.
- La práctica del dopaje genético conllevaría unos riesgos importantes en la salud del atleta. La mayoría de efectos secundarios de las técnicas de biología molecular aplicadas son por el momento desconocidos a corto y sobre todo a largo plazo.
- El dopaje genético es un campo que sigue una progresión lenta, tanto en su detección como en su aplicación, por el alto coste y la dificultad del procedimiento.
- La biotecnología desarrolla actualmente métodos de edición génica utilizados para la cura de enfermedades que también pueden evolucionarse como métodos específicos de detección del dopaje genético. Para ello se realizarán pruebas moleculares sobre el estudio de los genes implicados en el rendimiento deportivo.

7. Conclusion

- It cannot be confirmed that gene doping is currently taking place in competition because there is no corroborating evidence. This may be due to the novelty of the applied technology, the lack of reliable methods for its detection, and the very nature of the gene doping.
- The practice of gene doping would entail significant risks to the health of the athlete. Most of the side effects of applied molecular biology techniques are, for the time being, unknown in the short term and especially in the long term.
- Gene doping is a field that follows a slow progression, both in its detection and in its application, due to the high cost and difficulty of the procedure.
- Biotechnology currently develops gene editing methods used for the cure of diseases that can also be evolved as specific detection methods of gene doping. For it, molecular tests will be carried out on the study of the genes involved in sports performance.

8. Valoración personal

Los métodos de detección del dopaje genético son aún poco precisos y están en continuo estudio debido a su falta de investigación. A lo largo de todo este proceso de búsqueda junto con el análisis de la información, he podido adquirir una idea global de la situación actual del dopaje genético y entender los métodos que se pretenden clarificar en la lucha contra el dopaje.

Este Trabajo de Fin de Grado me ha servido, gracias a la revisión bibliográfica realizada, para poder profundizar en una base de datos y saber manejar distintas bases científicas. Creo esencial saber manejar estas herramientas antes de iniciar la búsqueda, por ello fue esencial la formación previa sobre la realización del TFG.

Al principio temía que la falta de información sobre el tema me impidiera obtener la suficiente información para el trabajo, pero poco a poco se han conseguido exprimir los artículos relacionados y poder formar una estructura básica del TFG que luego se iría enriqueciendo con la lectura de todos los artículos revisados.

También he aprendido sobre materia en biotecnología relacionada con el dopaje en general, al poder profundizar tanto en este tema. Agradezco haber podido desarrollar el TFG sobre el dopaje puesto que el deporte es una rama que me incita mucho a su conocimiento.

Por último, me ha ayudado a mejorar mi nivel de inglés científico puesto que la mayoría de artículos que he leído estaban en este idioma, además de la redacción del resumen y conclusiones.

9. Bibliografía

1. **Navracsics, Tibor.** *Special Eurobarometer 472 "Sport and physical activity" Report.* Sofía : s.n., diciembre 2017.
2. *Resolución de 12 de junio de 2018, de la Presidencia del Consejo Superior de Deportes, sobre la relación de deportistas de alto nivel correspondiente al primer listado del año 2018.* **Lasa, J.R. Lete.** 146, 16 de junio de 2018, Boletín Oficial del Estado, Vol. III, p. 61394.
3. Agencia Española de Protección de la Salud en el Deporte. [Online] [Cited: octubre 6, 2018.] aepsad.culturaydeporte.gob.es.
4. *Pierre de Coubertin, Doped 'Amateurs' and the 'Spirit of Sport': The Role of Mythology in Olympic Anti-Doping Policies.* **Ritchie, Ian.** 8, s.l. : The International Journal of the History of Sport, 2014, Vol. 31, pp. 820-838.
5. Agencia Mundial Antidopaje. [Online] [Cited: octubre 4, 2018.] wada-ama.org.
6. *Review of WADA Prohibited Substances: Limited Evidence for Performance-Enhancing Effects.* **Jules A.A.C. Heuberger, Adam F. Cohen.** s.l. : Sports Medicine, 2018, pp. 1-15.
7. Comité Olímpico Internacional. [Online] octubre 2, 2018. www.olympic.org.
8. *Gene Doping.* **Brownlee, Christen.** 18, s.l. : Science News, 2004, Vol. 166, p. 280.
9. **Giacca, Mauro.** *Gene Therapy.* s.l. : Springer, 2010.
10. *The potential of oligonucleotides for therapeutic applications.* **Férec, Yann Fichou and Claude.** 12, s.l. : Trends in Biotechnology, 2006, Vol. 24.
11. *Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta.* **Wang Y.X., Zhang C.L., Yu R.T., Cho H.K., Nelson M.C. et al.** s.l. : PLOS Biology, 2004, Vol. 2, p. 294.
12. *Potential Use of Gene Transfer in Athletic Performance Enhancement.* **A. Baoutina, I. E. Alexander, J.J. Rasko and K. R. Emslie.** 10, s.l. : Molecular Therapy, 2007, Vol. 15, pp. 1751–1766.
13. *Delivery of growth factors using gene therapy to enhance bone healing.* **Southwood L.L., Frisbie D.D., Kawcak C.E. and McIlwraith C.W.** s.l. : Veterinary Surgery, 2004, Vol. 33, pp. 565-578.
14. *Gene transfer approaches to the healing of bone and cartilage.* **Lieberman J.R., Ghivizzani S.C. and Evans C.H.** s.l. : Molecular Therapy, 2002, Vol. 6, pp. 141-147.
15. *The hunt for gene dopers.* **H.M., Mansour M.M. and Azzazy.** s.l. : Drug Testing and Analysis, 2009, Vol. 1, pp. 311-322.
16. *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as an alternative to PCR: a rapid on-site detection of gene doping.* **Salamin O., Kuuranne T., Saugy M. and Leuenberger N.** s.l. : Drug Testing and Analysis, 2017, Vol. 9, pp. 1731–1737.

17. *Development of HSV-mediated gene transfer for the treatment of chronic pain*. **Mata M., Glorioso J. and Fink D.J.** s.l. : Experimental Neurology, 2003, Vol. 184, pp. S25–S29.
18. *The EPO epidemic in sport*. **H., Verbruggen.** s.l. : Laboratory Hematology, 2002, Vol. 8, pp. 44-45.
19. *Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR delta*. **Wang Y.X., Zhang C.L., Yu R.T., Cho H.K., Nelson M.C., Bayuga-Ocampo C.R. et al.** s.l. : PLOS Biology, 2004, Vol. 2, pp. 1532–1539.
20. *Genetics and sports*. **Lippi G, Longo UG, Maffulli N.** s.l. : Br Med Bull, 2010, Vol. 93, pp. 27–47.
21. *Detection of exogenous gene doping of IGF-I by a real-time quantitative PCR assay*. **al, Jin-Ju Zhang et.** 4, s.l. : Biotechnology and Applied Biochemistry, 2017, Vol. 64, pp. 549-554.
22. *Enhanced Athletic Performance on Multisite AAV-IGF1 Gene Transfer Coincides with Massive Modification of the Muscle Proteome*. **al, Antero Macedo et.** s.l. : Human Gene Therapy, 2012, Vol. 23, pp. 146–157.
23. *Growth hormone in sport: beyond Beijing 2008*. **Segura J., Gutierrez-Gallego R., Ventura R. et al.** s.l. : Ther Drug Monit, 2009, Vol. 31, pp. 3-13.
24. *Factor IX expression in skeletal muscle of a severe hemophilia B patient 10 years after AAV-mediated gene transfer*. **Buchlis G, Podsakoff GM, Radu A, et al.** s.l. : Blood, 2012, Vol. 119, pp. 3038–41.
25. *No association between Angiotensin Converting Enzyme (ACE) gene variation and endurance athlete status in Kenyans*. **al, Scott R.A. et.** s.l. : Comparative Biochemistry and Physiology, 2005, Vol. 141, pp. 169-175.
26. *Affinity-based biosensors as promising tools for gene doping detection*. **Minunni M, Scarano S, Mascini M.** s.l. : Trends Biotechnol, 2008, Vol. 26, pp. 236–43.
27. *Gene doping: a review of performance-enhancing genetics*. **Gaffney GR, Parisotto R.** s.l. : Pediatric Clinics of North America, 2007, Vol. 54, pp. 807–22.
28. *Erythropoiesis-stimulating agents and other methods to enhance oxygen transport*. **S., Elliott.** s.l. : British Journal of Pharmacology, 2008, Vol. 154, pp. 529–41.
29. *Gene doping: the hype and the reality*. **Wells, DJ.** s.l. : British Journal of Pharmacology, 2008, Vol. 154, pp. 623–631.
30. *Dopaje genético: ¿realidad o ficción?* **J., Díaz.** s.l. : Cadena Ser, 2017.
31. *"Genetic Doping" with erythropoietin cDNA in primate muscle is detectable*. **F. Lasne, L. Martin, J. de Ceaurriz, T. Larcher, P. Moullier and P. Chenuaud.** 3, s.l. : MOLECULAR THERAPY, 2004, Vol. 10.
32. *Longevity of rAAV vector and plasmid DNA in blood after intramuscular injection in nonhuman primates: implications for gene doping*. **W. Ni, C. Le Guiner, G. Gernoux, M. Penaud-Budloo, P. Moullier and R.O. Snyder.** s.l. : Gene therapy, 2011, Vol. 18, pp. 709-718.

33. *Microminipig, a non-rodent experimental animal optimized for life science research: in vivo proarrhythmia models of drug-induced long QT syndrome: development of chronic atrioventricular block model of microminipig.* **Sugiyama A1, Nakamura Y, Akie Y, Saito H, Izumi Y, Yamazaki H, Kaneko N, Itoh K.** s.l. : Journal Of Pharmacological Sciences, 2011, Vol. 115, pp. 122-6.
34. *Digital PCR detection of plasmid.* **al, Tozaki T. et.** s.l. : BMC Research Notes, 2018, Vol. 11, p. 708.
35. *Fundamental study of detection of muscle hypertrophy-oriented gene doping by myostatin knock down using RNA interference.* **al, Tohru Takemasa et.** s.l. : Journal of Sports Science and Medicine, 2012, Vol. 11, pp. 294-303.
36. *Bioactivity screening and mass spectrometric confirmation for the detection of PPAR δ agonists that increase type 1 muscle fibres.* **al, Toine F. H. Bovee et.** s.l. : Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004, Vol. 406, pp. 705–713.
37. *AMPK and PPAR δ agonists are exercise mimetics.* **al, R. M. Evans et.** s.l. : Cell, 2008, Vol. 134, p. 405.
38. *Metabolic modulators of the exercise response: doping control analysis of an agonist of the peroxisome proliferator-activated receptor delta (GW501516) and 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR).* **A. Pokrywka, P. Cholbinski, P. Kaliszewski, K. Kowalczyk, D. Konczak, and A. Zembron-Lacny.** s.l. : Journal of Physiology and Pharmacology, 2014, Vol. 4, pp. 469-476.
39. *Doping control study of AICAR in post-race urine and plasma samples from horses.* **Wong, Jenny K. Y. et al.** 9, s.l. : Drug Testing and Analysis, 2017, Vol. 9, pp. 1363-1371.
40. *RNA sample preparation applied to gene expression profiling for the horse biological passport.* **al, Ludovic Bailly-Chouriberry et.** s.l. : Drug Testing and Analysis, 2017, Vol. 9, pp. 1448–1455.
41. *Gene doping: the hype and the harm.* **McKanna T.A., Toriello H.V.** s.l. : Pediatric Clinics of North America, 2010, Vol. 57, pp. 719-727.
42. *Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges.* **Mingozzi F., High K.A.** s.l. : Nature Reviews Genetics, 2011, Vol. 12, pp. 341–355.
43. *Doping in the recombinant era: strategies and counterstrategies.* **Azzazy H.M., Mansour M.M., Christenson R.H.** s.l. : Clinical Biochemistry, 2005, Vol. 38, pp. 959–965.
44. *The challenge for gene therapy: innate immune response to adenoviruses.* **Thaci B., Ulasov I.V., Wainwright D.A. et al.** s.l. : Oncotarget, 2011, Vol. 2, pp. 113–121.
45. *Gene doping.* **Haisma H.J., de Hon O.** s.l. : International Journal of Sports Medicine, 2006, Vol. 27, pp. 257–266.
46. *La sociología del deporte en España. Estado de la cuestión.* **Moscoso-Sánchez, David.** 44, s.l. : Revista Internacional de Sociología, 2006, Vol. 14, pp. 177-204.
47. *PPARs: Running Around Obesity.* **Evans, R. M.** 5, s.l. : FASEB Journal, 2007, Vol. 21.

48. *Hormone abuse in sports: the antidoping perspective.* **Osquel Barroso, Irene Mazzone, Olivier Rabin.** 3, s.l. : Asian J Androl, 2008, Vol. 10, pp. 391–402.

49. *La inversión en la elite deportiva versus la práctica popular: Europa y España.* **Rodríguez, A.** s.l. : Revista de Humanidades, 2018, Vol. 34, pp. 173-193.