

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO EN POBLACIONES SELECCIONADAS DE LA
FIABILIDAD DE NUEVOS PROTOCOLOS DE DETECCIÓN DE
CONSUMO DE HORMONAS RECOMBINANTES
(hGH y EPO)**

M^a ROSARIO ABELLÁN SÁNCHEZ

2006

Dipòsit legal: B.38492-2007
ISBN: 978-84-690-7816-7

**DEPARTAMENT DE CIÈNCIES EXPERIMENTALS I DE LA SALUT
PROGRAMA DE DOCTORAT EN CIÈNCIES DE LA SALUT I DE LA VIDA
UNIVERSITAT POMPEU FABRA (UPF)**

**ESTUDIO EN POBLACIONES SELECCIONADAS DE LA
FIABILIDAD DE NUEVOS PROTOCOLOS DE DETECCIÓN DE
CONSUMO DE HORMONAS RECOMBINANTES
(hGH y EPO)**

Memoria presentada por M^a Rosario Abellán Sánchez para optar al título de doctor por la Universitat Pompeu Fabra. Trabajo realizado bajo la co-dirección del Dr. Jordi Segura Noguera y la Dra. Rosa Ventura Alemany, en la Unitat de Recerca en Farmacologia, de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM). Programa de Doctorado de la Univrsitat Pompeu Fabra, bienio 2000-2002.

Firma del co-director de tesis
(Dr. Jordi Segura Noguera)

Firma de la co-directora de tesis
(Dra. Rosa Ventura Alemany)

Firma de la doctoranda
(M^a Rosario Abellán Sánchez)

A mi familia

Ícaro, como un pequeño Dios,
desafiando a todo un Sol...

Aquellos que me conocen saben muy bien que no suelen faltarme nunca las palabras... Bueno, pues ahora no sé cómo dar las gracias a todas las personas que han participado, de una manera u otra, en este proyecto. La verdad es que son muchas...

Por supuesto, una primera mención a mis tutores, Dr. Jordi Segura y Dra. Rosa Ventura, por permitirme participar en este proyecto y darme la oportunidad de aprender tanto de ellos. Ambos, además de sobrellevar mis persecuciones con autocontrol, han conseguido abrirme los ojos al interesante y particular mundo del control antidopaje. Gracias por vuestra confianza en mis posibilidades.

Al Dr. José Antonio Pascual, muchas gracias por su importante colaboración y su rigor a lo largo de todo el trabajo realizado en esta tesis.

A toda la gente del Istituto Superiore di Sanità, ISS (Roma, Italia) y, en especial, a la Dra. Simona Pichini, la Dra. Roberta Pacifici y el Dr. Piergiorgio Zuccaro, por su imprescindible participación en este proyecto.

Gracias a la Dra. Pilar Sardà y al Dr. Àngel Remacha, del Laboratori d'Hematologia de l'Hospital de Sant Pau, por su colaboración y ayuda; y, por supuesto, hacerme sentir tan cómoda en su laboratorio.

Gracias al Dr. Ferran Rodríguez y al resto de colaboradores de la Unitat d'Hipobària de l'Institut Nacional d'Educació Física de Catalunya, por la estupenda experiencia de conocerlos y trabajar juntos.

Al Dr. Ramon Olivè y a la Dr. Montserrat Bellver, del Centre d'Alt Rendiment de Sant Cugat del Vallès, por su colaboración y ayuda en la obtención de las muestras. Sólo los que trabajan con deportistas son conscientes de lo difícil que resulta alcanzarlos cuando hay que tomarles muestras.

A todos los compañeros de la Unitat de Recerca en Farmacologia, que aún se encuentran aquí y a los que ya se fueron, por su camaradería y ayuda. Perdonadme, pero sois tantos que no os puedo nombrar uno a uno (la tesis ya me ha salido suficientemente larga, ¿no?). Sin embargo, con el permiso de todos, quisiera hacer una mención especial a Neus Pizarro con quien tuve la suerte de cruzarme en este departamento, y cuyo compañerismo y amistad he añorado terriblemente.

A los compañeros de la UL'EC con los que siempre he podido contar para cualquier cosa y con los cuales he disfrutado de divertidísimas discusiones durante la hora de la comida (cuando he tenido tiempo de unirme a ellos... ¡siempre los primeros del Plàstic!). Incluiré aquí también a Silvia ("la compi de Mico") y a Daniel... ¡gracias por darme siempre ánimos!

A mis amigos (Anna, Jordi e Itziar, Marta y Xavi, Neus) por tener la suerte de que lo sean. Con ellos he pasado muchísimos grandes momentos de mi vida y espero poder vivir muchos más iguales por más lejos que estén ahora. Bueno, a Neus... (¿qué tendré yo con las Neus?)... tengo que agradecerle muchas más cosas, entre otras su ayuda con esta memoria. Creo que es la persona con mayor paciencia que conozco, cualidad necesaria e imprescindible para soportarme y no caer en la tentación de matarme durante la realización de este manuscrito. ¡No hay como neurosis compatibles! Gracias de todo corazón.

A mis padres y hermano sin los cuales claramente no habría escrito nunca esta memoria. Me han facilitado tanto el camino que el mérito que yo pueda tener les pertenece a ellos. A toda mi familia y, en concreto, a mis abuelas por hacerme tan feliz que a ellas las haga felices la presentación de esta memoria.

Por supuesto, muchas gracias a todos los voluntarios que han llegado a dar, literalmente, su sangre por este estudio. Sin su entusiasmo y espíritu deportivo este proyecto no tendría sentido.

Finalmente, agradecer a l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM) la ayuda recibida por el pago de los gastos finales de reprografía y encuadernación de esta tesis; y al Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Sanidad y Consumo la aportación económica recibida para este proyecto de investigación (nº 01/1328) de título "Estudio en poblaciones seleccionadas de la fiabilidad de nuevos protocolos de detección de consumo de hormonas recombinantes (hGH y EPO)".

Seguro son todos los que están, pero no están todos los que son. Pedir disculpas a aquellos a los que no haya mencionado pero han facilitado que esta tesis haya llegado, finalmente, a buen puerto.

Abreviaturas

95% LA:	Límites de acuerdo del 95% (<i>95% limits of agreement</i>)
%macro:	Porcentaje de macrocitos
%ret:	Porcentaje de reticulocitos
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ALS:	Subunidad ácido lábil (<i>acid labile subunit</i>)
ANOVA:	Análisis de la variancia
BFU-E:	Unidad formadora de colonias grandes y abundantes de la línea eritroide (<i>burst-forming unit-erythroid</i>)
CFU-E:	Unidad formadora de colonias pequeñas y escasas de la línea eritroide (<i>colony-forming unit-erythroid</i>)
CFU-LM:	Célula madre linfomieloide
CFU-M:	Célula germinal mieloide
cpm:	Cuentas por minuto
COI:	Comité Olímpico Internacional
CV%:	Coefficiente de variancia relativo
Dpd:	Deoxipiridinolina
EB:	Tinte Azul de Evans (<i>Evans Blue dye</i>)
ELISA:	<i>Enzyme-immunosorbent assay</i>
EPO:	Eritropoyetina
fr:	Ferritina
F/T:	Ciclos de congelación/descongelación (<i>freeze/thaw</i>)
GH:	Hormona del crecimiento (<i>growth hormone</i>)
GHBP:	Proteína de unión a la GH (<i>GH-binding protein</i>)

GHRH:	Neuropéptido estimulador de la liberación de la GH (<i>GH-releasing protein</i>)
GHSs:	Secretagogos de la GH
Hb:	Hemoglobina
HC-IHE:	Exposición intermitente a hipoxia en cámara hipobárica (<i>hypobaric chamber-intermittent hypoxia exposure</i>)
Hct:	Hematocrito
HIF-1:	Factor de inducción por hipoxia 1 (<i>hypoxia inducible factor 1</i>)
IC 95%:	Intervalos de confianza del 95%
ICC:	Coefficiente de correlación intra-clase (<i>intra-class correlation coefficient</i>)
ICTP:	Pelopéptido C-terminal <i>cross-linked</i> del procolágeno tipo I
IEF:	Isoelectroenfoque
IGF-I:	<i>Insulin-like growth factor I</i>
IGF-II:	<i>Insulin-like growth factor II</i>
IGFBPs:	Proteínas de unión a las IGFs (<i>IGF-binding proteins</i>)
IHE:	Exposición intermitente a hipoxia (<i>intermittent hypoxia exposure</i>)
ISL:	Estándares Internacionales para Laboratorios (<i>International Standard for Laboratories</i>)
ISO:	Organización Internacional para la Estandarización (<i>International Standard Organization</i>)
IU:	Unidades internacionales (<i>International Units</i>)
LOD:	Límite de detección (<i>limit of detection</i>)
LOQ:	Límite de cuantificación (<i>limit of quantification</i>)
MALDI:	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization</i>
MALDI-TOF:	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight</i>
MCH:	Hemoglobina corpuscular media (<i>mean corpuscular haemoglobin</i>)
MCV:	Volumen corpuscular medio (<i>mean corpuscular volume</i>)
NESP:	<i>New erythropoiesis-stimulating protein</i>

OFF:	Modelo indirecto de detección de rhEPO tras el cese de la administración (1ª generación) $OFF = 6,149 Hct - 92,87 retHct - 0,1463 \ln [EPO]$
OFF hr:	Modelo indirecto de detección de rhEPO tras el cese de la administración (2ª generación) $OFF hr = Hb - 60 \sqrt{\%ret}$
OFF hre:	Modelo indirecto de detección de rhEPO tras el cese de la administración (2ª generación) $OFF hre = Hb - 50 \sqrt{\%ret} - 7 \ln [EPO]$
ON:	Modelo indirecto de detección de rhEPO durante la administración (1ª generación) $ON = 3,721 Hct + 30,45 retHct + 0,1871 \ln [EPO] + 0,1267 \ln [sTfR] + 0,115 \ln (\%macro + 0,1)$
ON he:	Modelo indirecto de detección de rhEPO durante la administración (2ª generación) $ON he = Hb + 9.74 \ln [EPO]$
ON hes:	Modelo indirecto de detección de rhEPO durante la administración (2ª generación) $ON hes = Hb + 6.62 \ln [EPO] + 19.4 \ln [sTfR]$
PCR:	Procedimiento de duplicación del AND (<i>polymerase chain reaction</i>)
PICP:	Péptido C-terminal del procolágeno tipo I
P-III-P:	Péptido N-terminal del procolágeno tipo III
pO ₂ :	Presión parcial de oxígeno
Pyd:	Piridinolina
QC:	Control de calidad (<i>quality control</i>)
RBC-Y:	Valor medio del histograma de dispersión frontal de la luz (<i>forward light scatter histograms</i>) de eritrocitos
RET-Y:	Valor medio del histograma de dispersión frontal de la luz (<i>forward light scatter histograms</i>) de reticulocitos
retHtc:	Hematocrito de los reticulocitos
rhEPO:	Eritropoyetina humana recombinante
rhGH:	Hormona del crecimiento recombinante humana (<i>recombinant human growth hormone</i>)
RIA:	Radioinmunoensayo
SRIH:	Somatostatina

S/T:	Condiciones de almacenaje y transporte (<i>storage/transport</i>)
sTfR:	Receptor soluble de la transferina (<i>soluble transferin receptor</i>)
VO ₂ max:	Intercambio máximo de oxígeno
WADA:	Agencia Mundial Antidopaje (<i>World Anti-Doping Agency</i>)
WHO IRR:	Reactivo de referencia internacional de la Organización Mundial de la Salud (<i>World Health Organization international reference reagent</i>)

Índice

1. Introducción	1
1.1. El control antidopaje	3
1.1.1. Las hormonas peptídicas	4
1.1.2. Estandarización metodológica en el control antidopaje	6
Metabolismo del fármaco	7
Importancia de la matriz	8
Elección del método analítico.....	8
Proceso de validación del método analítico	9
1.2. La eritropoyetina	11
1.2.1. Biología de la EPO	11
1.2.2. Uso terapéutico de la rhEPO	14
1.2.3. Utilización de la rhEPO en el deporte	16
1.2.4. Detección del abuso de rhEPO	17
Detección directa de rhEPO	17
Detección indirecta de rhEPO	19
I. Modelos de detección de la eritropoyesis acelerada.....	22
II. Concentraciones poblacionales de EPO sérica	25
III. El receptor soluble de la transferrina.....	28
Concentraciones poblacionales de sTfR sérico.....	30
1.3. La hormona de crecimiento	33
1.3.1. Biología de la GH.....	33
1.3.2. Uso terapéutico de la rhGH	36
1.3.3. Utilización de la rhGH en el deporte.....	37
1.3.4. Detección del abuso de rhGH. El proyecto GH2000.....	39
Detección directa de rhGH.....	39
Detección indirecta de rhGH	41
I. Desarrollo del método indirecto de rhGH	41
II. La insulin-like growth factor-I	45
Biología de la IGF-I	45
Concentraciones poblacionales de IGF-I sérica	46

III. El péptido N-terminal del procolágeno de tipo III.....	49
Biología del P-III-P	49
Concentraciones poblacionales de P-III-P sérico.....	50
Detección de rhGH en muestras de orina.....	52
1.4. Métodos de análisis de marcadores indirectos.....	54
1.4.1. Métodos de análisis de EPO.....	54
1.4.2. Métodos de análisis de sTfR	55
1.4.3. Métodos de análisis de IGF-I	56
1.4.4. Métodos de análisis de P-III-P	58
2. Justificación y objetivos	61
3. Validación de técnicas inmunológicas para la determinación de los biomarcadores indirectos del abuso de rhEPO y rhGH	67
3.1. Introducción.....	69
3.2. Material y métodos	69
3.2.1. Muestras analizadas.....	69
3.2.2. Inmunoensayos evaluados	70
3.2.3. Laboratorios participantes	71
3.2.4. Validación de técnicas inmunológicas.....	71
3.2.5. Estudios de estabilidad	75
3.2.6. Análisis estadísticos	76
3.3. Resultados	77
3.3.1. <i>Evaluation of immunoassays for the measurement of erythropoietin (EPO) as an indirect biomarker of recombinant human EPO misuse in sport.....</i>	<i>78</i>
3.3.2. <i>Evaluation of immunoassays for the measurement of soluble transferrin receptor (sTfR) as an indirect biomarker of recombinant human EPO misuse in sport.....</i>	<i>87</i>
3.3.3. <i>Evaluation of immunoassays for the measurement of IGF-I and P-III-P, indirect biomarkers of recombinant human growth hormone misuse in sport.....</i>	<i>98</i>
3.4. Discusión.....	109
3.4.1. El pre-tratamiento	109
3.4.2. El rango de calibración.....	110

3.4.3. La armonización del estándar de calibración.....	111
3.4.4. La utilización de autoanalizadores frente a técnicas manuales.....	113
3.4.5. La discrepancia de resultados entre inmunoensayos.....	113
3.4.6. Estabilidad de las proteínas.....	114
4. Efecto de la intensidad de entrenamiento y el ejercicio de resistencia en deportistas sobre la concentración de los biomarcadores indirectos del abuso de rhEPO y rhGH.....	117
4.1. Introducción.....	119
4.2. Material y métodos.....	119
4.2.1. Selección de las poblaciones de interés.....	120
4.2.2. Inmunoensayos utilizados.....	121
4.2.3. Análisis estadísticos.....	122
4.3. Resultados.....	123
4.3.1. <i>Effect of physical fitness and endurance exercise on indirect biomarkers of recombinant erythropoietin misuse.....</i>	<i>124</i>
4.3.2. <i>Effect of physical fitness and endurance exercise on indirect biomarkers of recombinant growth hormone misuse: Insulin-like growth factor I and procollagen type III peptide.....</i>	<i>141</i>
4.4. Discusión.....	161
4.4.1. Efecto del nivel atlético y el ejercicio de resistencia sobre los marcadores sanguíneos y modelos indirectos de la detección del abuso de rhEPO.....	161
4.4.2. Efecto del nivel atlético y el ejercicio de resistencia sobre los marcadores séricos (IGF-I y P-III-P) de la detección indirecta del abuso de rhGH.....	164
5. Efecto de la exposición intermitente a hipoxia en cámara hipobárica sobre la concentración de los biomarcadores indirectos del abuso de rhEPO.....	169
5.1. Introducción.....	171
5.2. Material y métodos.....	172
5.2.1. Selección de los sujetos.....	172
5.2.2. Protocolo de exposición intermitente a hipoxia.....	173
5.2.3. Determinaciones analíticas.....	174

5.2.4. Aplicación de los modelos matemáticos ON/OFF de detección indirecta del abuso de rhEPO.....	177
5.2.5. Aplicación de la técnica de isoelectroenfoco de detección directa del abuso de rhEPO	178
5.2.6. Análisis estadísticos	181
5.3. Resultados	182
5.3.1. <i>Effects of intermittent hypobaric hypoxia exposure on aerobic capacity and running performance in triathletes.....</i>	183
5.3.2. <i>Hematologic response to four weeks of intermittent hypobaric hypoxia in highly trained male triathlon athletes.....</i>	184
5.3.3. <i>Intermittent hypoxia exposure in hypobaric chamber and EPO abuse interpretation.....</i>	186
5.4. Discusión	207
5.4.1. El efecto de la HC-IHE sobre los parámetros fisiológicos	207
5.4.2. El efecto de la HC-IHE sobre el rendimiento deportivo	209
5.4.3. El efecto de la HC-IHE sobre la detección indirecta del abuso de rhEPO	209
5.4.4. El efecto de la HC-IHE sobre la detección directa del abuso de rhEPO	211
6. Conclusiones	213
7. Bibliografía	217
8. Anexos	257
Cuaderno de recogida de datos	259

1. Introducción

1.1. El control antidopaje

El uso indebido de medicamentos en el deporte ha sido evidenciado como un problema creciente durante los últimos 40 años. De acuerdo con la Agencia Mundial Antidopaje (*World Anti-Doping Agency, WADA*), este uso está prohibido y se incluye dentro de la definición de dopaje (Código Mundial Antidopaje de la WADA, 2003). Fundamentalmente, dopaje se describe como el uso de un artificio (sea sustancia o método) potencialmente peligroso para la salud de los atletas o capaz de mejorar su rendimiento, la presencia en el cuerpo de los atletas de sustancias, o el descubrimiento de la utilización de un método incluidos en la lista anexada al Código Mundial Antidopaje (*WADA Prohibited List 2006*).

La lista de sustancias y métodos prohibidos por la WADA (*WADA Prohibited List 2006*), inicialmente configurada por el Comité Olímpico Internacional (COI), es actualizada periódicamente por la WADA (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Clasificación de la lista de sustancias prohibidas en el deporte según el Código Mundial Antidopaje de la WADA (*WADA Prohibited List 2006*).

Structure of the Prohibited List

1. Substances and methods prohibited at all times (in- and out-of-competition)

- | | |
|--|--|
| S1. Anabolic agents | M1. Enhancement of oxygen transfer |
| S2. Hormones and related substances | M2. Chemical and physical manipulation |
| S3. Beta-2 agonists | M3. Gene doping |
| S4. Agents with anti-estrogenic activity | |
| S5. Diuretics and other masking agents | |

2. Substances and methods prohibited in-competition

In addition to the categories S1 to S5 and M1 to M3 defined above, the following categories are prohibited in competition:

- | | |
|----------------|--------------------------|
| S6. Stimulants | S8. Cannabinoids |
| S7. Narcotics | S9. Glucocorticosteroids |

3. Substances prohibited in particular sports

- | | |
|-------------|-------------------|
| P1. Alcohol | P2. Beta-blockers |
|-------------|-------------------|

4. Specific substances

Some of the substances listed in this sections are particularly susceptible to unintentional anti-doping rule violations because of their general availability in medicinal products or are less likely to be successfully abused as doping agents.

Aunque se dan ejemplos de cada una de las sustancias, no pretende ser una lista exhaustiva de fármacos, por lo que la frase “y otras sustancias de similar estructura química o efectos biológicos similares” está incluida en todas las agrupaciones. Dentro de esta lista, se incluyen las hormonas peptídicas (grupo S2, *Hormones and related substances*) (Tabla 1.2).

Tabla 1.2: Descripción del grupo S2 de sustancias prohibidas (*WADA Prohibited List 2006*).

S2. HORMONES AND RELATED SUBSTANCES

The following substances, including other substances with similar chemical structure or similar biological effect(s), and their releasing factors, are prohibited:

1. **Erythropoietin (EPO);**
2. **Growth hormone (hGH), Insulin-like Growth Factor I (IGF-I),
Mecano Growth Factors (MGFs);**
3. **Gonadotrophins (LH, hCG), prohibited in males only;**
4. **Insulin;**
5. **Corticotrophins.**

Unless the *Athlete* can demonstrate that the concentration was due to a physiological or pathological condition, a *Sample* will be deemed to contain a *Prohibited Substance* (as listed above) where the concentration of the *Prohibited Substance* or its metabolites and/or relevant ratios or markers in the *Athlete's Sample* so exceeds the range of values normally found in humans that it is unlikely to be consistent with normal endogenous production.

If a laboratory reports, using a reliable analytical method, that the *Prohibited Substance* is of exogenous origin, the *Sample* will be deemed to contain a *Prohibited Substance* and shall be reported as an *Adverse Analytical Finding*.

The presence of other substances with similar chemical structure or similar biological effect(s), diagnostic marker(s) or releasing factors of a hormone listed above or of any other finding which indicate(s) that the substance detected is of exogenous origin, will be deemed to reflect the use of a *Prohibited Substance* and shall be reported as an *Adverse Analytical Finding*.

1.1.1. Las hormonas peptídicas

Las primeras hormonas peptídicas cuya administración está prohibida en el deporte a causa de sus conocidos o supuestos efectos de mejora del rendimiento físico fueron la hormona gonadotropina coriónica, la hormona de crecimiento (GH) y la eritropoyetina (EPO) (Tabla 1.2). En la actualidad, la prohibición se ha extendido a la utilización de gonadotropinas, corticotropinas, la insulina y factores de crecimiento (*insulin-like growth factor-I* y *mechano growth factors*).

Las hormonas peptídicas son utilizadas en el tratamiento de diversas patologías, en su mayoría aquellas en las que se encuentra afectada la síntesis endógena. Su interés terapéutico llevó al desarrollo de técnicas del ADN recombinante, basadas en la inserción de ADN que codifica para proteínas humanas en el ADN genómico de células animales en cultivo, lo que aumentó de forma drástica su disponibilidad entre 1985 y 1990. El COI no prohibió la utilización de estas hormonas en el deporte hasta 1989, y fueron incluidas como una nueva clase de sustancias dopantes (L. Rivier y M. Saugy, 1999).

En los últimos años, además una mayor producción, el principal factor que ha incrementado la utilización de estas hormonas peptídicas radica en su propia naturaleza biológica. A medida que el control de agentes dopantes tradicionales (como estimulantes y esteroides anabolizantes) se ha hecho más efectivo en orina (J. Segura, 1996; D.H. Catlin y cols., 1997), los deportistas con interés en doparse han dirigido su atención hacia el empleo de proteínas prácticamente iguales a las moléculas endógenas y, por lo tanto, de más difícil detección. En el caso de la GH y la EPO, además, existe una gran variabilidad intra e inter-individual de sus concentraciones y, mientras su eliminación de la circulación se produce en pocos días, sus efectos perduran durante semanas.

Se desconocen datos exactos sobre la utilización de la EPO y la GH en el deporte, pero esta ha sido claramente evidenciada (V.I. Rickert y cols., 1992; M. Bidlingmaier y cols., 2001; H.J. Egleton y T.J. Littlewood, 2003). Hay que remarcar que el uso indebido de estas sustancias en el deporte constituye un riesgo sanitario potencial por el tipo específico de sustancias abusadas, por las dosis elevadas que se pueden administrar y por el efecto añadido del estrés fisiológico presente en competición. Además, en el caso particular de la EPO y de la GH, los efectos de la administración a largo plazo en sujetos sanos son prácticamente desconocidos, ya que el uso indebido de estas sustancias ha sido evidenciado recientemente.

Por otro lado, la utilización de estas proteínas parece no está restringida a los deportistas de élite. Ejemplos de este fenómeno son la oferta de muchas compañías farmacéuticas vía Internet de una gran variedad de preparaciones de la GH, prometiendo espectaculares efectos beneficiosos en adultos sanos, y los numerosos informes realizados de deportistas recreacionales – mayoritariamente culturistas – y estudiantes que proveen de nuevas evidencias sobre la extensión del uso de la GH (V.I. Rickert y cols., 1992; M. Bidlingmaier y cols., 2001).

1.1.2. Estandarización metodológica en el control antidopaje

Uno de los elementos más utilizados en el deporte para tratar de disminuir el empleo de sustancias farmacológicas sin indicación terapéutica es el control analítico (J. Segura y cols., 2000; R.L. Hildebrand y cols., 2003). La Figura 1.1 muestra el proceso a seguir en la detección de un fármaco.

ESTRATEGIA PARA LA DETECCIÓN DE UN FÁRMACO XENOBIÓTICO

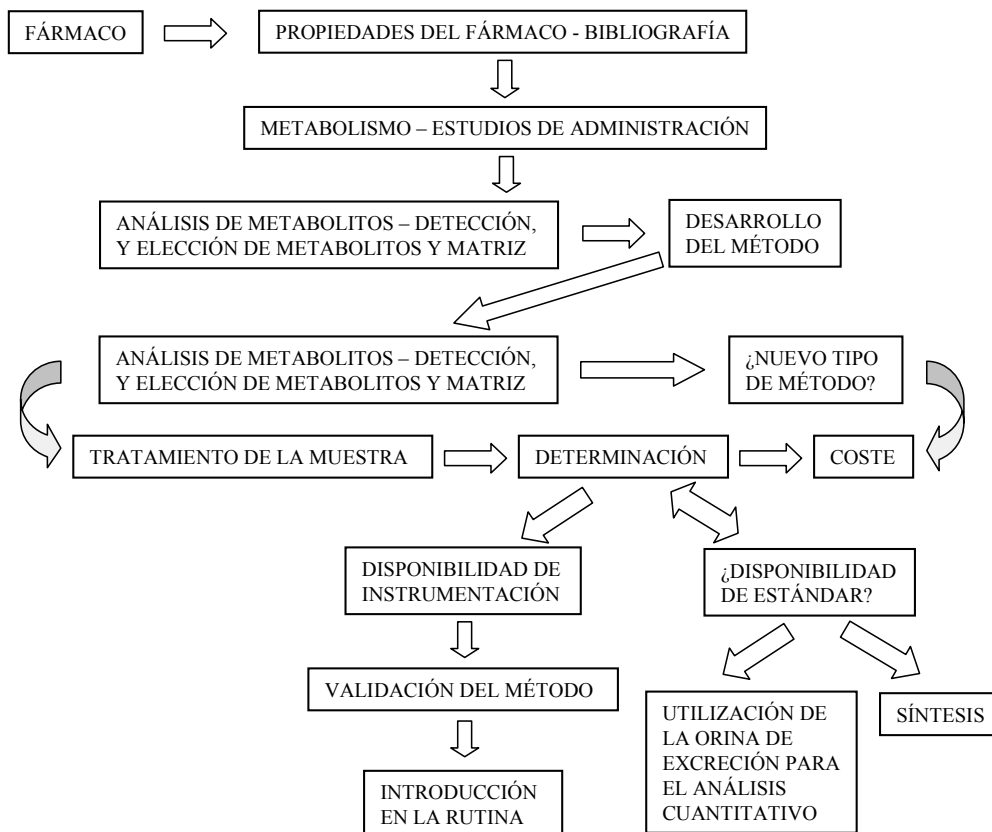


Figura 1.1: Esquema del proceso generalizado a ser considerado en la determinación de un método de análisis para una sustancia dopante (G.J. Trout y R. Kazlaukas, 2004).

Los laboratorios antidopaje, además de ser capaces de realizar el control analítico de las distintas sustancias prohibidas, deben cumplir los requisitos descritos tanto en la Norma ISO/IEC 17025 (1999) de la Organización Internacional para la Estandarización (*International*

Standard Organization, ISO), como en los Estándares Internacionales para Laboratorios (*Internacional Standard for Laboratories, ISL*) de la WADA (WADA *ISL* 2004). Al laboratorio, el cumplimiento de ambas normativas le permite demostrar que dispone de un sistema de gestión de la calidad, que es técnicamente competente, y que es capaz de producir resultados técnicamente válidos e información fiable como evidencia. Además, mediante su participación en ejercicios de intercomparación, que también es capaz de obtener resultados uniformes y armonizados con el resto de laboratorios acreditados por la WADA.

Metabolismo del fármaco

Una vez decidido el fármaco a ser determinado, la siguiente cuestión es qué analitos van a ser analizados (G.J. Trout y R. Kazlauskas, 2004). Algunas sustancias son excretadas sin experimentar cambios en una proporción significativa, mientras que otras son extensivamente modificadas metabólicamente. Por lo tanto, es necesario el conocimiento previo de los procesos biológicos para la identificación de los metabolitos que pueden estar presentes. En el caso de las hormonas peptídicas, no sólo se estudian las posibles modificaciones que éstas pueden experimentar, sino que además se estudian sus efectos sobre el propio organismo; por ejemplo, por medio de cambios en la expresión de otras proteínas (por mecanismos de retroalimentación o activación de la expresión de diversos biomarcadores indirectos).

En el control antidopaje, la detección directa del fármaco y sus metabolitos se considera la forma más correcta y con un mayor valor legal ante un resultado positivo. Sin embargo, en el estudio de las hormonas peptídicas la detección directa tiene, principalmente, dos inconvenientes (F. Minuto y cols., 2003). El primero, y más importante, es su corta vida media en circulación. Se ha demostrado que, mientras que los efectos de estas hormonas peptídicas se prolongan semanas, estas son eliminadas del torrente sanguíneo en pocos días (R.C. Cuneo y cols., 1998; E. Varlet-Marie y cols., 2003). El segundo, la concentración en circulación de las distintas hormonas peptídicas es muy variable dependiendo de factores intra e inter-individuales, y de diversos factores ambientales, lo que dificulta el establecimiento de rangos de normalidad y de concentraciones de corte (N.E. Felsing y cols., 1992; R. Badia y cols., 1992; K. Stokes, 2003). Por ello, en el caso de la EPO y la GH, se han desarrollado métodos de detección basados en marcadores indirectos, influidos por la administración de estas hormonas (J.D.Wallace y cols., 1999; S. Longobardi y cols., 2000; C.J. Gore y cols., 2003).

Importancia de la matriz

Tras el estudio del metabolismo del fármaco, el siguiente paso en la estandarización metodológica es la elección del tipo de matriz (orina, sangre, etc.) a recoger para su detección. El control antidopaje se ha dirigido inicialmente hacia la detección de sustancias exógenas en muestras urinarias (J. Segura, 1996), sin embargo también se han propuesto otras matrices como la sangre, el pelo y la saliva. Para la mayoría de las sustancias, la orina es la mejor de las elecciones ya que su recolección es no invasiva, el volumen disponible es grande y su concentración es superior en orina que en sangre (M.S. Moss y D.A. Cowan, 1986). Sin embargo, en el caso particular de las hormonas peptídicas, la mayoría no son eliminadas de forma eficiente por la orina, por lo que la sangre sería la matriz de elección (J. Segura, 1996).

Otro factor importante en la elección de la matriz es su estabilidad y la de las sustancias a detectar en la misma. Debido al obligado desplazamiento que realizan las muestras desde el punto de recolección hasta el laboratorio de análisis, y la obligación de conservar la muestra hasta 4 meses por si fuera necesario realizar el contraanálisis, las condiciones de transporte y almacenamiento adquieren gran importancia (G. Banfi y A. Dolci, 2003; C. Jiménez y cols., 2004). Por tanto, como no todas las matrices requerirán el mismo tipo de tratamiento, esto influirá también en la elección final de la matriz a analizar.

Elección del método analítico

Los metabolitos que deben ser detectados, su concentración y la matriz condicionan la elección de un procedimiento de extracción, si es necesario, y de la técnica analítica para su determinación. Los procedimientos ideales incluirían procedimientos con una alta eficiencia de extracción de los compuestos de interés así como un método de detección selectivo y sensible (L. Rivier y M. Saugy, 1999; G.J. Trout y R. Kazlauskas, 2004).

Dentro del campo del control antidopaje, se distinguen dos procedimientos que requieren de métodos analíticos con distintas características (WADA *ISL* 2004):

- Procedimiento de cribado:

La detección de una sustancia, metabolito de esta o marcador de su utilización, o de un método, incluidos en la Lista de Sustancias Prohibidas (WADA *Prohibited List* 2006) se realiza mediante el procedimiento de cribado. Los métodos de cribado permiten la detección de un

amplio número de compuestos y/o de sus metabolitos. A cada muestra se aplican diversos procedimientos de cribado que permitan la detección de todas las sustancias prohibidas.

- Procedimiento de confirmación:

Si mediante uno de los procedimientos de cribado se detecta la presencia de una de las sustancias prohibidas, se aplica un método de confirmación específico para la sustancia detectada. El procedimiento de confirmación debe asegurar la identificación y/o cuantificación, y excluir cualquier deficiencia técnica del procedimiento de cribado. El objetivo del ensayo de confirmación es acumular información adicional en referencia a un resultado adverso; por tanto, el procedimiento de confirmación debe tener una mayor selectividad/discriminación que el de cribado.

La espectrometría de masas, acoplada tanto a cromatografía de gases como de líquidos, debe ser el método de elección para el procedimiento de confirmación de un analito específico. En el caso de los inmunoensayos, estos están permitidos en la confirmación de proteínas, péptidos, miméticos y análogos, o marcadores de su utilización. Sin embargo, los inmunoensayos utilizados en la confirmación deben utilizar un método con distinto anticuerpo, y que reconozca un epítipo de la proteína/péptido distinto, al utilizado en el método del procedimiento de cribado.

Proceso de validación del método analítico

De acuerdo con los requisitos de las normas de calidad ISO/IEC 17025 (1999) e ISL (WADA *ISL* 2004), tras la elección del método analítico, y previamente a su utilización rutinaria, es necesaria su validación. El principal objetivo de la validación de un método analítico es demostrar que dicho método es el adecuado al propósito deseado. La utilización de técnicas fiables en la detección de sustancias dopantes constituye un requisito mínimo para la obtención de un resultado que pueda ser utilizado como evidencia médico-legal y que pueda ser exactamente reproducido (F. Minuto y cols., 2003). La validación se enfoca en tres áreas:

- Validación intra-laboratorio

Los resultados obtenidos en la validación intra-laboratorio nos permiten decidir la capacidad concreta de la técnica y su idoneidad en función de las necesidades establecidas en cada campo de estudio (C. Hartmann y cols., 1998; EAEMP, CPMP/ICH/281/95, 1995; EMEA/CVMP/591/98, 1998; ENAC, G-CSQ-02, 1996; FDA/CDER, GI/BMV, 2001). En general, los estudios realizados en la validación intra-laboratorio de una técnica son: la precisión y exactitud intra e inter-

ensayo, la recuperación, el rango de linealidad, el límite de detección y cuantificación, y la especificidad.

- Validación inter-laboratorio

En el caso concreto del control antidopaje, la identificación y/o cuantificación de las sustancias prohibidas obtenida por los distintos laboratorios de todo el mundo debe ser uniforme. La WADA ha diseñado ejercicios de intercomparación (WADA *ISL* 2004, Anexo A) mediante los cuales se evalúa la capacidad individual de los laboratorios participantes y se mejora la uniformidad de resultados analíticos entre laboratorios.

Por tanto, además de la validación intra-laboratorio, es también de gran importancia asegurar la sensibilidad, exactitud y reproducibilidad de los resultados de una técnica realizada en distintos laboratorios; y ello debe ser determinado mediante la realización de una validación inter-laboratorio (FDA/CDER, GI/BMV, 2001).

- Validación inter-técnica

La existencia de distintas técnicas analíticas para la determinación de una misma sustancia requiere de los estudios necesarios que demuestren que las concentraciones determinadas son independientes del método utilizado. Dada esta posibilidad, la validación inter-técnica nos permitiría valorar las posibles discrepancias (FDA/CDER, GI/BMV, 2001).

1.2. La eritropoyetina

La eritropoyetina (EPO) es la principal hormona reguladora de la proliferación y maduración final de los precursores eritroides. El incremento de la masa eritrocitaria aumenta la capacidad de la sangre para transportar oxígeno. La mayor disponibilidad de oxígeno en los tejidos aumenta, en consecuencia, el poder aeróbico máximo y la capacidad atlética. Desde que la EPO se hizo disponible como fármaco estimulador de la eritropoyesis, el abuso por parte de los atletas ha sido denunciado en los deportes aeróbicos (B.J. Spalding, 1991; E. Eichner, 1992).

1.2.1. Biología de la EPO

La EPO es una glicoproteína formada por 165 residuos aminoacídicos que corresponden a un peso molecular de 18.398 Daltons (W. Jelkmann, 2000). La molécula tiene dos uniones disulfuro internas entre los residuos de cisteína 7-161 y 29-33, necesarias para conseguir la estructura terciaria de cuatro hélices alfa unidas de forma anti-paralela que le dan actividad biológica (Figura 1.2). El peso molecular total de la EPO es aproximadamente de 30.400 Daltons debido a las 4 cadenas de carbohidratos unidas por N-glicosilación (Asp 24, 38 y 83) y O-glicosilación (Ser 126). A causa de la heterogeneidad de las cadenas de glúcidos, la EPO es de hecho un conjunto de muchas isoformas diferentes, todas biológicamente activas. Aunque la glicosilación de la EPO no es necesaria para su actividad *in vitro*, se ha demostrado que los ácidos siálicos terminales (ácido N-acetil neuramínico) presentes en la estructura de los oligosacáridos sí lo son para su actividad *in vivo* (E. Delorme y cols., 1992).

La EPO se sintetiza principalmente en las células tubulares de los riñones (L.O. Jacobson y cols., 1957; J.W. Fisher y B.J. Birdwell, 1961; Z. Kuratowska y cols., 1961; E.J. Erslev, 1974). Alrededor de un 10% de EPO circulante se produce en los hepatocitos (W. Fried, 1972); aunque, durante el desarrollo fetal, la producción de EPO en el hígado es de mayor importancia (E.D. Zanjani y cols., 1974).

En condiciones normales, la masa de eritrocitos circulante de un adulto es muy constante. La EPO es el principal controlador de la tasa de eritropoyesis y, por tanto, del mantenimiento del número de eritrocitos capaz de asegurar el correcto aporte de oxígeno a los tejidos. Entre los factores de crecimiento eritropoyéticos, la EPO es el único cuya producción está regulada por un sistema de detección que responde a cambios en la presión parcial de oxígeno (pO_2)

venosa (A. Kurtz y cols., 1988). En el riñón, la utilización de oxígeno está íntimamente relacionada con el flujo sanguíneo, lo que le permite detectar el nivel de oxígeno aportado a los tejidos en todo momento. El mecanismo molecular de producción de EPO parece estar regulado por un factor de respuesta a hipoxia (*hypoxia inducible factor 1*, HIF-1) (G.L. Semenza, 1994; G.L. Semenza y cols., 1994 y 1997). El HIF-1, factor sensible a la oxigenación, no es degradado en condiciones hipóxicas en las que activa la expresión del gen de la EPO.

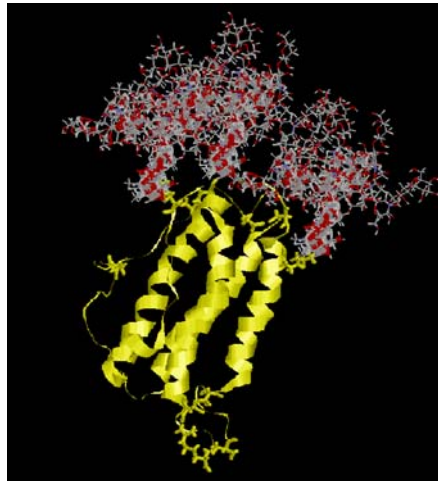


Figura 1.2: Modelo de la estructura glicosilada de la EPO (imagen cedida por R. Gutiérrez).

Además de la pO_2 venosa, se han descrito otros factores capaces de regular la concentración de EPO, entre ellos las hormonas tiroideas, los esteroides anabolizantes y las citoquinas (W. Fried, 1995). La Figura 1.3 ilustra el circuito de control de la eritropoyesis.

Alrededor de tres días después de un incremento agudo de EPO en sangre, la reticulocitosis se hace aparente. Los reticulocitos provienen de una línea celular específica originaria de las células madre en los órganos hematopoyéticos y, una vez en circulación, se convierten en eritrocitos maduros (Figura 1.4) (C.J. Gregory y A.C. Eaves, 1974 y 1978). La EPO controla la producción de eritrocitos mediante la supresión de la muerte celular programada (apoptosis), y la activación de la proliferación y diferenciación de los progenitores eritroides presentes en la médula ósea (M.J. Koury y M.C. Bondurant, 1992). El número de receptores de EPO por célula decrece con la diferenciación a partir de las células formadoras de colonias eritroides (colony-forming unit-erythroid, CFU-E), siendo inexistentes en reticulocitos y eritrocitos (S.T. Sawyer y M.J. Koury, 1987; K. Sawada y cols., 1990; A. Wickrema y cols., 1992).

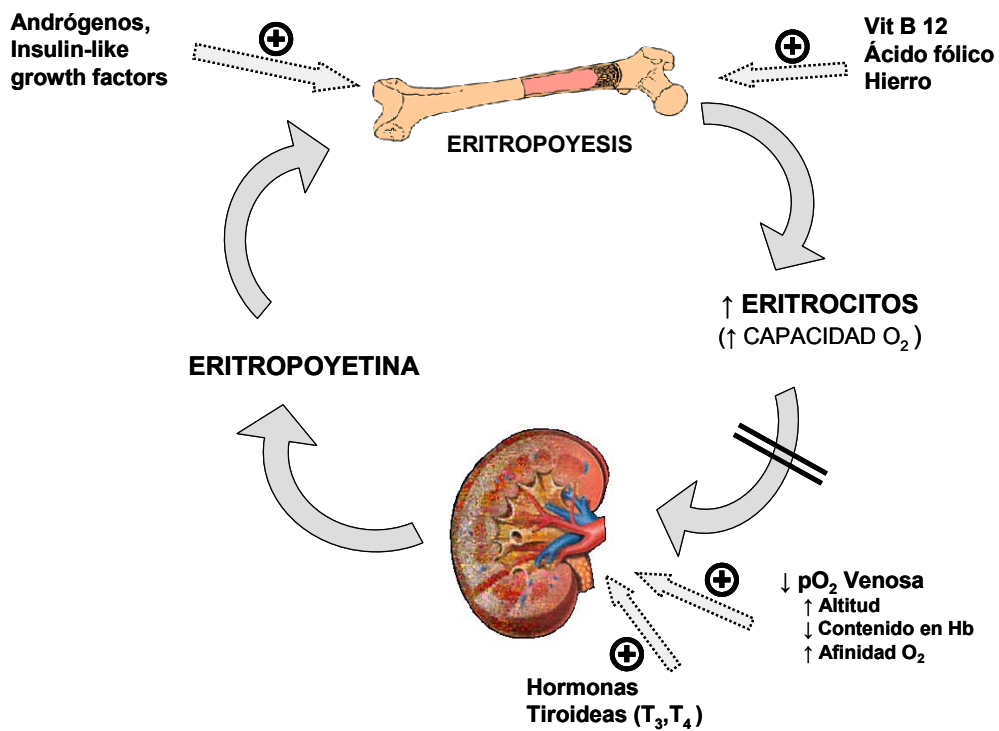


Figura 1.3: Regulación por retroalimentación de la producción renal de EPO basada en el suministro de O₂ a los tejidos, y sitios de acción de otras hormonas de estimulación de la eritropoyesis.

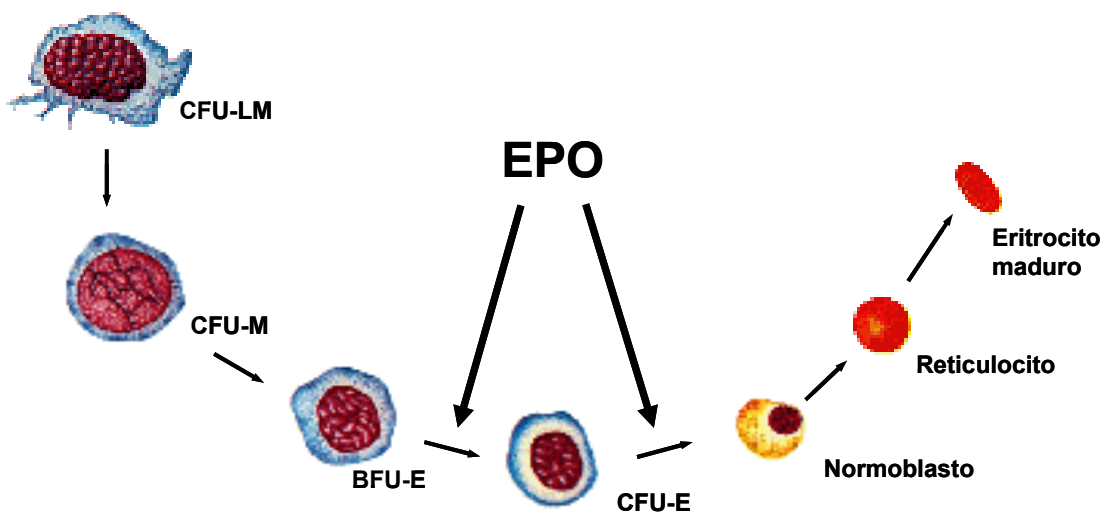


Figura 1.4: Esquema de la eritropoyesis humana. CFU-LM, célula madre linfomieloide; CFU-M, célula germinal mieloide; BFU-E y CFU-E unidades formadoras de colonias de la línea eritroide.

La vida media de la EPO endógena en circulación es de entre 6 y 9 horas. La eliminación de la EPO parece realizarse por tres vías potenciales: excreción a través de los riñones, metabolismo del hígado y consumo de las células progenitoras del eritrocito. Aunque la EPO está presente en la orina, se ha demostrado que la excreción urinaria de 24 horas de EPO es de tan sólo de un 1,75% de la dosis de rhEPO administrada (P. Veng-Pedersen y cols., 1995). Esto indica que la vía de eliminación renal no contribuye de forma significativa a su eliminación. Por otro lado, la EPO desializada es en parte eliminada de la circulación tras unirse a los receptores de galactosa presentes en el hígado (N.M. Fukuda y cols., 1989; I.C. MacDougall y cols., 1999); lo cual coincide con la pérdida de bioactividad de la EPO *in vivo* tras la desialización (E. Delorme, 1992).

1.2.2. Uso terapéutico de la rhEPO

Puesto que la EPO es esencial para una normal eritropoyesis, una baja producción de EPO puede tener como resultado la aparición de anemia. El ejemplo más extendido de este efecto es la anemia producida por un fallo renal en fase terminal. La utilización de la rhEPO se inició en el tratamiento de pacientes con déficit de la hormona; pero se ha extendido progresivamente a otras áreas terapéuticas, entre ellas: el tratamiento de anemias asociadas al SIDA, cáncer y quimioterapia; enfermedades crónicas; anemia aplásica y mielodisplasia; prevención de la anemia en pacientes quirúrgicos; y anemia en bebés prematuros (H.J. Eagleton y T.J. Littlewood, 2003).

El producto farmacéutico (epoetina), obtenido de la expresión del gen humano de la EPO en diferentes líneas celulares (Chinese hamster ovary - CHO, baby hamster kidney - BHK, etc.), contiene exactamente la misma secuencia de aminoácidos, pero se han descrito diferencias en la estructura de los azúcares (V. Skibeli y cols., 2001). Desde 1985, año en que apareció la primera rhEPO comercial, se han diseñado diferentes preparaciones farmacéuticas que difieren en la composición y naturaleza de las cadenas de carbohidratos (Tabla 1.3). Para distinguirlas, se añade una letra griega a la palabra epoetina (α , β , ω ó δ).

Entre las formas α y β las diferencias estructurales son mínimas y los efectos fisiológicos muy similares (A. Gaudard y cols., 2003); sin embargo, la forma ω (menos ácida y de distinta hidrofobicidad) tiene una actividad biológica superior (A. Bren y cols., 2002; R. Deicher y W.R. Horl, 2004). La epoetina δ es la preparación más reciente. La epoetina δ presenta una actividad

biológica muy semejante a la α ; pero su principal particularidad es su origen, pues se produce en una línea celular humana (TKT Products Dynepo[®]).

Tabla 1.3: Los distintos tipos de rhEPO y sus productos comerciales principales y compañías productoras (J.A. Pascual y cols., 2004).

Epoetina α (rhEPO glicofomas con perfil α)	Epoetina β (rhEPO glicofomas con perfil β)
Epoade [®] (Sankyo) Epogen [®] (Amgen) Epopen [®] (Esteve) Epoxitin [®] (Janssen-Cilag) Eprex [®] (Janssen) Erypo [®] (Janssen-Cilag) Espo [®] (Kirin) Globuren [®] (Cilag) Procrit [®] (Ortho Biotech)	Epoch [®] (Chugai) Epogin [®] (Chugai) Eritrogen [®] (Roche) Erantin [®] (Boehringer Mannheim) Marogen [®] (Chugai) Neorecormon [®] (Roche) Recormon [®] (Boehringer Mannheim)
Epoetina ω (rhEPO glicofomas con perfil ω)	Epoetina δ (rhEPO glicofomas con perfil δ)
Epomax [®] (Elanex) Hemax [®] (Elanex)	Dynepo [®] (Aventis Pharma)

Un análogo directo de la rhEPO es la darbepoetina, también conocida como NESP (*new erythropoiesis-stimulating protein*) (D.K. Overbay y H.J. Manley, 2002; A. Gaudard y cols., 2003). El diseño de la NESP se basa en el importante papel que juega el contenido de ácidos siálicos en la protección de la molécula de EPO frente a su metabolismo. La NESP tiene 5 aminoácidos cambiados de la originaria cadena polipeptídica de la EPO lo que le permite la formación de 2 cadenas de N-oligosacáridos adicionales. Las dos cadenas de carbohidratos aumentan el peso molecular de la glicoproteína hasta aproximadamente 38 kDa. El resultado es una molécula con un tiempo de vida media muy superior que permite, para un efecto similar, una administración menos frecuente. En la actualidad, este producto es comercializado bajo el nombre Aranesp[®].

Se han realizado numerosos estudios farmacocinéticos de administración de rhEPO por vía intravenosa, intraperitoneal y subcutánea; y la información acumulada evidencia que es la vía subcutánea la ruta de administración con mayores ventajas (E. Varlet-Marie y cols., 2003). Comparado con la vía intravenosa, la administración por vía subcutánea se caracteriza por una fase de absorción prolongada (los picos se alcanzan entre 12-30 h), unos valores máximos

inferiores (aproximadamente el 5% de los observados para la administración intravenosa), inferior biodisponibilidad (20-40%), y una vida media de eliminación más prolongada (entre 1 y 3 días). A pesar de su reducida biodisponibilidad, el tratamiento por vía subcutánea resulta en un incremento más sostenido y con menos fluctuaciones, de forma que se requieren dosis inferiores de rhEPO para mantener las concentraciones deseadas de hemoglobina.

1.2.3. Utilización de la rhEPO en el deporte

El rendimiento físico en el deporte está determinado fundamentalmente por factores fisiológicos, siendo el poder máximo aeróbico uno de los más importantes, sobretodo en los deportes de resistencia. Tanto el volumen sanguíneo como la masa de eritrocitos son importantes para determinar el poder máximo aeróbico. A pesar de que el ejercicio físico regular incrementa el volumen sanguíneo y la masa de eritrocitos, en el deporte también se han utilizado otros medios no legales con el mismo fin (M. Ashenden, 2002). La transfusión sanguínea y la administración de activadores de la eritropoyesis (rhEPO o NESP) son capaces de producir importantes incrementos en la masa de eritrocitos. Paralelamente, se ha detectado la utilización de hemoglobinas modificadas como estrategia para aumentar el transporte de oxígeno y el poder máximo aeróbico (B. Corrigan, 2002).

Los efectos ergogénicos de la rhEPO han sido claramente demostrados. Estudios de administración de rhEPO en atletas de élite y recreacionales han mostrado una mejora de la capacidad aeróbica máxima y submáxima, junto con el aumento del hematocrito y la concentración de hemoglobina (B. Ekblom y B. Berglund, 1991a y b; B. Ekblom, 1998; K.I. Birkeland y cols., 2000; G. Rusell y cols., 2002; P. Connes y cols., 2003). En estos estudios también se observó una disminución de las pulsaciones cardíacas y un aumento del volumen de oxígeno por latido durante el ejercicio submáximo. Junto con la mejora del rendimiento físico en el ejercicio de resistencia, también se observó la disminución de la acumulación de lactato en el ejercicio intermitente de alta intensidad.

Hay que tener en cuenta, sin embargo, que la utilización de la rhEPO en sujetos sanos no está libre de riesgo a pesar de no ser tan invasiva como la transfusión sanguínea. A diferencia de la transfusión sanguínea donde la masa eritrocitaria incrementada es conocida, la rhEPO tiene efectos variables a lo largo del tiempo y puede llegar a aumentar el hematocrito hasta niveles peligrosos. Se ha alegado que la muerte de algunos ciclistas de élite ocurrida entre 1987 y 1990 se debe al abuso de la rhEPO.

En pacientes tratados con rhEPO, el principal efecto secundario descrito es la hipertensión, además de convulsiones, incrementos de la concentración de potasio y urea en suero, y aumento del riesgo de trombosis. En deportistas, una excesiva eritrocitemia puede llevar al incremento de la viscosidad sanguínea, y causar trombosis venosas, embolia pulmonar, trombosis coronaria o incluso trombosis cerebral, efectos que pueden verse exacerbados con el aumento severo del hematocrito por deshidratación provocada por el ejercicio intenso (D.J. Shaskey y G.A. Green, 2000).

Una práctica común, en conjunción con la administración de rhEPO, es la administración de hierro a los atletas. Concentraciones de ferritina superiores a 1000 ng/mL han sido detectadas en numerosos ciclistas profesionales (M. Cazzola, 2000). Esta práctica asegura unos niveles mínimos de hierro, necesarios para una eritropoyesis eficiente tras la estimulación con rhEPO. Sin embargo, concentraciones de hierro tan elevadas pueden ser suficientes para causar daños en órganos similares a los observados en la hemocromatosis.

1.2.4. Detección del abuso de rhEPO

Desde la prohibición de la rhEPO por la Comisión Médica del COI en 1990, se han propuesto diversos métodos para la detección de su utilización por parte de los deportistas. La aproximación simple y convencional basada en detectar concentraciones por encima de los valores poblacionales de la concentración de EPO no es apropiada. Desafortunadamente, los valores poblacionales de EPO muestran una amplia distribución con grandes variaciones inter-individuales. Además, la concentración de EPO reacciona a condiciones de hipoxia, siendo muy sensible a la altitud o a determinadas patologías (anemia férrica, problemas renales, etc.) dificultando el establecimiento de una concentración de corte aceptable (R. Badia y cols., 1992).

Detección directa de rhEPO

La producción de la rhEPO a partir del ADN recombinante asegura la obtención de una cadena polipeptídica idéntica a la original, pero no con las mismas modificaciones post-traduccionales. A diferencia de los procesos de traducción, altamente conservados, los procesos de modificación post-traduccionales de las proteínas son específicos de especie, tipo celular y dependientes del estado fisiológico. Cada tipo celular expresa un arsenal enzimático distinto que actúa en este proceso; de forma que, por ejemplo en los procesos de glicosilación, las cadenas

de glúcidos son diferentes según el tipo celular, pudiendo variar tanto en número como en el tipo de unión y su composición. Las diferencias en la composición de carbohidratos entre la rhEPO y la EPO endógena tienen como resultado cambios en la carga final de la molécula a pHs determinados. La distinta movilidad electroforética en geles de agarosa observada entre la rhEPO y la EPO endógena, presentes en suero y orina, permitió una primera aproximación a la detección directa de la rhEPO (L. Wide y C. Bengsson, 1990; L. Wide y cols., 1995). Sin embargo, esta técnica era de limitada aplicabilidad por su coste, laboriosidad y baja sensibilidad.

Posteriormente, la distinta carga de la rhEPO y la EPO endógena fue evidenciada basándose en el correspondiente patrón de bandas producido bajo la influencia de un campo eléctrico (F. Lasne y J. de Ceaurriz, 2000; F. Lasne y cols., 2001; F. Lasne y cols., 2002). Aunque la EPO endógena y la rhEPO tienen las mismas posiciones de glicosilación, la rhEPO parece tener un número diferente de ácidos siálicos en sus cadenas de carbohidratos (V. Skibeli y cols., 2001). El método utiliza el gel de isoelectroenfoque para separar las distintas isoformas en función del punto isoelectroforético. Una vez separadas, son transferidas del gel a una membrana (*blotting*), donde ambas EPO, natural y recombinante, son reconocidas por un anticuerpo monoclonal. Subsiguientemente, el anticuerpo es transferido a una segunda membrana y es reconocido por un segundo anticuerpo unido a un enzima que produce una reacción quimioluminiscente. Como resultado de la detección de la luz, se obtiene una imagen de las bandas por las que la EPO puede ser reconocida. Utilizando este método, puede observarse que la EPO endógena produce un patrón de bandas diferente ("más ácidas") que las obtenidas cuando se analiza la rhEPO (Figura 1.5). Desde el punto de vista analítico, este mismo método directo puede ser utilizado en el caso del análogo NESP. En este caso, las bandas correspondientes a las isoformas de la NESP pueden ser detectadas en un área mucho más ácida que la de la EPO endógena. Tras un amplio estudio inter-laboratorio (J.A. Pascual y cols., 2002), el criterio de evaluación de los resultados de estos análisis se encuentra descrito en el WADA Technical Document (TD2004EPO) y se basa, en general, en la co-localización de las bandas más intensas de la EPO presente en una muestra de orina en el área definida por los estándares recombinantes (Figura 1.5).

En la actualidad, este es el único método reconocido por la WADA para la detección de la rhEPO y análogos, siendo un resultado positivo obtenido en orina una prueba definitiva de la utilización de rhEPO. La completa eficacia del método se pondrá a prueba en un futuro próximo con la comercialización de la epoetina δ que proviene de una línea celular humana y, por tanto, con propiedades fisicoquímicas que pueden ser muy similares a la EPO endógena.

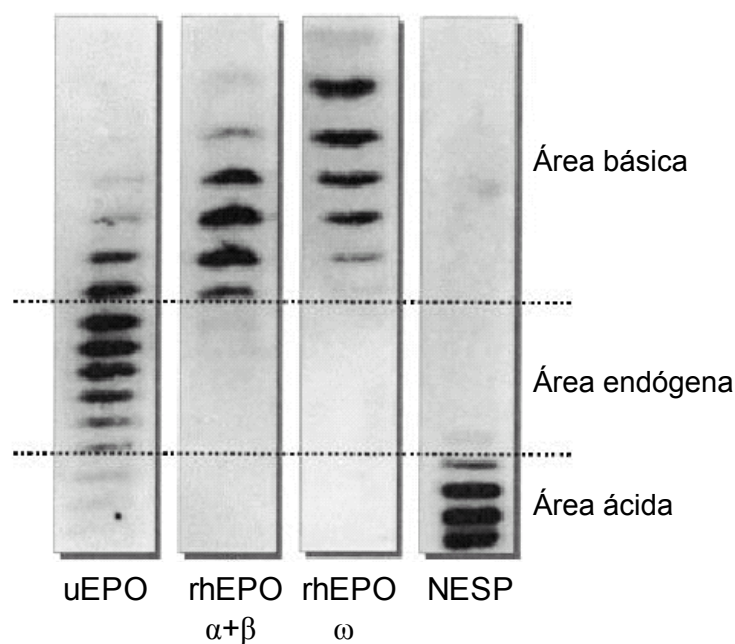


Figura 1.5: Evaluación visual de las isoformas de los distintos tipos de EPO desarrolladas tras de la aplicación del isoelectroenfoque seguido de *double blotting* y detección quimioluminiscente. uEPO: estándar de EPO endógena urinaria, rhEPO $\alpha+\beta$: estándar de rhEPO mezcla de las formas α y β ; rhEPO ω : estándar de rhEPO de la forma ω ; NESP: darbepoetina. (J.A. Pascual y cols., 2004)

Los nuevos avances en el estudio de la composición de los carbohidratos unidos a proteínas están abriendo un campo de gran interés en el mundo del control antidopaje por su aplicabilidad a la detección de la rhEPO. La espectrometría de masas utilizando las técnicas de electroespray (K.B. Linsley y cols., 1994), MALDI (*matrix-assisted laser desorption ionization*) (H. Rahbeck-Nielsen y cols., 1997), y MALDI-TOF (*time of flight*) (E. Llop y cols., 2004), junto con la electroforesis capilar (H.-G. Zhou y cols., 1998), han sido utilizadas en el estudio de la heterogeneidad específica de la EPO mediante la separación de las distintas isoformas y la monitorización de las variaciones dependientes de cada origen. La sensibilidad para muestras de orina es, sin embargo, insuficiente en la actualidad.

Detección indirecta de rhEPO

En el intento de evidenciar el abuso de la rhEPO en el deporte, se ha seguido una aproximación complementaria mediante la utilización de sustancias o parámetros biológicos afectados por la administración de esta sustancia prohibida. La aproximación indirecta se

sustenta en una menor laboriosidad metodológica y en el intento de contrarrestar la incapacidad de detectar de forma directa la rhEPO en orina tras unos pocos días de la última administración (A. Breidbach y cols., 2003; G. Nissen-Lie y cols., 2004), aunque su efecto ergogénico sobre la capacidad aeróbica máxima perdure hasta 3 semanas (K.I. Birkeland y cols., 2000).

Los métodos indirectos requieren de la extracción de sangre, pues algunos de los parámetros se determinan en sangre total y otros en suero. El mayor inconveniente del método indirecto es la imposibilidad de tener una segunda muestra para el contraanálisis a causa de la inestabilidad de los parámetros determinados en la sangre total (hematocrito, concentración de hemoglobina, etc.). Sin embargo, a pesar de estos problemas, los métodos propuestos son rápidos y relativamente baratos de forma que pueden ser efectivamente utilizados con propósitos de escrutinio (G. Lippi y G. Guido, 2000).

En la actualidad, algunas federaciones deportivas utilizan el análisis de hematocrito, hemoglobina y reticulocitos en muestras de sangre de forma rutinaria. Hay que tener en cuenta que niveles elevados de estos parámetros pueden ser indicativos del abuso de la rhEPO, pero no constituyen una prueba de su utilización (P.C.J. Vergouwen y cols., 1999; W. Schmidt y cols., 2000; Y.O. Schumacher y cols., 2000; R. Parisotto y cols., 2000). Por ello, su utilización se limita a la desautorización del deportista a competir. Así, en caso de sobrepasar los límites establecidos, a los atletas se les impide competir basándose en el riesgo sanitario que ello conllevaría. Sin embargo, dos son los principales inconvenientes del establecimiento de límites. El primero, la posible injusta desautorización de deportistas con niveles fisiológicamente altos (Y. O. Schumacher y cols., 2002a y b). El segundo, el hecho de que la adopción de límites puede, paradójicamente, generar más dopaje sanguíneo. Estudios recientes realizados en esquiadores de fondo sugieren la utilización de sistemas artificiales de dopaje sanguíneo con la intención de acercarse a los límites establecidos pero sin sobrepasarlos (T. Videman y cols., 2000; J. Stray-Gundersen y cols., 2003).

Con la intención de mejorar la especificidad de la detección, se han buscado aquellos parámetros menos sujetos a variaciones inter-individuales y más sensibles a la aceleración de la síntesis eritropoyética. Una primera aproximación a la detección indirecta de la administración de rhEPO fue el estudio de los porcentajes de eritrocitos macrocíticos (volumen corpuscular medio, MCV > 128 fl) hipocrómicos (hemoglobina corpuscular media, MCH < 28 pg), porcentaje que se incrementaba hasta ocho veces tras la administración (I. Casoni y cols., 1993). A pesar

de que esta técnica demostraba una buena especificidad (0% de falsos positivos), estaba limitada por su baja sensibilidad (más del 50% de falsos negativos).

El receptor soluble de la transferrina (sTfR), proteína liberada al torrente sanguíneo por los progenitores eritroides, también ha sido propuesto como biomarcador indirecto ya que su concentración incrementa de forma significativa como resultado de la administración de rhEPO y se mantiene elevada hasta 14 días de finalizado el tratamiento (G. Gareau y cols., 1994 y 1996; F. Bresolle y cols., 1997; M. Audran y cols., 1999; K.I. Birkeland y cols., 2000). Para evitar la posible influencia de la hemoconcentración producida por el ejercicio intenso, se propuso la utilización del porcentaje sTfR/ferritina (sTfR/fr) o sTfR/proteínas séricas (G. Gareau y cols., 1996; K.I. Birkeland y cols., 2000). La relación sTfR/proteínas séricas pretende evitar la utilización de ferritina, pues la suplementación con hierro (práctica habitual en los deportistas) puede afectar la concentración sérica de ferritina (M. Audran y cols., 1999).

La investigación más reciente en el campo de la detección indirecta de la rhEPO ha producido diversos modelos matemáticos que consisten en la combinación de variables hematológicas y séricas, marcadores de una eritropoyesis alterada. La utilización de más de un parámetro pretende minimizar las variabilidades inter-individuales y disminuir la probabilidad de obtener falsos positivos (R. Parisotto y cols., 2000 y 2001; M. Magnani y cols., 2001; C.J. Gore y cols., 2003). Los distintos modelos multiparamétricos propuestos se basan en técnicas hematológicas habituales; a excepción del modelo descrito por M. Magnani y colaboradores (2001), en el cual se propone la determinación del RNA mensajero de la β -globina por técnicas de PCR cuantitativo.

Una aproximación paralela a la búsqueda de un método de detección del dopaje sanguíneo es el "pasaporte hematológico". Esta alternativa se basa en el establecimiento de rangos de referencia específicos para cada atleta a base de la evaluación secuencial de distintos parámetros hematológicos (eritrocitos, reticulocitos, hemoglobina, hematocrito, ferritina, sTfR, etc.) que permitirían la definición de un perfil hematológico individual. Un estudio piloto realizado en 923 futbolistas profesionales (L. Malcovati y cols., 2003), permitió observar que la variación intra-individual de estos parámetros era inferior al 10%; por tanto, incrementos superiores a este 10% podían considerarse no fisiológicos.

I. Modelos de detección de la eritropoyesis acelerada

El estudio en deportistas recreacionales de ambos sexos, procedentes de diferentes etnias y nacionalidades, permitió la identificación de los parámetros fisiológicos que mostraban una mayor respuesta a la administración de rhEPO (R. Parisotto y cols., 2000 y 2001). Utilizando estos parámetros se desarrollaron modelos matemáticos que incluían variables determinadas en sangre total (hematocrito, hematocrito de reticulocitos y porcentaje de eritrocitos macrocíticos) y en suero (EPO y sTfR). Los dos modelos propuestos (ON, detección durante la administración, y OFF, detección tras el cese de la administración) proveían de valores capaces de diferenciar con alta efectividad a los individuos administrados con rhEPO de los que no lo eran; en el caso del modelo OFF, hasta periodos de entre 1 y 3 semanas tras el fin de la administración.

Las ecuaciones de los dos modelos diseñados fueron:

$$ON = 3,721 \text{ Hct} + 30,45 \text{ retHct} + 0,1871 \ln [EPO] + 0,1267 \ln [sTfR] + 0,115 \ln (\%macro + 0,1)$$

$$OFF = 6,149 \text{ Hct} - 92,87 \text{ retHct} - 0,1463 \ln [EPO]$$

Siendo Hct el hematocrito, retHct el hematocrito de los reticulocitos, y %macro el porcentaje de macrocitos.

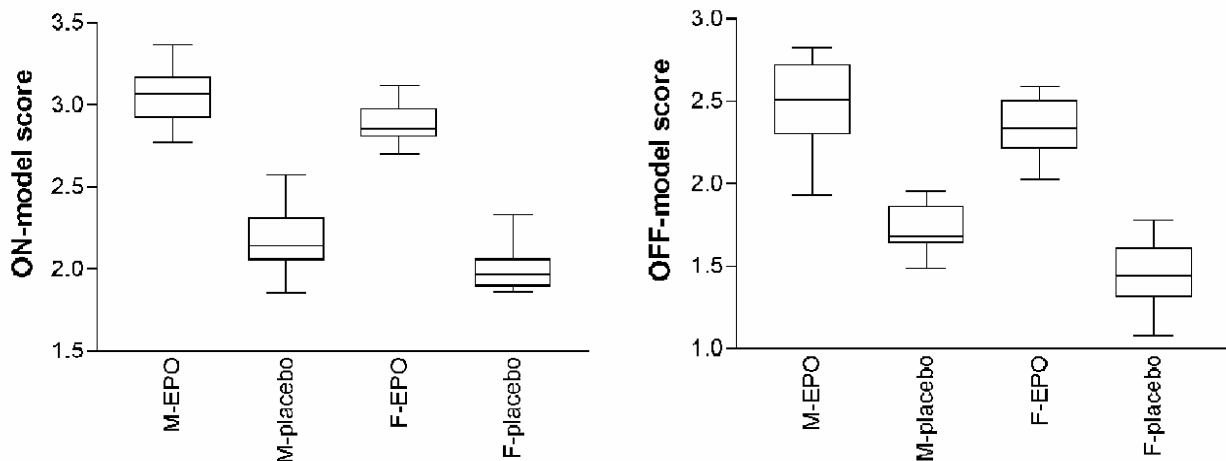


Figura 1.6: Boxplot de los modelos ON y OFF procedentes del estudio de administración de rhEPO (N=25 rhEPO, N=28 placebo) en hombres (M) y mujeres (F). La línea que cruza la parte central de cada caja indica la mediana. La caja indica los inter-cuartiles (25%-75%), las líneas verticales muestran el rango absoluto. (R. Parisotto y cols., 2001)

En estos estudios se confirmó que la administración de rhEPO causaba una respuesta hematológica predecible y reproducible, y dependiente del sexo (Figura 1.6). La dependencia del género se tuvo en cuenta en el establecimiento de distinto punto de corte para cada sexo para las mismas ecuaciones. Con la intención de determinar los valores de referencia para la población atlética y establecer los puntos de corte correctos, los estudios se complementaron con otro estudio internacional en el que participaron casi 1200 deportistas de élite (K. Sharpe y cols., 2002).

Ambos modelos (ON y OFF), junto con los valores de hematocrito, fueron utilizados en las Olimpiadas de Sydney 2000 como test de escrutinio. A aquellos atletas que superaban el punto de corte descrito para alguno de los dos modelos (ON u OFF), se les recogía muestras de sangre y orina en dos nuevas ocasiones durante un periodo de seguimiento de entre 10 y 15 días. En combinación con el test confirmatorio de detección directa de la rhEPO por IEF en muestras de orina, las muestras de sangre eran reanalizadas para ON y OFF. Además, con la intención de detectar todos los posibles protocolos de administración de rhEPO, se determinaba también la diferencia entre los valores obtenidos para estos modelos en los distintos tiempos de recolección. La diferencia entre los valores obtenidos para el modelo ON de dos muestras recogidas a distinto tiempo se describió como el modelo CHANGE. Este modelo tenía como finalidad detectar a aquellos atletas que habían sido administrados con rhEPO en el momento de la obtención de la primera muestra de sangre y, luego, paraban su utilización durante el período de seguimiento al que eran sometidos.

Los primeros modelos descritos por R. Parisotto y colaboradores en 2001 utilizaban parámetros sanguíneos que se basaban en el volumen celular, de forma que podían verse afectados por las condiciones de transporte y almacenamiento de las muestras. Por esta razón, una segunda generación de ecuaciones fue desarrollada con el propósito de evitar el efecto de los cambios en el volumen celular (C.J. Gore y cols., 2003). Estos modelos eran más sencillos y estables, y tenían más sensibilidad a bajas dosis de rhEPO, junto con una buena retrospectiva tras el periodo de administración. Las nuevas ecuaciones diseñadas para cada modelo incluyeron la concentración de hemoglobina (Hb) y el porcentaje de reticulocitos (%ret) en sangre total, y la concentración de EPO y de sTfR en suero:

$$\text{ON he} = \text{Hb} + 9.74 \ln[\text{EPO}] \quad / \quad \text{ON hes} = \text{Hb} + 6.62 \ln[\text{EPO}] + 19.4 \ln[\text{sTfR}]$$

$$\text{OFF hr} = \text{Hb} - 60\sqrt{\%ret} \quad / \quad \text{OFF hre} = \text{Hb} - 50\sqrt{\%ret} - 7 \ln[\text{EPO}]$$

Siendo \ln el logaritmo natural, Hb la concentración de hemoglobina en g/L, % ret el tanto por ciento de reticulocitos, [EPO] la concentración de eritropoyetina en IU/L, y [sTfR] la concentración del receptor soluble de la transferrina en mg/L.

La diferencia entre las ecuaciones *he* (Hb y EPO) y *hes* (Hb, EPO y sTfR) de ON, ó *hr* (Hb y %ret) y *hre* (Hb, %ret y EPO) de OFF, propuestas por C.J. Gore y colaboradores (2003) se encuentra en los parámetros a determinar para cada una de ellas. Un mayor número de parámetros mejora la eficiencia de detección, pero aumenta su coste. La selección final de la ecuación a aplicar para cada modelo será un compromiso entre el coste de reactivos, la disponibilidad del equipo y la eficiencia de detección.

En estos nuevos modelos se observó que los efectos más influyentes eran la altitud en todos los parámetros, la etnia en el sTfR y el ejercicio de resistencia en la hemoglobina. Factores como la hipoxia en altitud, el entrenamiento o la propia genética del individuo pueden verse asociados a una eritropoyesis acelerada, lo que podría llevar a conclusiones erróneas sobre el abuso de la rhEPO. Estudios posteriores han demostrado que estos modelos son estables ante desórdenes hematológicos observados en atletas de élite (R. Parisotto y cols., 2003). En el caso de los factores ambientales, concretamente la hipoxia provocada por la altitud, la influencia sobre los modelos es variable dependiendo del tipo de protocolo de altitud utilizado (altitud real o simulada, hipoxia continua o intermitente, tiempo de exposición, etc.) y sus efectos finales sobre el sistema hematopoyético (M.J. Ashenden y cols., 2003 y 2004a).

Los puntos de corte descritos para cada una de las ecuaciones de la segunda generación tienen en cuenta, además del sexo, el efecto de la altitud y del ejercicio de resistencia (C.J. Gore y cols., 2003). La aplicación de estos modelos a distintos protocolos de administración ha demostrado una mayor eficacia de detección del modelo OFF respecto al ON (P. Connes y cols., 2004). En la actualidad, la Unión Ciclista Internacional (UCI) utiliza el modelo OFF hr en sus test sanguíneos de control médico. Además, la Organización Nacional Anti-dopaje Australiana está llevando a cabo estudios longitudinales de las variables hematológicas y de los valores de los modelos indirectos con la intención de detectar atletas con aumentos no fisiológicos en su producción de eritrocitos. Una reciente publicación de K. Sarpe y colaboradores (2006) coincide en que la monitorización longitudinal de los perfiles hematológicos de los atletas (en concreto, de la concentración de Hb y del modelo OFF hr) es una herramienta más útil en la detección del doping sanguíneo que la aplicación de puntos de corte derivados de estudios poblacionales.

En la aplicación de modelos hay que destacar la variabilidad asociada al tipo de ensayos utilizados en la determinación de cada uno de los parámetros. Además de que incluso los

immunoensayos estandarizados sufren de variaciones debidas a diferencias en los anticuerpos, la falta de armonización en la estandarización del sTfR y en la determinación de los reticulocitos dificultan la aplicabilidad de los modelos de detección del abuso de la rhEPO. En concreto, se han observado variaciones en los valores obtenidos en la determinación de los reticulocitos utilizando distinto analizador hematológico tanto en muestras de pacientes como de deportistas de élite (M.J. Ashenden y cols., 2004b y c).

II. Concentraciones poblacionales de EPO sérica

La variabilidad inter-individual de la concentración de EPO dificulta el establecimiento de unos rangos de normalidad y su aplicación en la identificación directa de las muestras. Sin embargo, pese a no ser en solitario un parámetro de potencia suficiente, el valor de concentración de EPO sérica ha sido seleccionado como uno de los biomarcadores indirectos del abuso de la rhEPO.

Factores intra e inter-individuales

a) Rangos de normalidad

Las concentraciones de EPO se expresan habitualmente en Unidades Internacionales (*Internacional Units*, IU) como medida de la actividad biológica *in vivo* (L. Annable y cols., 1972), y se considera que 1 IU corresponde a 7,6 ng de EPO. La concentración de EPO en sujetos sanos se ha descrito de distribución logarítmica normal, con una media alrededor de 15 mIU EPO/mL y unos límites de confianza del 95% entre 10 y 30 mIU/mL (Sherwood y Goldwasser, 1979; Cotes, 1982). No se han observado diferencias relacionadas con el género (Cotes, 1982; Kendall y cols., 1991), ni está afectada por el ciclo menstrual (Cotes y cols., 1983). Durante el embarazo, la concentración de EPO aumenta a partir del día 70 de gestación hasta el parto. Niños de un mes de edad presentan concentraciones de EPO inferiores a los adultos; sin embargo, hacia los tres meses de edad, la concentración se eleva a la de adultos (M. Hellebostad y cols., 1988).

Existen discrepancias sobre la existencia o no de ritmo circadiano en la concentración de EPO. Mientras unos autores no han encontrado variaciones (D. Roberts y D.J. Smith, 1996), otros han demostrado su existencia y que ésta no estaba influida ni por la edad (P. Pasqualetti y R. Casale, 1996 y 1997), ni por la actividad física o la altitud (T. Klausen y cols., 1993 y 1996).

b) Estados patológicos

Se han observado niveles disminuidos de EPO en pacientes con policitemia vera, anemia renal, artritis reumatoide, en hemodiálisis, e inflamaciones crónicas. La concentración de EPO se encuentra incrementada en síndromes mielodisplásicos, presencia de quistes en los riñones, fiebre de altitud, respuesta a hipoxia causada por insuficiencia cardiaca o pulmonar, hemoglobinopatías de alta afinidad, anemias causadas por desórdenes hemolíticos, colitis ulcerosa, pérdidas agudas de sangre, y anemia por deficiencia de hierro (W. Fried, 1995).

Un estudio de las anomalías hematológicas en deportistas de élite observó que las patologías más frecuentes de esta población eran las anemias por deficiencia de hierro y las hemoglobinopatías, junto con algún caso muy esporádico de esferocitosis hereditaria (R. Parisotto y cols., 2003). Sin embargo, cabe destacar que, de todos los casos estudiados (N=34), tan sólo dos de ellos (ambos anemias por deficiencia de hierro) obtuvieron valores de EPO elevados (>30 mIU/mL).

Factores ambientales

a) Ejercicio

Diversos autores han discutido sobre la influencia del ejercicio en la concentración de EPO en suero. En deportistas de élite, la concentración de EPO en condición basal se encuentra comprendida entre los niveles de normalidad descritos para la población sedentaria sana (K. Sharpe y cols., 2002). La comparación de los atletas de resistencia con controles sedentarios ha demostrado concentraciones similares entre ambos grupos (B. Berglund y cols., 1988; L.M. Weight y cols., 1992; T. Klausen y cols., 1993; Y.O. Schumacher y cols., 2003). Dentro de la población deportiva masculina, se han observado concentraciones de EPO superiores en los atletas de resistencia (K. Sharpe y cols., 2002 [Apéndice]).

Estudios realizados para determinar el efecto del ejercicio de resistencia han mostrado concentraciones de EPO post-ejercicio iguales (W. Schmidt y cols., 1991; L.M. Weight y cols., 1992; A.F. Remacha y cols., 1994; N. Robinson y cols., 2003) o ligeramente incrementadas (E. De Paoli Vitali y cols., 1988; H.J. Schwandt y cols., 1991; Y.O. Schumacher y cols., 2003). Respecto a los valores pre-ejercicio, la disminución en la concentración de EPO sólo ha sido descrita en condiciones extremas de prolongado estrés físico junto con la privación de fluidos y alimentos (H.-C. Gunga y cols., 1996).

b) Altitud

La respuesta fisiológica natural a la hipoxia es la estimulación de la eritropoyesis, vía la síntesis de EPO, para mantener los niveles correctos de oxigenación en los tejidos. Este aumento adaptativo de la masa eritrocitaria ha promovido que deportistas, especialmente de resistencia, hayan utilizado el entrenamiento en altitud como método ergogénico durante las últimas décadas (R.L. Wilber, 2004).

Estudios realizados en altitud real han demostrado importantes incrementos en la concentración de EPO en respuesta tanto a altitudes moderadas [~ 2.000 m] (H.-C. Gunga y cols., 1994) como altas [>4.000 m] (J.-P. Richalet y cols., 1994; M. Bonfichi y cols., 2000). En la exposición continuada, tras un primer gran incremento, la concentración de EPO vuelve a la normalidad una vez consolidada la adaptación a altitud mediante una respuesta eritropoyética efectiva (J.-P. Richalet y cols., 1994; K. Heinicke y cols., 2003). Esta adaptación explica la similitud entre las concentraciones de EPO de individuos que viven a distintas altitudes (K. Heinicke y cols., 2003).

Con la intención de asegurar un entrenamiento eficiente (pues la reducción del intercambio máximo de oxígeno en altitud obliga a reducir la intensidad del entrenamiento) y la estimulación de la secreción de EPO, se han diseñado diversos protocolos de exposición a hipoxia. Una aproximación reciente a la altitud convencional es la estrategia *live high-train low*, que consiste en que los atletas viven y duermen en un ambiente hipóxico, pero entrenan a nivel del mar (B.D. Levine y J. Stray-Gundersen, 1997; J. Stray-Gundersen y cols., 2001; B.D. Levine, 2002; J.V. Brugniaux y cols., 2006). La utilización de estos protocolos ha permitido obtener concentraciones de EPO aumentadas, pero que, al igual que en la altitud crónica, se normalizan a lo largo del protocolo.

Para evitar la necesidad de campos de entrenamiento en las montañas, se han diseñado protocolos de exposición a hipoxia (altitud simulada) consistentes en la reducción del contenido parcial de oxígeno del aire de inspiración mediante el incremento del contenido de nitrógeno. Entre los más destacados se encuentra la hipoxia normobárica en *altitude houses* o tiendas hipóxicas (H.K. Rusko y cols., 1995; M.J. Ashenden y cols., 2000; B. Berglund y cols., 2002); la utilización de cámaras hipobáricas (C.H. Gleiter y cols., 1997; F.A. Rodríguez y cols., 1999; M. Casas y cols., 2000; F.A. Rodríguez, 2002); y la utilización de máscaras, con las que se alternan periodos de hipoxia/normoxia (C.G. Julian y cols., 2004; J.G. Villa y cols., 2005). En general,

todos estos protocolos son capaces de producir incrementos en la concentración de EPO; sin embargo, no son igual de eficientes en la obtención de la subsiguiente respuesta eritropoyética.

Hay que destacar que no todos los atletas se benefician del entrenamiento en altitud (B.D. Levine y J. Stray-Gundersen, 1997; J. Stray-Gundersen, 2001; B. Friedmann y cols., 2005). Esta variabilidad individual parece estar relacionada con la magnitud del incremento de EPO y su tasa de disminución en respuesta a la exposición a altitud (J.-P. Richalet y cols., 1994; R.F. Chapman y cols., 1998; R.-L. Ge y cols., 2002). Entre los factores que pueden influir en estas diferencias, además de los distintos protocolos utilizados, no se pueden excluir los distintos tipos de entrenamiento o el deporte. Incluso la variabilidad genética podría estar implicada; aunque, hasta la fecha, no se haya encontrado ningún determinante genético que explique la variabilidad individual en respuesta a la hipoxia (K. Jedlickova y cols., 2003).

III. El receptor soluble de la transferrina

Todos los tejidos que requieren de hierro regulan su captación mediante la expresión del receptor de la transferrina en la superficie celular. Los dos tejidos que requieren los mayores aportes de hierro son la médula ósea y la placenta materna. Así, excepto durante el embarazo, la mayor parte del hierro se utiliza en la síntesis de la hemoglobina en los precursores hematopoyéticos de la médula ósea, encontrándose aproximadamente el 80% del receptor de la transferrina en estas células (E.P.A. Kuiper-Kramer y cols., 1996).

El receptor de la transferrina es una glicoproteína transmembrana con dos subunidades idénticas (de 95 kDa cada una) unidas por dos puentes disulfuro extracelulares, y capaz de unirse a moléculas de transferrina e internalizarlas por endocitosis (J.D. Cook, 1999; R.A. Feelders y cols., 1999; C.M. Lawrence y cols., 1999) (Figura 1.7). En suero, el receptor soluble de la transferrina (sTfR) se encuentra como el fragmento de corte del receptor de la transferrina (85 kDa cada subunidad) al que le faltan los dominios citoplasmático y transmembrana (residuos 1-100) (Y. Kohgo y cols., 1986; Y.J. Shih y cols., 1990 y 1993). El corte se realiza por encima de las dos uniones disulfuro, por lo que existe controversia sobre la forma en que el sTfR se encuentra en circulación (monómero o dímero) y si está formando un complejo con una o dos moléculas de transferrina (Y.J. Shih y cols., 1990; A. Hikawa y cols., 1996; R.A. Feelders y cols., 1999; C.M. Lawrence y cols., 1999).

La concentración de sTfR es directamente proporcional al total de la masa del receptor presente en tejido; y, como la mayoría de los receptores presentes en tejido se encuentran en

las células precursoras eritroides, la concentración de sTfR en suero es directamente proporcional a la actividad eritropoyética (Y. Kohgo y cols., 1987; H.A. Huebers y cols., 1990; B.S. Skikne y cols., 1990; Y. Beguin y cols., 1993).

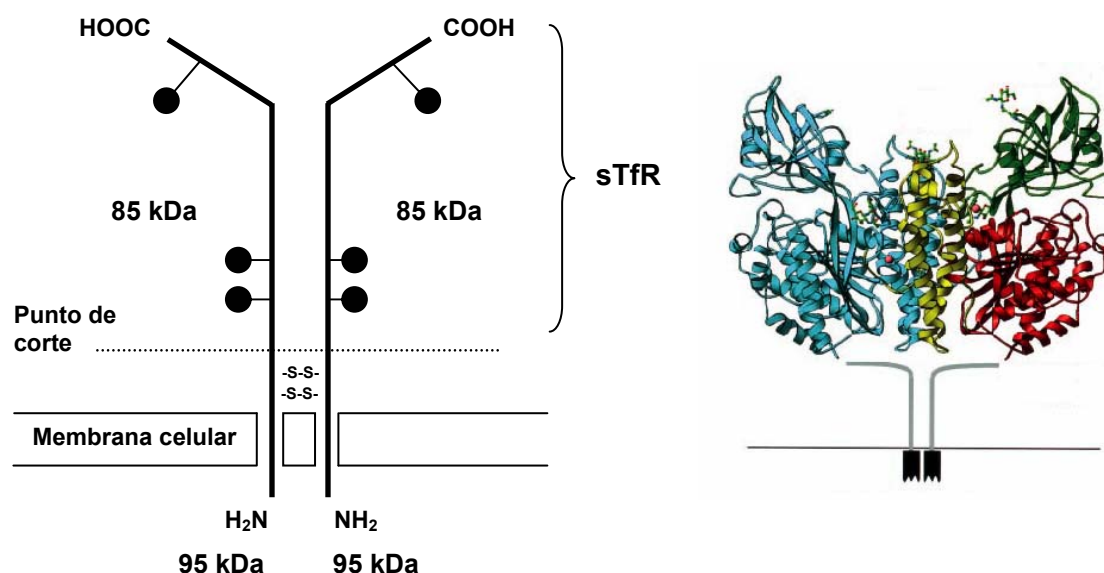


Figura 1.7: Representación esquemática del receptor de la transferrina y estructura proteica tridimensional del dominio extracelular (C.M. Lawrence y cols., 1999). Los círculos negros simbolizan los puntos de glicosilación.

Aunque se desconoce la función fisiológica del sTfR, la determinación del sTfR es de gran utilidad en la monitorización de la eritropoyesis y el estudio de los niveles de hierro corporales. El sTfR es un marcador fiable en el diagnóstico de la deficiencia de hierro en diversas situaciones clínicas pues permite discriminar entre los distintos tipos de anemias (en general, entre la anemia crónica y la deficiencia de hierro) (A.F. Remacha y cols., 1998; J.D. Cook, 1999; R. Feelders y cols., 1999; F.J. Baillie y cols., 2003; Y. Beguin, 2003). Además de las aplicaciones clínicas, el sTfR, solo o combinado con otros marcadores bioquímicos, ha sido propuesto para la monitorización de la respuesta al tratamiento con rhEPO. En concordancia, el sTfR se ha propuesto como marcador en la detección de la administración de rhEPO en el deporte (G. Gareau y cols., 1994 y 1996; F. Bresolle y cols., 1997; M. Audran y cols., 1999; K.I. Birkeland y cols., 2000; R. Parisotto y cols., 2000 y 2001; M. Magnani y cols., 2001; C.J. Gore y cols., 2003).

No existe información sobre el proceso de eliminación del sTfR, por lo que se supone su catabolismo está asociado al proceso de degradación de la transferrina (R.A. Feelders y cols., 1999).

Concentraciones poblacionales de sTfR sérico

Debido a la falta de un estándar internacional del sTfR, los resultados obtenidos utilizando distintos inmunoensayos no pueden ser comparados entre ellos respecto a rangos de referencia o patológicos. En la mayoría de casos los inmunoensayos correlacionan bien, lo que indica que los distintos rangos de referencia dependerán, principalmente, de la naturaleza del calibrador utilizado.

Factores intra e inter-individuales

a) Rangos de normalidad

Los valores de concentración de sTfR se distribuyen de forma normal (G. Raya y cols., 2001). Para los distintos inmunoensayos, los rangos de referencia en población sana varían entre 0,57-2,8 mg/l (J. Allen y cols., 1998), 1,3-3,3 mg/l (P. Suominen y cols., 1997) y 3,5-8,5 mg/l (C.H. Flowers y cols., 1989; H.A. Huebers y cols., 1990). De los inmunoensayos que describen el origen de sus calibradores, unos utilizan como calibrador el monómero del receptor de la transferrina purificado extraído de suero (J. Allen y cols., 1998), y otros el receptor de la transferrina intacto extraído de la placenta y unido a transferrina (C.H. Flowers y cols., 1989; H.A. Huebers y cols., 1990).

No se han observado diferencias con respecto al género o el índice de masa corporal (G. Raya y cols., 2001). La concentración de sTfR es constante entre los 18 y los 80 años de edad (J. Allen y cols., 1998), pero se han observado valores de sTfR ligeramente superiores en niños y adolescentes (R. Antila y cols., 1997; M.A. Virtanen y cols., 1999; P. Suominen y cols., 2001; G. Raya y cols., 2001). Los niveles de sTfR no se ven afectados por la menopausia (J. Allen y cols., 1998), o el embarazo (G. Raya y cols., 2001). Respecto a diferencias étnicas, la concentración de sTfR es superior en población negra comparada con población asiática y caucásica (J. Allen y cols., 1998).

La variabilidad intra-individual del sTfR se ha descrito del 13% (M.J. Cooper y S.H. Zlotkin, 1996; M. Maes y cols., 1997); e inter-individual, a lo largo de todas las edades, del 12-30% en

hombres, y del 15-23% en mujeres (M.J. Cooper y S.H. Zlotkin, 1996; M. Maes y cols., 1997; G. Raya y cols., 2001).

b) Estados patológicos

La concentración de sTfR se encuentra elevada en estados de deficiencia de hierro o en cualquier situación en la que se requiera hierro extracelular a causa de una eritropoyesis acelerada, como la anemia hemolítica autoinmune, hemoglobinopatías, hiperplasia eritroide, policitemia vera y algunos casos de tumores malignos (J.D. Cook, 1999; R. Feelders y cols., 1999; F.J. Baillie y cols., 2003; Y. Beguin, 2003). En el caso de aplasia de la médula ósea, desórdenes de sobrecarga de hierro o fallo renal, la concentración de sTfR se encuentra muy disminuida (H. Khumalo y cols., 1998; Y. Beguin, 2003). En la malnutrición severa, la médula ósea puede estar afectada hasta tal punto que la eritropoyesis se reduce y la concentración de sTfR disminuye (S. Kuvibidila y cols., 1996). Sin embargo, la concentración de sTfR se encuentra dentro de la normalidad en pacientes con anemia crónica e inflamatoria (Y. Beguin, 2003).

Factores ambientales

a) Altitud

El efecto de la altitud en las concentraciones de sTfR refleja las diferencias en la actividad eritropoyética de la médula ósea. Se ha observado la diferencia de concentraciones de sTfR en poblaciones que viven a distintas altitudes, con valores más altos a mayor altitud (J. Allen y cols., 1998).

b) Ejercicio

La concentración de sTfR observada en grupos de distinto nivel de entrenamiento es similar (Y.O. Schumacher y cols., 2002c), aunque en el estudio de G. Raya y colaboradores (2001) se describen concentraciones de sTfR superiores en mujeres adultas con mayor actividad física. En deportistas de élite, el rango de concentraciones de sTfR en condición basal y la variabilidad intra-sujeto (4-15%) son similares a los descritos para la población sedentaria sana (J. Malczewska y cols., 2000 y 2004; K. Sharpe y cols., 2002), con concentraciones de sTfR superiores en deportistas de resistencia (K. Sharpe y cols., 2002).

Estudios realizados para determinar el efecto del ejercicio aeróbico prolongado no han demostrado variación en las concentraciones de sTfR (J. Malczewska y cols., 2000 y 2004; Y.O. Schumacher y cols., 2002c; K.C. Deruisseau y cols., 2004). Tras ejercicios agudos, se ha observado que la concentración de sTfR se mantiene constante (M.G. Nikoladis y cols., 2003) o se ve ligeramente incrementada (L. Rocker y cols., 2002; Y.O. Schumacher y cols., 2002c y 2003; N. Robinson y cols., 2003).

1.3. La hormona de crecimiento

La hormona de crecimiento (*growth hormone*, GH) es una de las principales hormonas de regulación del desarrollo postnatal. Desde que en los años la GH fue descrita como un potente agente anabolizante en *The Underground Steroid Handbook*, esta hormona ha visto aumentada su popularidad dentro de los medios de comunicación debido a su extendida utilización en el mundo del deporte. Junto con las hormonas esteroideas y los esteroides anabólicos, sus propiedades anabólicas la hacen especialmente atractiva entre los deportistas (V.I. Rickert y cols., 1992; M. Bidlingmaier y cols., 2001).

1.3.1. Biología de la GH

La GH o somatropina es una hormona polipeptídica que se encuentra en diferentes isoformas de distinto peso molecular derivadas de un mismo gen (GH1) y de producción prácticamente exclusiva en la glándula pituitaria (G. Baumann, 1991). La secreción natural se realiza de forma pulsátil, con una media de pulsos de entre 6 y 10 al día, siendo la concentración de la GH en sangre muy baja o indetectable entre medio de estos pulsos (K.Y. Ho y cols., 1987). La regulación de la secreción de GH es muy compleja. A lo largo del día, los pulsos de secreción ocurren espontáneamente o en respuesta a estímulos. La concentración de GH alcanza un máximo al final de la pubertad y disminuye progresivamente con la edad (E. Corpas y cols., 1993). En la mayoría de los individuos sanos de edad avanzada, la producción de GH es similar a la de individuos con insuficiencia de esta hormona (A.A. Toogood y cols., 1996). Además, las mujeres presentan niveles de secreción de GH ligeramente superiores a los de los hombres (M.W. Stolar y G. Baumann, 1986).

Los estímulos fisiológicos más importantes en la secreción de GH son el sueño, durante el cual se produce la mayor parte de su secreción (E. Van Cauter y G. Copinschi, 2000), y el ejercicio. El ejercicio es un potente estímulo de la liberación de GH y un único episodio de ejercicio puede resultar en unas marcadas elevaciones en las concentraciones de GH circulantes. La magnitud de la respuesta de la GH al ejercicio variará en función del tipo, intensidad y duración del ejercicio, así como de factores como la edad, el género, la composición corporal y el estado físico del individuo que realiza el ejercicio (N.E. Felsing y cols., 1992; J.A. Kanaley y cols., 1999; K. Stokes, 2003). Sin embargo, los mecanismos que regulan la liberación de GH en respuesta al ejercicio no son del todo conocidos. Las concentraciones de

GH también se incrementan en respuesta al estrés, a la ingestión de proteínas, y a la hipoglucemia.

La GH es liberada a la circulación periférica donde la mayor parte se encuentra en forma libre pero parte se une a dos proteínas transportadoras (*GH binding proteins*, GHBP), la región extracelular del receptor de membrana de la GH y la α_2 -macroglobulina (G. Bauman, 1999 y 2001).

Prácticamente, todas las células del cuerpo tienen receptores de GH, pero el hígado es el principal órgano diana (P.A. Kelly y cols., 1994). Entre los muchos procesos que inicia la GH tras la activación del receptor, uno de los más importantes es la activación del gen de la *insulin like growth factor-I* (IGF-I). A su vez, la producción de GH se regula mediante inhibición negativa por IGF-I. Esta inhibición por retroalimentación (*feed-back*) actúa a dos niveles, en la glándula pituitaria y en el hipotálamo. En la pituitaria, la IGF-I inhibe directamente la producción de GH, mientras que en el hipotálamo la IGF-I inhibe la producción del neuropéptido estimulador de la liberación, la *GH-releasing hormone* (GHRH) y estimula la producción del neuropéptido inhibitor, la somatostatina (SRIH) (R.C. Cuneo y cols., 1998; A.W. Root y M.J Root, 2002). La hormona ghrelina, sintetizada principalmente en el estómago, también es capaz de estimular la secreción de GH de forma directa, e indirecta por vía de la GHRH y la SRIH (Figura 1.8). Aunque la función fisiológica de la ghrelina no ha sido aún completamente definida, parece tener un papel de integración entre la ingesta y el balance energético (A. Penalva y cols., 2001; H. Hosoda y cols., 2002; A.W. Root y M.J Root, 2002). El descubrimiento de la ghrelina se realizó a partir de la búsqueda del ligando natural del receptor al cual se unían una familia de pequeñas moléculas sintéticas, peptídicas o no, capaces de activar la secreción de la GH. Estas partículas, denominadas segretagogos de la GH (GH secretagogues, GHSs), tienen una marcada biodisponibilidad y efectos de larga duración tras la administración oral (R.G. Smith, 2005)

La GH tiene un importante papel en el desarrollo postnatal (R.C. Cuneo y cols., 1998). Los efectos metabólicos del sistema GH/IGF-I son mediados por la acción directa de la GH en los tejidos y, de forma indirecta, por la producción local de IGF-I. Los efectos directos incluyen la estimulación de la síntesis de proteínas en músculo y la lipólisis en el tejido adiposo (M.A. Hussain y cols., 1994; N. Moller y cols., 1995). Los efectos metabólicos de la GH mediados vía la IGF-I incluyen muchos aspectos anabólicos, hipoglucémicos, y de regulación de la concentración de colesterol y el metabolismo óseo (R.C. Olney, 2003).

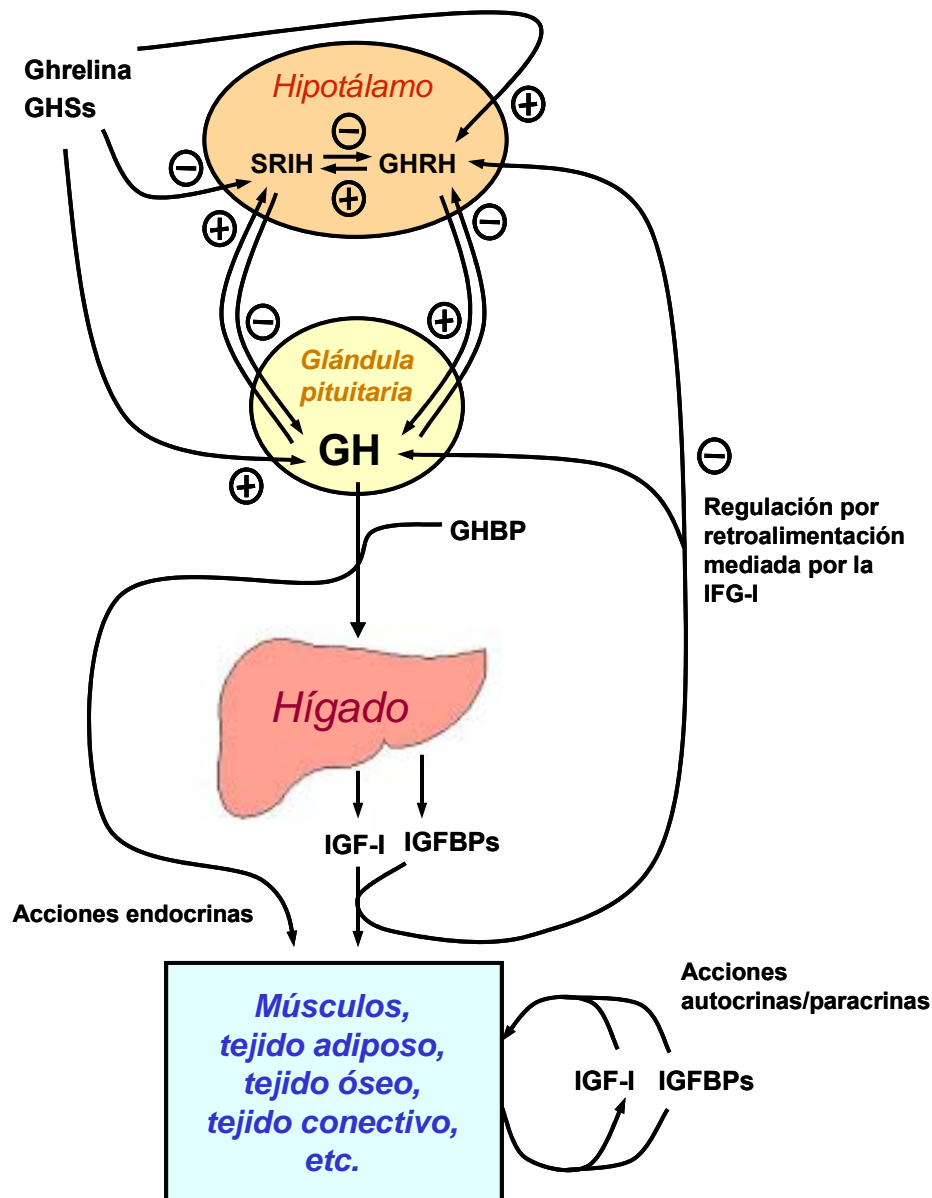


Figura 1.8: Representación esquemática del control estrogénico de la secreción de la GH y su acción sobre los órganos periféricos. GH = hormona de crecimiento; GHBP = proteínas de unión a la GH; SRIH = somatostatina; GHRH = hormona liberadora de la GH; GHSs = secretagogos de la GH; IGF-I = *insulin-like growth factor-I*; IGFBPs = proteínas de unión a los IGFs.

Aproximadamente, el 60% de la eliminación de GH se realiza vía filtración glomerular y degradación en las células del túbulo proximal (V. Jonson y T Maack, 1977). El 40% restante es atribuido a la eliminación mediada por el receptor de GH. Debido al muy eficiente proceso de

degradación en la nefrona proximal, tan sólo una mínima cantidad (~0,01%) de GH filtrada alcanza la orina (K.F. Hanssen, 1972). Se ha estimado que la excreción urinaria de GH representa una proporción del 0,0035%, sea de producción endógena o administración exógena (R.M. Bala y J.C. Beck, 1971). Por otro lado, la excreción urinaria de proteínas se ve afectada por el ejercicio (J.C. Poortmans, 1984). La proteinuria post-ejercicio, más relacionada con la intensidad que con la duración del mismo, afecta a la concentración urinaria de GH impidiendo su utilización en la detección del abuso de la rhGH en orinas de competición (M. Saugy y cols., 1995).

1.3.2. Uso terapéutico de la rhGH

El primer uso terapéutico de la hGH exógena en el tratamiento de la deficiencia de la hormona fue descrito en 1958 (M.S. Raben, 1962). Antes de la producción de hormonas sintéticas, el tratamiento de la deficiencia debía hacerse a partir de GH extraída de glándulas pituitarias de cadáveres humanos, pues esta hormona es específica de especie. La utilización de la hormona derivada de pituitaria se prolongó hasta que en 1985 su administración se asoció a la aparición de casos de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad neurodegenerativa rara y progresiva. Este hecho aceleró la aprobación de la utilización de la hormona recombinante (*recombinant human GH*, rhGH).

Tabla 1.5: Los principales productos comerciales de rhGH y compañías productoras.

Preparaciones farmacéuticas de Somatotropina (rhGH recombinante)
Gentropin® (Pharmacia & Upjohn) Humatrope® (Eli Lilly) Norditropin® (Novo Nordisk) Nutropin® (Genetech) Saizen® (Serono) Serotostim® (Serono) Tev-tropin® (Savient Pharmaceuticals) Zomacton® (Ferring Pharmaceuticals) Zorbtive® (Serono)

Los niños con deficiencia de la GH tienen baja estatura la cual puede ser satisfactoriamente tratada con GH (R.C. Cuneo y cols., 1998). Los adultos que padecen la deficiencia como

resultado de la enfermedad de la pituitaria o de su extirpación quirúrgica, desarrollan un síndrome que se caracteriza por una composición corporal anormal (masa muscular reducida y masa grasa incrementada), fuerza muscular disminuida (esquelética, cardíaca y pulmonar), incremento de la mortalidad, y perjuicio del metabolismo (bajo porcentaje de metabolismo basal, acción tiroidea afectada, anabolismo reducido y acumulación de grasas). La restitución de las concentraciones fisiológicas mediante terapia sustitutiva con rhGH ha demostrado efectos beneficiosos como la restauración de la correcta composición corporal.

1.3.3. Utilización de la rhGH en el deporte

Los primeros estudios científicos en que se demostraba el papel de la GH en la regulación metabólica no fueron publicados hasta 1989 (J.O. Jorgensen y cols., 1989; F. Salomon y cols., 1989). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los cambios beneficiosos observados con la administración de la GH en la terapia sustitutiva de adultos con deficiencia se obtienen de restaurar las concentraciones fisiológicas. La administración de GH exógena a adultos sanos en dosis supra-fisiológicas podría resultar en algunos de los efectos observados en la terapia sustitutiva, pero no todos.

Las propiedades anabólicas de la GH son las razones más importantes por las cuales se ha hecho popular en el mundo del deporte, especialmente para los deportistas de fuerza como son los corredores de velocidad, los levantadores de pesas y los culturistas. Sin embargo, ningún estudio controlado ha demostrado aún un efecto beneficioso de la administración supra-fisiológica de la rhGH en el músculo esquelético en atletas entrenados (D.M. Crist y cols., 1988; K.E. Yarasheski y cols., 1992 y 1993; R. Deyssig y cols., 1993; D.R. Taaffe y cols., 1996; H. Frisch, 1999; M.L. Healy y cols., 2003; A. Berggreen y cols., 2005).

Otros aspectos de la acción de la hGH que podrían ser útiles, especialmente en deportes de resistencia, son sus efectos sobre la función cardíaca y pulmonar. Se han observado incrementos en la masa muscular cardíaca y en el rendimiento máximo cardíaco en pacientes con deficiencia tratados con rhGH (R.C. Cuneo y cols., 1991; A. Cittadini y cols., 1994). A la hGH se le conocen también profundos efectos sobre el metabolismo catabólico (J.O. Jorgensen y cols., 1993), la eritropoyesis y el volumen total sanguíneo (E.R. Christ y cols., 1997). Pero de nuevo, no se han publicado estudios de ningún efecto beneficioso en voluntarios sanos y entrenados (A. Berggreen y cols., 2005).

El cambio en la composición corporal podría ser de interés en deportistas de disciplinas organizadas en categorías de peso corporal (J.D. Wallance y R.C. Cuneo, 2000). A este respecto, los estudios realizados en sujetos sanos entrenados son controvertidos. En individuos sanos tratados con rhGH, aunque se ha observado un descenso en el porcentaje de masa grasa corporal y un incremento del peso libre de grasa (D.M. Crist y cols., 1988), este incremento en la masa no grasa parece estar más relacionado con la retención de líquidos o la acumulación de tejido conectivo (K.E. Yarasheski y cols., 1992). Muy probablemente, los efectos lipolíticos y de síntesis proteica de la administración de GH son dependientes del peso corporal y son atenuados en adultos sanos entrenados en comparación con pacientes deficientes de la hormona (K.E. Yarasheski y cols., 1993; R. Deyssig y cols., 1993). Únicamente un estudio en atletas de fuerza tratados con GH a altas dosis observó un efecto anabólico sobre el metabolismo proteico corporal, no sólo por un aumento de la síntesis proteica, sino por una reducción del catabolismo proteico en músculo esquelético (M.L. Healy y cols., 2003).

Como conclusión, la literatura científica actual no sugiere un dramático efecto de la GH en la mejora del rendimiento en adultos sanos previamente entrenados (M.J. Renie, 2003). La diferencia entre los informes subjetivos de los usuarios ilegales de hGH y estos estudios se podría explicar, al menos en parte, por las diferencias en la duración y la dosificación del tratamiento con hGH. Informes no oficiales obtenidos de los usuarios ilegales de hGH mencionan dosis de hasta 25 IU/día, muy superiores a las dosis terapéuticas (1-2 IU/día) (C. Ehrnborg y cols., 2000). Además, el posible uso concomitante de rhGH y esteroides anabolizantes debe ser tenido en cuenta. Finalmente, la amplia variedad de acciones, incluyendo los recientemente estudiados efectos beneficiosos en la curación de heridas, recambio del tejido óseo y conectivo, la promoción del crecimiento en atletas sanos jóvenes, así como efectos psicológicos, podrían contribuir a la popularidad de la rhGH con propósitos de dopaje (M. Bidlingmaier y cols., 2001; S. Doessing y M. Kjaer, 2005).

La administración de dosis supra-fisiológicas de GH en deportistas durante un plazo de tiempo considerable podría compararse con una situación de acromegalia. La acromegalia es un desorden clínico que se caracteriza por la secreción descontrolada de hGH, habitualmente producida por un tumor en la pituitaria (J.D. Nabarro, 1987; S. Melmed y cols., 1995). Durante los primeros años, esta enfermedad es asintomática y habitualmente los individuos no son conscientes de su inusual fuerza que viene del incremento de su masa muscular. También se producen alteraciones faciales (rasgos burdos, labios, frente, lengua y dientes engrandecidos). A largo plazo los efectos producidos, lejos de ser una extensión de los observados tras la sustitución del déficit, son: disminución de la funcionalidad de la musculatura esquelética,

disminución de la función cardíaca, aceleración de la degeneración de las articulaciones, incremento de la incidencia de tumores malignos, desarrollo de la apnea del sueño, hipertensión, diabetes mellitus, y aumento de la tasa de mortalidad prematura (R.C. Cuneo y cols., 1998). Además de los efectos secundarios de la utilización de grandes dosis incontroladas de la hormona, la utilización de GH de origen desconocido y sin el debido control puede transmitir enfermedades como la de Creutzfeldt-Jakob.

1.3.4. Detección del abuso de rhGH. El Proyecto GH2000.

La secreción pulsátil, rápida eliminación y respuesta a gran número de factores ambientales conducen a una gran variabilidad intra e inter-individual de la concentración de GH, haciendo imposible la conclusión de la administración exógena de rhGH a partir de una simple cuantificación de su concentración. Además, la GH no es una proteína glicosilada, lo que la excluye de la estrategia utilizada para la detección directa de la rhEPO.

Para superar las dificultades antes mencionadas, desde 1996, el consorcio internacional de investigación GH2000 ha estudiado por distintas vías (directa e indirecta) el diseño de un método de detección del abuso de la GH suficientemente robusto (J.D. Wallace y cols., 1999 y 2000; R. Dall y cols., 2000; S. Longobardi y cols., 2000; H.L. Simpson y cols., 2002).

Detección directa de rhGH

La GH endógena es, de hecho, una mezcla heterogénea de diferentes isoformas de distinto peso molecular y derivadas de un mismo gen (GH1) (G. Baumann, 1991). Así pues, la glándula pituitaria secreta un amplio espectro de isoformas moleculares: 22 kDa, 20 kDa y pequeños fragmentos de la GH. Además, estas isoformas se encuentran en forma monomérica, homodimérica o heterodimérica, u oligomérica. Esta heterogeneidad molecular, además de presentar distinta inmunoreactividad (G. Baumann, 1991), parece tener significado fisiológico pues las distintas formas han demostrado poseer distintas actividades biológicas (H. Uchida y cols., 1997). Por el contrario, la rhGH exógena producida por métodos de ADN recombinante consiste en una única isoforma purificada de secuencia aminoacídica idéntica a la GH endógena de 22 kDa. Este aspecto ha llevado a la posibilidad de utilizar la heterogeneidad de la GH endógena para diseñar una metodología directa de detección del abuso de la rhGH.

La regulación por retroalimentación de la secreción de la GH por las concentraciones circulantes de GH e IGF-I produce la inhibición de la secreción de la GH endógena tras la administración de la rhGH. Por tanto, la administración de rhGH resulta en el incremento de la abundancia relativa de la isoforma de 22 kDa en circulación (J.D. Wallace y cols., 2001b). A partir de métodos de inmunoensayo (Z. Wu y cols., 1999; M. Bidlingmaier y cols., 2000; V. Popii y G. Baumann, 2004), basados en utilización de anticuerpos monoclonales específicos para las distintas isoformas, se han desarrollado técnicas capaces de identificar los cambios en las proporciones de las isoformas moleculares de la GH presentes en muestras de suero.

A pesar de que las proporciones relativas de las isoformas de la GH se ven alteradas por el ejercicio agudo (W.C. Hymer y cols., 2001; J.D. Wallace y cols., 2001a; B.C. Nindl y cols., 2003b), la estimulación de la secreción de la GH por efecto del ejercicio queda suprimida tras la administración de rhGH (J.D. Wallace y cols., 2001b). A pesar de todo, la clara separación de los grupos de tratamiento tan sólo era posible hasta 3 horas después de la última administración, pues se requería de la presencia simultánea de altas concentraciones de la isoforma de 22 kDa exógena y de la supresión de las formas endógenas. La corta vida media de esta hormona en circulación, en plasma entre 15 y 20 minutos tras la secreción o inyección intravenosa (R.W. Holl y cols., 1993), dificulta su detección directa. La inyección subcutánea o intramuscular alarga su vida media, de forma que la concentración de GH alcanza un pico entre 1 y 3 horas desde la inyección, y seguidamente disminuye hasta niveles indetectables después de las 24 horas (K.Y. Ho y cols., 1989). En la actualidad, se están desarrollando nuevos inmunoensayos específicos para otras isoformas distintas de la de 22 kDa o 20 kDa, y un método independiente basado en la separación de las isoformas de la GH mediante electroforesis bidimensional seguida de western blotting, técnica que podría ser útil como método de confirmación (M. Bidlingmaier y cols., 2003).

En la actualidad, por iniciativa de la WADA, se encuentra aprobado un método directo de detección del abuso de la rhGH. Este método se basa en la relación entre dos inmunoensayos: uno que preferentemente reconoce la isoforma de 22 kDa, y el otro permisivo, que reconoce todas las isoformas de la GH (Z. Wu y cols., 1999). A pesar de que este método ya ha sido utilizado en los Juegos Olímpicos de Atenas 2004 y Turín 2006, en la actualidad, su principal inconveniente radica en la limitada producción de los anticuerpos monoclonales utilizados.

Debido a que el tratamiento efectivo con rhGH requiere de la inyección diaria y se conoce que los atletas utilizan la GH en repetidos ciclos durante la fase de entrenamiento, la detección directa del abuso con esta hormona debería realizarse preferentemente en controles fuera de

competición y sin previo aviso. Un aspecto negativo a tener en cuenta de esta metodología de detección directa basada en las proporciones relativas de las isoformas de la GH es que, una vez los deportistas tengan conocimiento de su utilización, estos podrán evitar este test antidopaje tomando otros fármacos para obtener los mismos beneficios; entre ellos, los secretagógos de la GH activos por vía oral o la IGF-I.

DetECCIÓN INDIRECTA DE rhGH

Con el objetivo de obtener un método de detección del abuso de la GH que no esté influido por la variabilidad de sus concentraciones séricas y que permita alargar el margen de detección, la búsqueda también se ha dirigido hacia posibles métodos indirectos basados en biomarcadores endógenos de la acción de la GH.

I. Desarrollo del método indirecto de rhGH

La GH posee marcados efectos sobre la concentración en sangre de otras sustancias (componentes del eje GH/IGF-I y los marcadores del recambio óseo y del colágeno) que teóricamente podrían resultar mucho más útiles como marcadores del abuso de la rhGH.

La GH influye en la concentración de los componentes del eje GH/IGF péptido, entre ellos la IGF-I, las proteínas de unión a IGFs (*IGF binding proteins*, IGFbps), y la subunidad ácido lábil (*acid labile subunit*, ALS). La GH también tiene efectos sobre la formación y la remodelación del hueso y la síntesis del colágeno, efectos que se ven reflejados por la liberación de varios péptidos del hueso y del tejido blando a la circulación sanguínea (osteocalcina; péptido del procolágeno tipo III, P-III-P; péptido C-terminal del procolágeno tipo I, PICP; telopéptido C-terminal cross-linked del procolágeno tipo I, ICTP). Estos "marcadores" de los efectos de la GH varían de forma mucho menos dramática con el tiempo o en respuesta al ejercicio que la propia GH. Por otro lado, al tratarse de proteínas, su excreción urinaria es muy baja y errática para ser utilizada en un test antidopaje.

En un estudio preliminar de administración de rhGH en atletas no profesionales se examinaron de forma individual y en combinación, los efectos del ejercicio agudo y la administración de la rhGH sobre marcadores potenciales con la intención de determinar aquellos que eran sensibles a la administración exógena de la rhGH (Figura 1.9), pero insensibles a los efectos del ejercicio agudo. En este estudio se observó que las concentraciones séricas de los marcadores aumentaban ligeramente, pero de forma significativa, tras el ejercicio

(J.D. Wallace y cols., 1999 y 2000). Sin embargo, la administración de rhGH aumentaba mucho más la concentración de estos componentes tanto en condiciones pre como post-ejercicio.

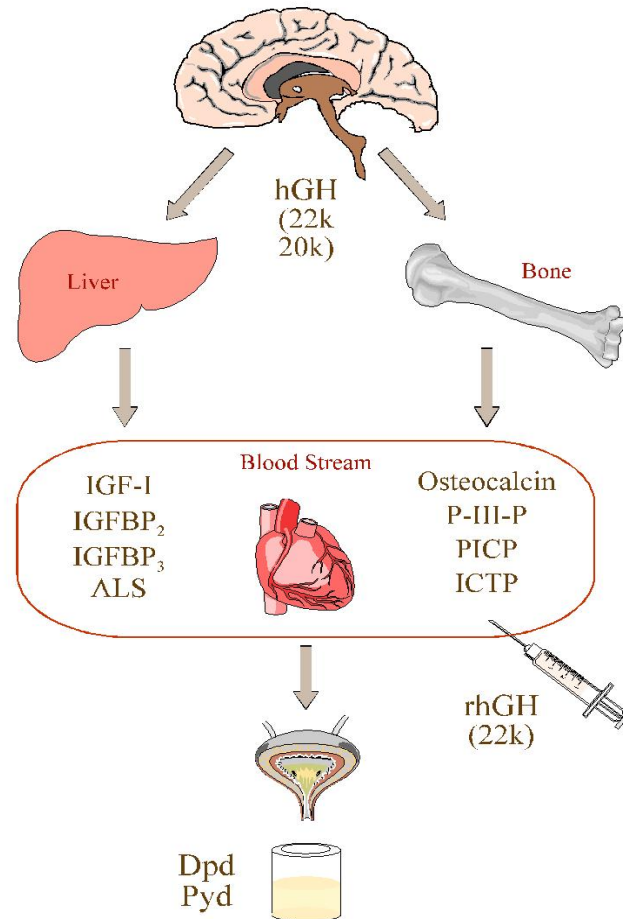


Figura 1.9: Representación del eje GH/IGF-I/marcadores del hueso dependientes de la GH. rhGH = hormona de crecimiento recombinante; IGF-I = *insulin-like growth factor-I*; IGFBPs = proteínas de unión a las IGFs; ALS = *acid labile subunit*, P-III-P = péptido del procolágeno tipo III; PICP = péptido C-terminal del procolágeno tipo I; ICTP = telopéptido C-terminal cross-linked del procolágeno tipo I; Dpd = deoxipiridinolina; Pyd = piridinolina.

Un segundo estudio pretendió desarrollar un método de detección de la administración de rhGH. En él participaron 99 atletas no profesionales de ambos sexos provenientes de 4 países (R. Dall y cols., 2000; S. Longobardi y cols., 2000). Los marcadores se estudiaron en sangre y orina antes, durante los 27 días de la administración y, tras 56 días de acabada ésta. El efecto de la administración de la rhGH sobre la IGF-I, el P-III-P y el ICTP pudo confirmarse, con concentraciones significativamente superiores a la basal hasta 14 días tras el cese de la administración. Además, y como ya se había observado previamente (P. Burman y cols., 1997;

E. Guigo y cols., 1999), las mujeres respondieron menos al tratamiento con rhGH que los hombres con respecto a los marcadores de estudio.

El análisis de los resultados de los estudios doble ciego de administración de rhGH en deportistas recreacionales (J.D. Wallace y cols., 1999 y 2000; R. Dall y cols., 2000; S. Longobardi y cols., 2000) permitió el desarrollo de modelos matemáticos para la detección del abuso de la rhGH que incluían biomarcadores séricos (H.L. Simpson y cols., 2002). Resultados no publicados (informe interno de la Comisión Médica del COI) han permitido observar que mientras que la correcta identificación de los sujetos administrados no era posible utilizando los biomarcadores (IGF-I ó P-III-P) por separado, sí lo era con la combinación de ambos (Figura 1.10).

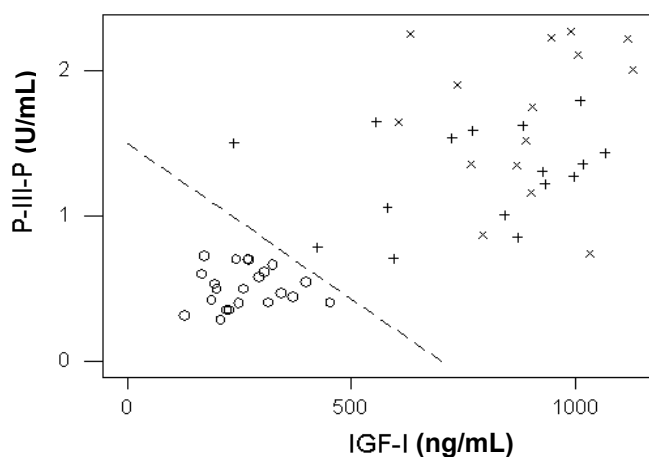


Figura 1.10: Representación de los resultados obtenidos para los biomarcadores IGF-I y P-III-P 21 días después del inicio del tratamiento con: (o) placebo, (+) dosis bajas y (x) dosis altas de rhGH.

Teniendo en cuenta la distinta sensibilidad a los efectos de la administración de la rhGH, se desarrolló un modelo específico para cada sexo:

$$EM1 = -2,269 + 0,727 \cdot \log [P - III - P] + 0,521 \cdot \log [IGF - I] \quad \text{para hombres y,}$$

$$EF3 = -4,973 + 1,1317 \cdot \log [P - III - P] + 1,0125 \cdot \log [IGF - I] \quad \text{para mujeres.}$$

Utilizando un punto de corte de especificidad 1:10.000, estas fórmulas permitían la detección del 86% de los hombres y el 39% de las mujeres que habían sido administrados con rhGH en el estudio de doble ciego (Figura 1.11).

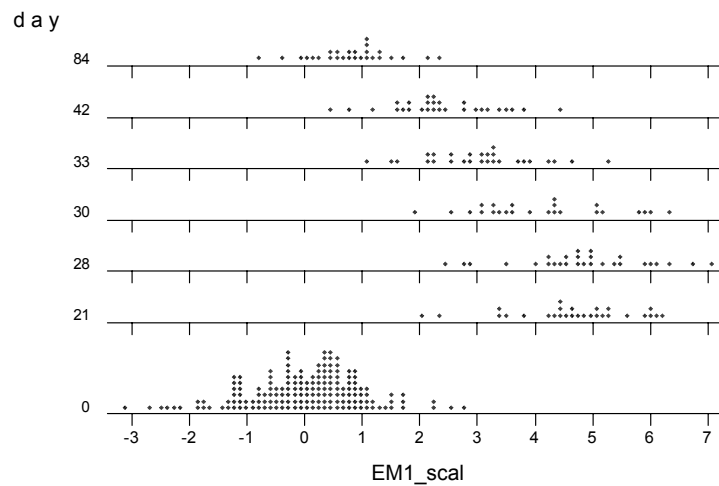


Figura 1.11: Distribución de los valores obtenidos para el modelo matemático EM1 a lo largo del tiempo en el estudio de administración de la rhGH. La línea inferior muestra la distribución de los valores obtenidos en todos los voluntarios no administrados con rhGH (grupo placebo y grupo GH pre-administración). La escala del eje horizontal se ha dispuesto de forma que la media de los valores del día 0 sea igual a 0 y la desviación estándar sea igual a 1.

Los estudios realizados hasta aquel punto se habían llevado a cabo en deportistas recreacionales e incluyeron tan sólo población caucásica; por tanto, las conclusiones no podían ser extendidas a toda la población mundial de atletas. Estudios posteriores realizados en deportistas de élite de ambos sexos, diferentes étnias y distintos deportes (C. Ehrnborg y cols., 2003; M.-L. Healy y cols., 2005), demostraron que las concentraciones de IGF-I y P-III-P estaban principalmente influidas por la edad y el sexo, se incrementaban de forma transitoria por efecto del ejercicio, y la concentración IGF-I era superior a la observada en población no atlética.

La distinta distribución de los valores de estos dos biomarcadores observada entre los voluntarios sanos y los deportistas de élite, y la influencia de la edad, obligó a la modificación de las ecuaciones matemáticas.

$$EM1b = 2,560 + 4,031 EM1 - \frac{101,737}{edad} \quad \text{para hombres y,}$$

$$EF3b = 2,322 + 2,168 EF3 - \frac{73,666}{edad} \quad \text{para mujeres.}$$

Paralelamente al desarrollo del Proyecto GH2000, otros grupos de investigación han trabajado en la potencial utilidad de la combinación de biomarcadores del eje de la GH/IGF-I y del recambio del colágeno en la detección del abuso de la rhGH en el deporte (A.T. Kicman y cols., 1997; L. Di Luigi y L. Guidetti, 2002; A. Sartorio y cols., 2004a). A. Sartorio y colaboradores (2004a) proponen la combinación de los biomarcadores IGF-I y P-III-P, junto con ICTP.

La principal ventaja de los marcadores indirectos es que los cambios producidos por efecto de la administración de la rhGH pueden ser observados tras su cese durante un periodo de tiempo superior al los de la propia rhGH. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos marcadores pueden estar afectados por factores intra e inter-individuales, como puede ser la edad y el sexo, o patologías que afecten a la fisiología de la hormona de crecimiento; y, en los deportistas, por la distinta intensidad o el diferente tipo de entrenamiento, por el estrés de competición, o la presencia de lesiones óseas y del tejido conectivo.

II. La insulin-like growth factor-I

La *insulin-like growth factor-I* (IGF-I), además de tratarse de uno de los biomarcadores de la detección indirecta del abuso la rhGH, está incluida junto con la GH en la lista de sustancias prohibidas por la WADA debido a sus conocidos efectos anabólicos (R.D. Clemmons y cols., 1992; S.R. Kupfer y cols., 1993).

Biología de la IGF-I

La IGF-I es un péptido de 70 aminoácidos y peso molecular 7649 Da, de secuencia muy similar a la proinsulina. La IGF-I es principalmente secretada por el hígado al sistema circulatorio ejerciendo acciones endocrinas (P. Rotwein y cols., 1993); pero también se produce localmente en la mayoría de tejidos corporales, donde ejerce acciones autocrinas y paracrinas. La IGF-I actúa sobre distintos tejidos produciendo efectos anabólicos (incremento de la síntesis proteica), hipoglicémicos y antilipolíticos (similares a la insulina), efectos proliferativos y antiapoptóticos, y de regulación negativa de la secreción de GH y gonadotropinas (I. Zofkova, 2003).

La síntesis de IGF-I está principalmente activada por la GH y la insulina, pero su producción está también estimulada por la tirotrópina en la tiroides y las gonadotropinas en las gónadas

(D. LeRoith y cols., 2001). Otros factores de regulación son la nutrición y la actividad física (I. Zofkova, 2003).

El 90% de la IGF-I circulante es transportada unida a alguna de las seis proteínas específicas IGFBPs (D. LeRoith, 1996; D.R. Clemmons, 1997). Las IGFBPs también participan en la salida de IGF-I del compartimiento vascular y su unión al receptor, y probablemente tienen tanto un efecto activador como inhibidor (R.C. Baxter, 1994). La IGFBP-3 es la más abundante, y junto con la ALS, transportan la IGF-I formando un complejo ternario (S.R. Holman y R.C. Baxter, 1996; Y.R. Boisclair y cols., 2001).

La eliminación de IGF-I se atribuye principalmente a la eliminación mediada por el receptor IGF-I (F.J. Ballard y cols., 1991). La proporción eliminada vía excreción urinaria es baja, con concentraciones de IGF-I mil veces inferiores a las presentes en suero (B. Tonshoff y cols., 1995).

Concentraciones poblacionales de IGF-I sérica

Factores intra e inter-individuales

a) Rangos de normalidad

A diferencia de la secreción pulsátil de la GH, la concentración de IGF-I permanece estable a lo largo del día (C. Skjaerbaek y cols., 2000). El principal factor de dependencia de la concentración de IGF-I es la edad. La concentración sérica de IGF-I en la infancia es baja y sin diferencia entre sexos (V. Hesse y cols., 1994; A. Juul y cols., 1994a; C. Lofqvist y cols., 2001). En la pubertad, la concentración de IGF-I aumenta por efecto de las hormonas sexuales, y siguiendo el distinto patrón de crecimiento, observándose el pico de máxima concentración antes en chicas que en chicos (A. Juul y cols., 1994a; C. Lofqvist y cols., 2001). La concentración de IGF-I no presenta una fluctuación relevante durante el ciclo menstrual (H.S. Wang y cols., 1995; H.J.H.M. Thierry van Dessel y cols., 1996; A. Juul y cols., 1997). A partir de la pubertad, la concentración de IGF-I disminuye de forma lenta y sin diferencias de género (E. Corpas y cols., 1993; A. Juul y cols., 1994a y b; E. Ghigo y cols., 1996).

El establecimiento de un rango de normalidad de la IGF-I depende del tipo de inmunoensayo utilizado para su determinación (diferente tipo de pre-tratamiento, anticuerpo y estándar), complicando también la comparación de la concentración poblacional de IGF-I entre distintos estudios (E.F. De Palo y cols., 2001; C.J. Strasburger y cols., 2001).

b) Estados patológicos

Se han observado bajas concentraciones de IGF-I en patologías de resistencia a la GH (el síndrome de Laron) y en situaciones de deficiencia de la GH, en pacientes diabéticos de tipo I, con insuficiencia hepática y con enfermedades sistémicas en estado crítico (K.L. Clayton y cols., 1994 J.O.L. Jorgensen y cols., 1998; I. Zofkova, 2003).

Concentraciones elevadas han sido detectadas en pacientes con acromegalia (A. Juul y cols., 1994b; J.P. Thissen y cols., 1996; G. Brabant, 2003) y en estados tempranos del infarto de miocardio (W.L. Lee y cols., 1999a y b).

Factores ambientales

Según un estudio realizado en gemelos monozigóticos y dizigóticos, tan sólo un 38% de la variabilidad inter-individual observada en la concentración de IGF-I circulante es atribuible a efectos genéticos (M. Harrela y cols., 1996). Esto indica que los factores ambientales son los principales responsables de esta variabilidad; siendo los más importantes, la alimentación y la actividad física.

a) Alimentación

El estado nutricional tiene una influencia muy importante sobre la concentración de IGF-I. En estados de malnutrición la concentración de IGF-I se reduce marcadamente, incluso cuando la concentración de GH es elevada (J.-M. Ketelslegers y cols., 1995). En concreto, la disponibilidad de aminoácidos en la dieta es esencial para el mantenimiento de la concentración de IGF-I (V.C. Museo y cols., 1993; J.P. Thissen y cols., 1994).

b) Ejercicio

El estudio de la influencia del ejercicio físico es complicado por el efecto simultáneo de otros factores que influyen y dificultan el establecimiento de unos rangos de normalidad de IGF-I (U. Berg y P. Bang, 2004). Al igual que para la población sedentaria, en deportistas de élite, el factor que influye principalmente en la concentración sérica de IGF-I es la edad, tanto en condición basal (C.M. Show y cols., 2000; C. Ehrnborg y cols., 2003; A. Sartorio y cols, 2004b) como post-competición (M.-L. Healy y cols., 2005). Siendo la población estudiada

mayoritariamente adulta, tampoco se han observado diferencias significativas por efecto del género, índice de masa corporal, ciclo menstrual o el origen étnico (entre raza caucásica y negra) (C. Lindholm y cols., 1993; C.M. Show y cols., 2000; C. Ehrnborg y cols., 2003; M.-L. Healy y cols., 2005). Irregularidades del ciclo menstrual observadas en población deportiva tampoco originan variaciones en la concentración de IGF-I (D.L. Waters y cols., 2001).

Los valores de IGF-I descritos para los deportistas de élite han sido comparados con los de la población sedentaria y deportistas recreacionales. Mientras que A. Sartorio y colaboradores (2004b) no observaron diferencias entre deportistas de élite y población sedentaria sana, otros estudios han observado concentraciones significativamente superiores en los atletas de élite comparados con sedentarios (C.M. Show y cols., 2000; M.-L. Healy y cols., 2005). Dentro de los atletas de élite, los resultados de IGF-I sugerían una gran influencia del tipo de disciplina deportiva; sin embargo, tras el ajuste de los valores de IGF-I por la edad, las diferencias significativas entre deportes desaparecían (M.-L. Healy y cols., 2005).

La concentración de IGF-I está influenciada por el tipo, intensidad y duración del ejercicio (U.N. Nguyen y cols., 1998). En respuesta al ejercicio agudo, algunos estudios han observado un aumento de la concentración de IGF-I tras 10 minutos de ejercicio moderado, efecto dependiente de la intensidad del ejercicio pero independiente del incremento de la GH (P. Bang y cols., 1990; J. Cappon y cols., 1994; A.J. Schwarz y cols., 1996). Los incrementos mediados por la GH tardarían más de 6 horas en aparecer, según las observaciones realizadas en la administración de GH en humanos (J.O.L. Jorgensen y cols., 1991). En otros estudios no se han observado cambios o tan sólo un incremento transitorio durante el ejercicio de hasta 3 horas de duración o hasta 24 horas de finalizado el ejercicio (G. Jahreis y cols., 1989; A.-M. Suikkari y cols., 1989; W.J. Kraemer y cols., 1991; H. Koistinen y cols., 1996; R. Dall y cols., 2001; B.C. Nindl y cols., 2001; C. Ehrnborg y cols., 2003).

En respuesta al ejercicio prolongado intenso y de resistencia la concentración de IGF-I disminuye (A.-M. Suikkari y cols., 1989; G. Jahreis y cols., 1991). La IGF-I comparte muchas acciones de la insulina y, puede afectar a la captación de glucosa y la síntesis de glucógeno (M. Binoux, 1995; D. Le Roith y cols., 2001). La disminución de la concentración de IGF-I en situaciones de restricción calórica u otros factores de estrés relacionados sería la respuesta adecuada para el mantenimiento de la concentración de glucosa (C.L. Zanker y I.L. Swaine, 2000; B.C. Nindl y cols., 2003a).

Aunque el ejercicio crónico parece incrementar la concentración de IGF-I en la población sana (C.A. Roelen y cols., 1997; L.P. Koziris y cols., S.E. Borst y cols., 2001; J.O. Marx y cols.,

2001; J. Manetta y cols., 2003); el estado físico inicial, la intensidad, la duración y la frecuencia del ejercicio de entrenamiento son determinantes en las respuestas del eje GH/IGF-I. Así, en diversos estudios, la respuesta al entrenamiento ha sido nula o se han observado un descenso de la concentración de IGF-I (A. Eliakim y cols., 1996 y 1998; W.J. Kraemer y cols., 1999; L. Rosendal y cols., 2002; E. Filaire y cols., 2003). Desgraciadamente, las variables no controladas en estos estudios limitan la fuerza de sus conclusiones.

III. El péptido N-terminal del procolágeno de tipo III

El otro biomarcador seleccionado en el Proyecto GH2000 fue el péptido amino (N)-terminal del procolágeno de tipo III (P-III-P), fragmento del precursor biosintético del colágeno III.

Biología del P-III-P

Las fibras de colágeno de tipo III, junto con las de tipo I, son uno de los principales constituyentes de la matriz extracelular y responsables de la integridad de la estructura de los tejidos, particularmente aquellos con propiedades elásticas como la piel, los vasos sanguíneos, órganos internos y la placenta (L. Risteli y J. Risteli, 2002).

El colágeno de tipo III es sintetizado por los fibroblastos como molécula precursora de mayor tamaño en forma de triple hélice, procolágeno, la cuál tiene grandes extensiones de péptido en los extremos amino (N)-terminal y carboxi (C)-terminal (Figura 1.12). Tras la secreción al espacio extracelular, los péptidos son cortados en bloque por proteasas específicas (R. Halila y L. Peltonen, 1984), llevando a la formación del colágeno maduro con cortas regiones no helicoides de telopéptido a ambos lados de la molécula. Estas regiones de telopéptido son los principales sitios de unión intermolecular, importantes para la estabilización de las fibras de colágeno.

La degradación del colágeno ocurre tanto intra como extracelularmente. La vía intracelular incluye la fagocitosis y la degradación lisosomal de los colágenos en condiciones de recambio continuo, mientras que la ruta extracelular es activa durante el recambio rápido del colágeno (V. Everts y cols., 1996).

El péptido N-terminal del procolágeno de tipo III (P-III-P) es indicador tanto de la síntesis como de la degradación del colágeno de tipo III. La concentración de P-III-P sérica da información sobre la actividad del tejido conectivo durante el crecimiento puesto que el

colágeno corporal es entre el 10 y el 50% colágeno de tipo III (G. Saggese y cols., 1995). Ocasionalmente, la eliminación del P-III-P de colágeno de tipo III recién sintetizado no es completa y el péptido permanece unido a alguna de las moléculas, conocidas como pN-colágeno de tipo III. Por tanto, el P-III-P es también un producto de la degradación del pN-colágeno de tipo III (R. Fleischmajer y cols., 1990).

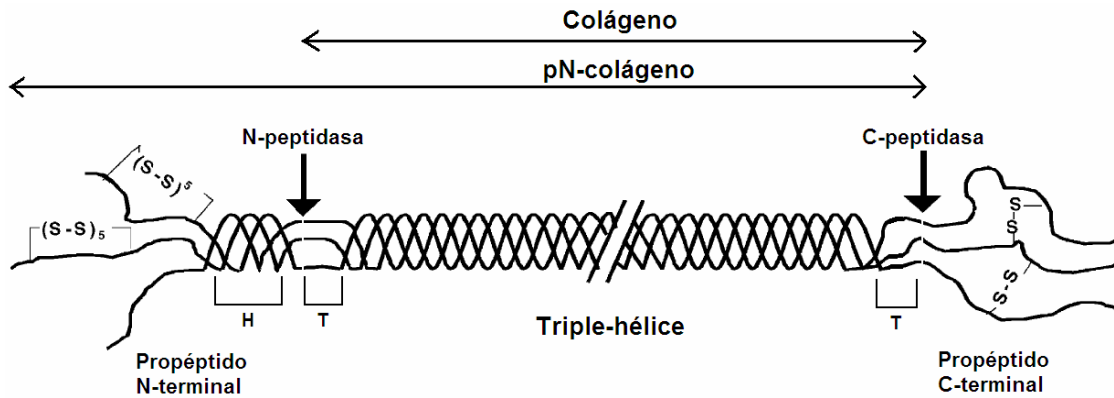


Figura 1.12: Estructura de la molécula precursora del colágeno III. Las flechas indican los lugares de corte de los propéptidos N-terminal (P-III-P) y C-terminal. H, dominio helicoidal del propéptido N-terminal (Col 3 del P-III-P); T, dominios telopéptido en cada uno de los extremos de la molécula precursora del colágeno (modificado de S. Kauppila, 1998, y, J. Risteli y L. Risteli, 1999)

El P-III-P tiene un peso molecular de 42 kDa y contiene 3 dominios distintos: un dominio de triple hélice (Col 3) en medio de la molécula, un dominio N-terminal (Col 1), y un dominio C-terminal (Col 2) (P. Bruckner y cols., 1978). El P-III-P, y productos de su degradación (fragmentos con los distintos dominios), se encuentran en circulación hasta que éstos son eliminados por receptores de *scavenger* presentes en las células endoteliales hepáticas.

Concentraciones poblacionales de P-III-P sérico

Factores intra e inter-individuales

a) Rangos de normalidad

Las concentraciones séricas de P-III-P son estables a lo largo del día (G. Saggese y cols., 1994; D.O. Wolthers y cols., 2001) y su principal factor de influencia es la edad. Las altas concentraciones de P-III-P observadas en bebés disminuyen durante los primeros dos años de

vida. Entre los dos años y la pubertad, el intervalo de referencia es de 3,5-12,2 ng/mL, sin diferencia debida al sexo. En la pubertad, las concentraciones de P-III-P se incrementan entre un 50 y un 100%, produciéndose antes en las chicas que en los chicos. Después de la pubertad, las concentraciones de P-III-P disminuyen hasta los valores observados en adultos (1,5-4,5 ng/mL) y para los cuales ya no se observan diferencias relacionadas con el sexo (J. Risteli y cols., 1988; P. Trivedi y cols., 1989).

b) Estados patológicos

Los cambios en la concentración de P-III-P no son específicos de una enfermedad en concreto, sino que reflejan la implicación y el metabolismo alterado del colágeno de tipo III (O. Niemela, 1994; M. J. Boffa y cols., 1996; H. Zachariae y cols., 2001). En trastornos asociados a acumulación y/o degradación del tejido conjuntivo, por ejemplo en las enfermedades fibroproliferativas (fibrosis hepática y cirrosis), hematológicas, endocrinológicas y cancerígenas, se detectan concentraciones incrementadas de P-III-P.

Niños con deficiencia del crecimiento y pacientes deficientes de GH endógena tratados con rhGH, presentan concentraciones de P-III-P elevadas (P. Trivedi y cols., 1989 y 1991; J. Bollerslev y cols., 1996). En pacientes acromegálicos, donde la secreción endógena de GH está aumentada, la concentración en suero de P-III-P es igualmente elevada (G.G. Verde y cols., 1986).

La concentración sérica de P-III-P refleja los procesos de reparación y de cicatrización después de un infarto de miocardio (J. Satta y cols., 1995; P. Uusimaa y cols., 1997). Concentraciones elevadas de P-III-P sérica también han sido observadas en procesos de cicatrización de heridas (D. Ulrich y cols., 2002), y reparaciones óseas (N.M. Kurdy y cols., 1998; N.M. Kurdy, 2000).

Factores ambientales

El efecto del ejercicio en la concentración de P-III-P se ha estudiado, no sólo en su aplicación a la detección del abuso de la rhGH, sino en el estudio del músculo y el tejido conectivo, y su aplicación como posible marcador de la tensión y el daño provocado en el músculo esquelético.

En deportistas de élite, como en la población sedentaria, el principal factor de influencia en la concentración de P-III-P es la edad, en condición basal (C. Ehrnborg y cols., 2003; A.

Sartorio y cols, 2004b) y post-competición (M.-L. Healy y cols., 2005). No se han observado diferencias entre los deportistas de élite y la población sedentaria (A. Sartorio y cols., 2004b); y, entre los deportistas de élite, no se han observado diferencias en la concentración de P-III-P, ajustada por la edad, entre los distintos deportes (M.-L. Healy y cols., 2005).

Son pocos los estudios que describen como el ejercicio afecta la concentración de P-III-P, y la interpretación de los resultados dependerá del tipo y duración del ejercicio realizado, de los sujetos participantes y del protocolo de recogida de muestras. En deportistas recreacionales, mientras que un ejercicio concéntrico agudo de alta intensidad (menos de 10 minutos de duración) no produce cambios (P. Virtanen y cols., 1993); un ejercicio agudo de aproximadamente 30 minutos produce aumentos significativos en la concentración de P-III-P en suero, que vuelve a la normalidad tras 2 horas (J.D. Wallace y cols., 2000). En deportistas de élite, un test de ejercicio máximo (distinto dependiendo de la disciplina deportiva) produce también aumentos significativos de P-III-P que, igualmente, vuelven a la normalidad a las 2 horas (C. Ehrnborg y cols., 2003).

En deportistas altamente entrenados, se ha demostrado que la concentración de P-III-P aumenta significativamente tras una carrera de 24 horas (T.E.S. Takala y cols., 1986); pero no tras una competición de esquí de relevos de 24 horas (T.E.S. Takala y cols., 1989), que podría considerarse menos intensa. Es difícil definir exactamente el comportamiento de este marcador frente al ejercicio, aunque parece que tiende a aumentar.

Estos valores de P-III-P incrementados podrían estar relacionados con la degradación (efecto de la tensión y el posible daño) o el incremento de la producción (en los procesos de reparación) del colágeno de tipo III del tejido muscular y conectivo. Por otro lado, se ha observado la rápida presencia de P-III-P en la formación del callo de restauración tras una fractura ósea, más adelante reemplazado por colágeno de tipo I (N.M. Kurdy y cols., 1998; N.M. Kurdy, 2000). La curación de microfracturas óseas producidas por el repetido impacto realizado durante el ejercicio podría contribuir al incremento de las concentraciones séricas de P-III-P por síntesis y posterior degradación.

Detección de rhGH en muestras de orina

Tras la sangre, la orina es el segundo fluido biológico más importante en el cual se han realizado determinaciones clínicas de la GH (V. Popii y G. Baumann, 2004). La composición molecular de la GH en orina difiere de la plasmática en que tan sólo las formas monoméricas

son detectables, presumiblemente debido a la restrictiva filtración glomerular de formas oligoméricas (K.F. Hanssen, 1972; G. Baumann y E.C. Abramson, 1983). Sin embargo, además de que la concentración absoluta de GH en orina es muy inferior a la sérica, los niveles de GH en orina vuelven a la normalidad tras 24 h del cese de su administración (J. Leger y cols., 1995; M. Saugy y cols., 1996; D.E. Flanagan y cols., 1997). Por otro lado, la proteinuria post-ejercicio afecta a la concentración urinaria de GH impidiendo la utilización de la detección directa del abuso de la rhGH en orinas de competición (M. Saugy y cols., 1995).

En los estudios de administración de rhGH del Proyecto GH2000 se analizaron en orina las concentraciones de GH e IGFBP-3, y marcadores del recambio óseo (*crosslinks* de piridinium, Pyd, y deoxipiridinolina, Dpd). Las concentraciones de los péptidos GH e IGFBP-3 eran muy bajas, demostrando una gran variabilidad y un bajo poder discriminatorio de los grupos tratados con rhGH. Las concentraciones de marcadores óseos, *crosslinks* de Pyd y Dpd, demostraron un incremento significativo con la administración de la rhGH; sin embargo, se ha demostrado que sus concentraciones se ven muy afectadas por factores fisiológicos como la edad, el sexo, el ejercicio físico y la dieta (H.W. Vesper y cols., 2002).

La capacidad de la determinación de IGF-I en orina y su posible futura utilización en la detección del abuso de la rhGH también ha sido motivo de estudio (E.F. De Palo y cols., 2002a y b, y 2005). En ciclistas, se observaron diferencias en la concentración de IGF-I en orina debidas al ejercicio, efecto que no se observó en plasma, por lo que se consideró un efecto de la proteinuria post-ejercicio (E.F. De Palo y cols., 2002b, y 2005).

Existen otros factores que hacen de la IGF-I urinaria una mala candidata en la detección de la administración de la rhGH. El primero es el desconocimiento del origen de la IGF-I urinaria. En condiciones normales, la concentración de IGF-I presente en orina es de aproximadamente tres órdenes de magnitud inferior a la concentración en suero (B. Tonshoff y cols., 1995). Aunque parece que la IGF-I urinaria es originaria en su mayor parte de la IGF-I circulante no metabolizada en el riñón (H.P. Guler y cols., 1989), su producción en el propio riñón no se puede descartar (D.C. Aron y cols., 1989; E. Chin y C. Bondy, 1992). El otro factor es la respuesta de la IGF-I urinaria a la administración de rhGH. Tras la administración de rhGH, B. Tonshoff y colaboradores (1995) observaron que mientras la IGF-I sérica aumenta su concentración en un 50%, en orina no había alteración. Por otro lado, el estudio realizado por Uemasu y colaboradores (1996) observó que la administración de rhGH causaba una disminución en la excreción de la IGF-I debido a un efecto directo de la GH sobre la regulación del riñón.

1.4. Métodos de análisis de marcadores indirectos

Un primer paso en la utilización de una sustancia como biomarcador es la existencia de ensayos fiables para su determinación. Las concentraciones séricas de los biomarcadores de interés (EPO, sTfR, IGF-I y P-III-P) son habitualmente determinadas utilizando técnicas inmunológicas que han sido desarrolladas para su aplicación en el campo clínico. La variabilidad de los resultados obtenidos generalmente depende de las características del inmunoensayo utilizado, tales como la necesidad de pre-tratamiento de la muestra, el anticuerpo utilizado (especificidad, especificidad cruzada, etc.), el origen y la pureza del estándar utilizado para la preparación de la curva de calibración, las unidades de medida y el tipo de instrumentación requerida (técnica manual o automatizada). Por lo tanto, el conocimiento del tipo de inmunoensayo con el cual se han obtenido los resultados es un aspecto de gran importancia antes de comparar resultados entre distintos estudios.

1.4.1. Métodos de análisis de EPO

La EPO puede ser detectada en fluidos corporales mediante bioensayos o inmunoensayos (C. Breyman, 2000). Los bioensayos, tanto sean *in vivo* como *in vitro*, son poco sensibles y sujetos a interferencias, por lo que no son muy utilizados. Fue alrededor del 1980 cuando se desarrollaron los primeros inmunoensayos, radioinmunoensayo (RIA), que utilizaban EPO humana purificada de orina como antígeno y estándar (G. Lindstedt y P.-A. Lundberg, 1998). Más tarde, la EPO humana recombinante purificada se hizo disponible, y se establecieron las preparaciones internacionalmente aceptadas de hEPO urinaria (IRP 67/343) y recombinante (IS 87/684) (P.L. Storrington y R.E. Gaines Das, 1992). Entre los inmunoensayos comerciales se encuentran RIAs e inmunoensayos de unión a enzimas, que utilizan distintas preparaciones de rhEPO como estándar de calibración que están a su vez calibrados frente a los estándares internacionales.

Pese a haber sido la primera técnica utilizada, los RIAs tienen ciertos inconvenientes; entre ellos, la utilización de radioisótopos y el largo tiempo de incubación de muchos de los ensayos (D.D.F. Ma y cols., 1992). En la actualidad, se han desarrollado ensayos inmunométricos de unión a enzimas (*enzyme immunosorbent assay*, ELISA) utilizando los mismos principios de detección inmunológica que los RIAs (J.B. Sherwood y cols., 1988; J.T. Marsden y cols., 1999).

Estos ensayos son rápidos, exactos, baratos y capaces de cuantificar concentraciones muy bajas de EPO, concentraciones habitualmente indetectables utilizando bioensayos. Una desventaja de los inmunoensayos es que son capaces de detectar la hormona inmunoreactiva, pero no necesariamente la bioactiva, como en el caso de la deficiencia renal. Sin embargo, se ha descrito el diseño de un kit de ELISA cuyo anticuerpo monoclonal es capaz de determinar tan sólo la EPO bioactiva (I.C. MacDougall y cols., 1982).

Se han publicado diversos trabajos de comparación de inmunoensayos para la determinación de EPO (D.D.F. Ma y cols., 1992; A.G. Bechensteen y cols., 1993; G. Lindstedt y P.-A. Lundberg, 1998; J.T. Marsden y cols., 1999; E.W. Benson y cols., 2000; R. Parisotto y cols., 2001; W.E. Owen y W.L. Roberts, 2004). En uno de ellos (J.T. Marsden y cols., 1999), se realizó la evaluación de seis kits de EPO y se demostró que el rendimiento del RIA es aceptable a lo largo del rango de concentraciones 40-150 IU/L pero pobre en el límite inferior (10-15 IU/L); mientras que los kits de ELISA demostraron buena precisión a lo largo del rango 10-54 IU/L. También se ha observado que los límites de detección son generalmente más bajos con los ELISAs e inmunoensayos enzimáticos (0,25-2 IU/L) que en los RIAs (1-4,4 IU/L) (G. Lindstedt y P.-A. Lundberg, 1998; J.T. Marsden y cols., 1999). Por otro lado, en la comparación de las determinaciones de EPO sérica de los distintos métodos, se observó en algunos casos la presencia de sesgo sistemático (J.T. Marsden y cols., 1999). Incluso utilizando los mismos calibradores, los RIAs competitivos demuestran habitualmente valores de referencia superiores que los ensayos inmunométricos (ELISAs e inmunoensayos enzimáticos), que utilizan anticuerpos monoclonales de mayor especificidad por la EPO y detectan tan sólo una parte de sus isoformas (P.L. Storrington y R.E. Gaines Das, 1992; P.M. Cotes, 1994).

1.4.2. Métodos de análisis de sTfR

Existe un gran número de inmunoensayos comerciales para la determinación del sTfR. El tipo de inmunoensayo más habitual es el ELISA sándwich de anticuerpos mono o policlonales, y las técnicas automatizadas de turbidimetría o nefelometría. Con el objeto de determinar la aplicabilidad de los distintos inmunoensayos comerciales, se han publicado numerosos estudios de inter-comparación (E.P.A. Kuiper-Kraemer y cols., 1996; E.P.A. Kuiper-Kraemer y cols., 1997; P. Suominen y cols., 1997; G.S. Yeung, 1998; A. Akesson y cols., 1999; P. Suominen y cols., 1999; F. Cotton y cols., 2000; F.H. Wians y cols., 2001; N. Pariptoke y cols., 2001; R. Parisotto y cols., 2001; C. Thomas y L. Thomas, 2002). De las comparaciones inter-técnica publicadas hay que destacar que, en algunos casos, los inmunoensayos utilizaban distintas

unidades y, entre los que utilizaban las mismas unidades, se describían distintos intervalos de referencia de la concentración de sTfR. La principal explicación del porqué de estas diferencias en los valores normales no es el distinto tipo de anticuerpos utilizados, sino las marcadas diferencias existentes en los materiales utilizados en la calibración: receptor purificado de origen placentar, complejo transferrina-receptor de transferrina, y receptor de transferrina soluble extraído de suero (J.D. Cook, 1999).

La ausencia de un estándar internacional y la falta de una clara definición de la entidad química que es monitorizada en cada una de las técnicas hacen que los resultados obtenidos entre los distintos inmunoensayos no puedan ser comparados entre sí con respecto a los rangos tanto de referencia como patológicos. Hay que destacar que, a pesar de las diferencias descritas para los valores de normalidad por falta de estandarización, los cambios relativos de la concentración de sTfR observados en los distintos estados patológicos son remarcablemente similares sea cual sea el tipo de inmunoensayo utilizado.

1.4.3. Métodos de análisis de IGF-I

En la actualidad, existen distintos tipos de inmunoensayos para la determinación de la IGF-I total; entre ellos, técnicas de RIA, ELISA o mediante la utilización de autoanalizadores capaces de detectar quimioluminiscencia, turbulencia, etc. Sin embargo, no existe un método de referencia para la determinación de la IGF-I total contra el cual puedan calibrarse el resto de ensayos. Las divergencias observadas entre los distintos inmunoensayos son debidas, además de a las características de los anticuerpos utilizados, a la técnica de disociación de las IGFBPs, y a la selección de la preparación de IGF-I a ser utilizada como estándar de referencia y trazador.

La determinación de la IGF-I total requiere de un pre-tratamiento que permita, con la mayor eficiencia posible, disociar la IGF-I del complejo ternario presente en circulación. Sin embargo, no todos los métodos de pre-tratamiento de las muestras eliminan eficientemente las IGFBP's. Se han descrito diversas estrategias para la reducción de las interferencias de las IGFBPs en la determinación de la IGF-I, todas ellas utilizando la disociación de las IGFBPs en condiciones ácidas. Los métodos más utilizados son aquellos en los que se produce una separación de la IGF-I de las IGFBPs: la cromatografía de exclusión por tamaño en condiciones ácidas (R.L. Hintz y F. Liu, 1977), la extracción en fase sólida incluyendo las columnas SEP-PAK (W.H. Daughaday y cols., 1987), la extracción ácido-etanol (W.H. Daughaday y cols., 1980), la crioprecipitación

ácido-etanol (B.H. Breier y cols., 1991 BM-hGH-E039), la extracción con ácido fórmico (R.R. Bowsher y cols., 1991), o la extracción con Sephacryl (L.G. Moore y M.E. Mylek, 1993).

La técnica de acidificación previa a la cromatografía en columna Sephadex G-75, desarrollada por R.L. Hintz y F. Liu (1977), es considerada la técnica más fiable como método de extracción, aunque su aplicación es poco habitual en ensayos de rutina al tratarse de un procedimiento caro y laborioso. En sustitución, W.H. Daughaday y cols. (1980) describieron la disociación ácido-etanol seguida de la centrifugación de las IGF-BPs precipitadas en etanol. Sin embargo, esta técnica recupera habitualmente sólo entre un 70 y un 80% de la IGF-I unida a las IGF-BPs como resultado de la coprecipitación de la IGF-I con las IGF-BPs (W.F. Blum y B.H. Breier, 1994). Este procedimiento también reduce la sensibilidad debido a la dilución de la muestra durante la extracción, y la eliminación de las IGF-BPs no es completa, pudiendo seguir interfiriendo en el ensayo. Asimismo, las técnicas de extracción ácido-etanol y ácido fórmico son inefectivas en otras matrices diferentes a la sangre, en las cuales las IGF-BPs se encuentran en grandes cantidades.

Con la intención de evitar las desventajas de las técnicas de separación física, se ha propuesto un nuevo método de disociación consistente en el bloqueo de los lugares de unión de las IGF-BPs con un exceso de IGF-II, una proteína de la familia de las IGF, la cual es capaz de unirse a las IGF-BPs, dejando la IGF-I libre para unirse con un anticuerpo anti-IGF-I altamente específico (W.F. Blum y B.H. Breier, 1994). Un estudio de evaluación de siete inmunoensayos, con distintos métodos de pre-tratamiento y utilizando la misma preparación de IGF-I como estándar, analizó muestras de plasma de controles y pacientes con diabetes de tipo I y II (R.E. Chesnut y V. Quarumby, 2002). Para la mayoría de los inmunoensayos, los resultados obtenidos para las muestras control correlacionaban bien. Sin embargo, en el caso del análisis de las muestras de pacientes diabéticos, esta correlación sólo se daba en los inmunoensayos que utilizaban como técnica de separación de las IGF-BPs la ocupación de sus sitios de unión con un exceso de IGF-II.

Como en el caso de la EPO, los inmunoensayos comerciales utilizan distintas preparaciones de rhIGF-I como estándar de calibración que están a su vez calibrados frente a los estándares internacionales. En la actualidad, tan sólo existen dos estándares internacionales de IGF-I, ambos casos proteínas recombinantes (WHO IRR 87/518 y WHO IRR 91/554). La selección de la IGF-I a ser utilizada como estándar debe ser cuidadosa, pues en algunos casos las preparaciones de IGF-I no son homogéneas. Algunas preparaciones contienen variantes de la IGF-I con uniones disulfuro equivocadas, produciéndose formas mal plegadas, y que revelan

una marcada heterogeneidad (G. Buell y cols., 1985; H. Meng y cols, 1988). Estas variantes demuestran inusuales afinidades para los distintos antisueros, haciendo dependientes del anticuerpo los resultados del ensayo (B.H. Breier y cols., 1991). En un estudio de evaluación de inmunoensayos se determinó que la potencial causa de discrepancia era el origen del estándar utilizado en su calibración (V. Quarmby y cols., 1998). Se observó que las preparaciones comerciales de rhIGF-I eran de baja pureza y, en algunos casos, de masa mal asignada (la mayoría calibradas frente al estándar internacional WHO IRR 87/518). Al analizar el estándar WHO IRR 87/518 se observó que tenía una pureza de tan sólo el 44% y, además, se trataba de una IGF-I con una metionina adicional.

El anticuerpo utilizado es también un aspecto importante. Cuanto mayor es la afinidad del anticuerpo primario comparado con la afinidad de las IGF-BPs, menos severa será la interferencia de estas últimas en el ensayo (W.F Blum y B.H. Breier, 1994). La utilización de anticuerpos de alta afinidad hace más sensible el inmunoensayo y, por lo tanto, permite una mayor dilución de la muestra para disminuir la concentración de las IGF-BPs. El método de disociación por bloqueo de las IGF-BPs en exceso de IGF-II, además de requerir una alta afinidad para ser capaz de detectar la IGF-I tras diluir la muestra, requiere una muy alta especificidad, de forma que interaccione exclusivamente con la IGF-I.

1.4.4. Métodos de análisis de P-III-P

A nuestro conocimiento, tan sólo dos inmunoensayos para la determinación de P-III-P se encuentran disponibles comercialmente en la actualidad. Aunque ambos son radioinmunoensayos, presentan diferencias importantes.

El primero de ellos, el RIA-gnost PIIIP, se trata de un RIA sándwich y fue éste el utilizado en el desarrollo de los modelos matemáticos del Proyecto GH2000 (S. Longobardi y cols., 2000). Aunque no hay información de la naturaleza exacta del estándar utilizado en el inmunoensayo ni información clara del fabricante sobre su desarrollo, este RIA parece ser originario del descrito en un trabajo publicado en 1979 por H. Rohde y colaboradores. En este trabajo se describía el desarrollo de un radioinmunoensayo sensible y específico para el segmento localizado en el extremo N-terminal del procolágeno tipo III bovino (segmento de 45 kDa de peso molecular), y que presentaba una alta reactividad cruzada con el procolágeno tipo III humano. Sin embargo, aquel inmunoensayo presentaba ciertos problemas prácticos en su aplicación a muestras de suero humano ya que reconocía el determinante antigénico más

importante del péptido, localizado en el dominio N-terminal (Rohde H y cols., 1979), en al menos tres formas de diferente tamaño (Rohde H y cols., 1979; O. Niemela y cols., 1982). La más pequeña de las formas antigénicas correspondía al dominio Col 1 del péptido, de 10 kDa. Estos productos de degradación se encuentran presentes en mayor concentración en suero y reaccionan con los anticuerpos con menos afinidad que el péptido completo (Col 1-3, de peso molecular 42 kDa). Por lo tanto, la curva de inhibición obtenida cuando se analizaban muestras de suero humano era considerablemente menos escalonada que cuando se utilizaba el péptido de referencia (el P-III-P de origen bovino) (O. Niemela y cols., 1982). Para superar estos problemas, se introdujeron modificaciones en el ensayo para determinar mayoritariamente los productos de degradación (fragmentos con los distintos dominios del P-III-P) (H. Rohde y cols., 1983; D. Pierard y cols., 1984; O. Niemela, 1985).

En 1988, O. Niemela y colaboradores describieron un nuevo inmunoensayo, en el que se basa el otro RIA disponible (UniQ PIIINP RIA, competitivo), con la intención de minimizar la interferencia de los antígenos de bajo peso molecular presentes en suero. Para ello seleccionaron el péptido del procolágeno tipo III humano, previamente purificado y caracterizado, y lo utilizaron en la producción de un antisuero específico (O. Niemela, 1985; O. Niemela y cols., 1985). En este mismo trabajo se realizó la comparación de la nueva técnica con la ya existente, RIA-gnost, y que en aquel momento utilizaba las mismas unidades. Se observó que los resultados obtenidos con el nuevo RIA eran 2,8 veces más pequeños. Esto era esperable puesto que la técnica de RIA-gnost también detectaba los fragmentos de degradación del P-III-P.

Más recientemente se han realizado estudios de comparación entre distintos inmunoensayos para la determinación del P-III-P. Entre ellos la comparación de RIAs basados en la utilización de fragmentos de Fab' o el anticuerpo entero para la predicción de la edad fetal (P. Vanhaesebrouck y cols., 1994); o la comparación de los dos RIAs comercialmente disponibles en la utilización del P-III-P como marcador de la hepatitis C crónica (K.M. Walsh y cols., 1999). En este último caso, los resultados fueron descritos para los dos RIAs sin hacer una comparación directa de los mismos, no sólo por considerarse que cada uno de los inmunoensayos estaba determinando cosas distintas (RIA-gnost determinaba el P-III-P y los péptidos Col 1-3 y Col 1, y el RIA UniQ PIIINP determinaba sólo el P-III-P); sino porque, además, las unidades utilizadas por ambos RIAs eran distintas (U/mL y ng/mL, respectivamente). En el actual RIA-gnost (U/mL) las unidades utilizadas son arbitrarias y no están definidas por el fabricante, dificultando la correspondencia directa entre los resultados de ambos inmunoensayos.

2. Justificación y objetivos

El abuso de fármacos en el deporte se ha evidenciado como un problema creciente en las últimas décadas. Además de las razones relacionadas con el "juego limpio" de la práctica deportiva, el argumento más importante para luchar contra este abuso se fundamenta en el riesgo evidente que tiene para la salud la utilización de sustancias farmacológicamente activas en dosis no terapéuticas o fuera del requerido control médico. Pero, si evidente es la mala utilización de medicamentos y otras técnicas por deportistas profesionales (F. Minuto y cols., 2003), este fenómeno alcanza una auténtica dimensión de problema de salud pública cuando se extiende a la población general aficionada a la práctica deportiva. Se han descrito altas tasas de consumo de medicamentos con serios efectos secundarios por parte de deportistas aficionados, en ocasiones desde edades muy tempranas, con la intención de mejorar su rendimiento y apariencia física (P. Laurie, 1997).

A medida que el control de agentes dopantes tradicionales como estimulantes y esteroides anabolizantes se ha hecho más efectivo, los atletas con interés en doparse han dirigido su atención hacia el empleo de sustancias endógenas de difícil detección. Esto incluye, de modo particular, la aplicación de hormonas peptídicas obtenidas por técnicas de ADN recombinante, como la rhEPO y la rhGH. Estas sustancias recombinantes, además de ser prácticamente iguales a las moléculas endógenas, tienen un tiempo de vida media en circulación muy corto en comparación con la duración de sus efectos, lo que hace de su potencial detección directa un sistema de utilidad sólo parcial en el control antidopaje.

Con la intención de ampliar la ventana de detección del consumo de rhEPO y rhGH, se han investigado métodos de detección indirecta de posible aplicación en el cribado y seguimiento de atletas sospechosos del abuso de hormonas recombinantes. Estos métodos se basan en la utilización de biomarcadores presentes en la circulación sanguínea. La selección de estos biomarcadores indirectos se ha realizado teniendo en cuenta aquellos parámetros cuyas concentraciones se ven directamente afectadas por la administración de la hormona recombinante. De entre ellos, seleccionar los parámetros cuyos cambios en sus concentraciones puedan observarse durante un largo periodo de tiempo tras el cese de la administración de la hormona; pero, también, que sean relativamente estables frente a variaciones biológicas o ambientales.

Entre las distintas propuestas de detección indirecta de rhEPO y rhGH, destacan las desarrolladas en los proyectos EPO2000 y GH2000 por investigadores europeos y australianos, principalmente. A partir de estudios de administración con rhEPO o rhGH realizados en atletas

recreacionales, se han propuesto una serie de biomarcadores indirectos que, incorporados a modelos matemáticos, son capaces de discriminar entre placebo y administración (J.D. Wallace y cols., 1999 y 2000; R. Dall y cols., 2000; S. Longobardi y cols., 2000; R. Parisotto y cols., 2000 y 2001). En el proyecto EPO 2000, se han propuesto distintos biomarcadores indirectos determinados en sangre total (Hct, Hb, %ret, etc.), junto con la EPO y el sTfR, determinados en suero (R. Parisotto y cols., 2001; C.J. Gore y cols., 2003). Entre los biomarcadores propuestos para la rhGH, se encuentran los relacionados con el eje GH/IGF-I: IGF-I, IGF-II, las IGFFBPs, o la ALS; y los relacionados con el metabolismo del hueso y el colágeno: P-III-P, PICP, o ICTP (J.D. Wallace y cols., 1999 y 2000; R. Dall y cols., 2000; S. Longobardi y cols., 2000).

Teniendo en cuenta que los modelos indirectos propuestos han sido desarrollados a partir de valores obtenidos utilizando un ensayo concreto, antes de su aplicación mediante otro ensayo, es necesario demostrar que los valores de concentración obtenidos son independientes de la técnica de determinación empleada. Para ello es necesario realizar su validación. Aunque muchos de esos métodos ya han sido evaluados por las casas comerciales, incluso entre los inmunoensayos estandarizados se producen variaciones debidas a diferencias en la especificidad de los anticuerpos, el origen de los calibradores, etc (P.L. Storrington y R.E. Gaines Das, 1992; W.F Blum y B.H. Breier, 1994; P.M. Cotes, 1994; V. Quarumby y cols., 1998; J.T. Marsden y cols., 1999). En el caso de parámetros que carecen de estándares internacionales, como son el sTfR o el P-III-P, la comparación entre métodos analíticos se complica todavía más (Rohde H y cols., 1979; O. Niemela y cols., 1982; J.D. Cook, 1999). Por todo ello, antes de la utilización de estos biomarcadores indirectos, es necesario demostrar que el método de detección es suficientemente robusto para resistir el desafío legal y permitir la acusación justa de aquellos que las usan ilegalmente.

La principal ventaja de los marcadores indirectos es que los cambios pueden ser observados durante un cierto periodo de tiempo después del cese de la administración de la hormona recombinante (J.D. Wallace y cols., 1999 y 2000; R. Dall y cols., 2000; S. Longobardi y cols., 2000; R. Parisotto y cols., 2000 y 2001). Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos marcadores pueden estar afectados, en la población estándar por factores intra e inter-individuales, como puede ser la edad y el sexo, o patologías que afecten a la fisiología de estas hormonas; y, en los deportistas, por la distinta intensidad o tipo de entrenamiento, por estrés de competición, o la presencia de lesiones óseas y del tejido conectivo, muy frecuente en los atletas (K. Sharpe y cols., 2002; C. Ehrnborg y cols., 2003; M.-L. Healy y cols., 2005). Por ello, es necesario el estudio del comportamiento de los biomarcadores indirectos propuestos en distintas situaciones fisiológicas, tanto en deportistas de elite como en deportistas

recreacionales, y también en distintas condiciones ambientales que podrían dar lugar a modificaciones de los mismos. Estos estudios son necesarios para establecer con mayor fiabilidad los rangos de normalidad de dichos biomarcadores, y validar los criterios propuestos para detectar el consumo de rhEPO y rhGH.

El objetivo principal del presente trabajo consiste en determinar los valores poblacionales de los biomarcadores indirectos EPO, sTfR, IGF-I y P-III-P, en poblaciones seleccionadas de deportistas, y el efecto del ejercicio y los distintos tipos de entrenamiento sobre su concentración en suero.

Los objetivos concretos del proyecto son:

1. Comprobar que las concentraciones de los biomarcadores indirectos seleccionados para detectar el consumo de rEPO y rhGH son independientes de la técnica utilizada, evaluando el grado de concordancia de los resultados obtenidos utilizando diferentes técnicas analíticas disponibles comercialmente en diferentes laboratorios.
2. Valorar el efecto de la intensidad de entrenamiento y el ejercicio de resistencia en deportistas de elite y deportistas recreacionales sobre la concentración de los marcadores indirectos del consumo de rhEPO y rhGH.
3. Valorar el efecto de la estancia temporal en altitud simulada (exposición intermitente a hipoxia en cámara hipobárica) sobre la concentración de los marcadores indirectos del consumo de rhEPO.

3. Validación de técnicas inmunológicas para la determinación de los biomarcadores indirectos del abuso de rhEPO y rhGH

3.1. Introducción

Sea cual sea la determinación a realizar, la medida obtenida debe ser precisa y exacta. Las determinaciones deben utilizar técnicas capaces de dar resultados consistentes independientemente de la técnica y reproducibles en distintos laboratorios (C. Hartmann y cols., 1998; EAEMP, CPMP/ICH/281/95, 1995; EMEA/CVMP/591/98, 1998; ENAC, G-CSQ-02, 1996; FDA/CDER, GI/BMV, 2001). Los biomarcadores indirectos de rhEPO y rhGH son determinados habitualmente utilizando técnicas inmunológicas disponibles en el mercado. En las técnicas inmunológicas, la utilización de distinto anticuerpo con diferente especificidad, o distinto calibrador, puede variar los resultados y, por tanto, los rangos de referencia del parámetro analizado. Por ello, la utilización de inmunoensayos comerciales no excluye la necesidad de estudios exhaustivos con la finalidad de caracterizar el comportamiento de estas técnicas y comparar los resultados obtenidos entre laboratorios independientes.

En este capítulo se describen el protocolo utilizado y los resultados obtenidos en la evaluación de distintos inmunoensayos para la determinación en suero de los biomarcadores indirectos del abuso de rhEPO y rhGH (EPO, sTfR, IGF-I y P-III-P). Se incluye, además, el estudio de la estabilidad de estos biomarcadores bajo ciclos de congelación/descongelación, y en distintas condiciones de almacenaje y transporte.

3.2. Material y métodos

3.2.1. Muestras analizadas

Las muestras de suero utilizadas en la validación de los distintos inmunoensayos se obtuvieron de voluntarios seleccionados entre la población normal y pacientes del Hospital de Sant Pau con anomalías hematológicas. La selección se hizo con la intención de cubrir los rangos de calibración de las distintas técnicas estudiadas, y no la de inferir ninguna diferencia interindividual entre ellos.

Todos los estudios realizados fueron previamente aprobados por el Comitè Ètic per la Investigació Clínica del IMAS (Institut Municipal d'Assistència Sanitària, Barcelona, España), número de protocolo 2000/1145/I; y realizados de acuerdo con las recomendaciones de la

Declaración de Helsinki. En todo momento se garantizaron los aspectos confidenciales de muestras y resultados.

La sangre se obtuvo, en condiciones de reposo, mediante extracción de la vena antecubital utilizando el sistema Vacutainer® (tubos con gel coactivador de la coagulación). Tras un periodo de coagulación de aproximadamente 20 min. a temperatura ambiente, las muestras de sangre fueron centrifugadas para obtener el suero. Las muestras de suero fueron alicuotadas, etiquetadas y conservadas a -80°C hasta su análisis.

3.2.2. Inmunoensayos evaluados

El protocolo de validación se aplicó a las siguientes técnicas inmunológicas:

Biomarcadores indirectos del abuso de rhEPO	Biomarcadores indirectos del abuso de rhGH
<p>Ensayos de EPO: Immulite*, Diagnostic Products Corporation (CHEM) Quantikine*, R&D Systems (ELISA)</p>	<p>Ensayos de IGF-I total: Nichols Institute Diagnostics (RIA1) Mediagnost (RIA2) Quantikine, R&D Systems (ELISA)</p>
<p>Ensayos de sTfR: Orion Diagnostica (ELISA1) Quantikine*, R&D Systems (ELISA2) Roche Diagnostics (Turbid) Dade Behring* (Nephel)</p>	<p>Ensayos de P-III-P: Cis-bioInternational* (RIA3) Orion Diagnostica (RIA4)</p>

* Inmunoensayos utilizados en el desarrollo de los modelos matemáticos de detección indirecta de las hormonas recombinantes rhEPO y rhGH (J.D. Wallace y cols., 1999 y 2000; R. Dall y cols., 2000; S. Longobardi y cols., 2000; R. Parisotto y cols., 2000 y 2001; C.J. Gore y cols., 2003).

Con el objeto de incluir aquellas técnicas más representativas, la selección de los inmunoensayos para la determinación en suero de los biomarcadores de interés se realizó siguiendo estos cuatro criterios:

- 1) disponibilidad en el mercado,
- 2) prioridad de aquellas técnicas que fueron utilizadas en el desarrollo de los modelos matemáticos de detección indirecta de rhEPO y rhGH,

3) preferencia de la metodología manual frente a las automatizadas, debido a una mayor facilidad de implantación en el laboratorio de control antidopaje, y

4) utilización de distinto procedimiento analítico.

En el caso particular del biomarcador P-III-P, se seleccionaron los que, a nuestro conocimiento, eran los únicos dos ensayos disponibles comercialmente para su determinación.

3.2.3. Laboratorios participantes

En el estudio participaron los siguientes tres laboratorios independientes:

Laboratorio 1: Unitat de Recerca en Farmacologia (Institut Municipal d'Investigació Mèdica, IMIM, Barcelona, España),

Laboratorio 2: Drug Research and Control Department (Istituto di Sanità, ISS, Rome, Italy),
y Laboratorio 3: Departament d'Hematologia (Hospital de Sant Pau, Barcelona, España).

3.2.4. Validación de técnicas inmunológicas

La evaluación consistió en la validación intra e inter-laboratorio de cada una de las técnicas seleccionadas, junto con el estudio de la correlación de los resultados de un mismo biomarcador obtenidos utilizando distinta técnica (validación inter-técnica) (C. Hartmann y cols., 1998; EAEMP, CPMP/ICH/281/95 y EMEA/CVMP/591/98, 1998; ENAC, G-CSQ-02, 1996; FDA/CDER, GI/BMV, 2001).

Validación intra-laboratorio

La evaluación intra-laboratorio de cada una de las técnicas estudiadas fue realizada en los Laboratorios 1 y 2, excepto para las técnicas turbidimétrica y nefelométrica del sTfR que fueron únicamente validadas en el Laboratorio 3.

La validación intra-laboratorio se realizó en tres ensayos siguiendo el esquema que se describe en la Tabla 3.1. Los parámetros determinados fueron los siguientes: ajuste de la curva, precisión y exactitud intra-día e inter-día, y límites de detección y cuantificación.

Para cada uno de los procedimientos de ELISA y RIA, se calculó un modelo matemático para establecer el ajuste entre la señal y la concentración. Para definir el correcto ajuste de la curva,

se calculó el % de error entre el valor de concentración asignado a los calibradores y el valor obtenido con la curva de ajuste elegida. En el caso de las técnicas inmunológicas que utilizan autoanalizadores (quimioluminiscencia, turbidimetría y nefelometría), el ajuste a la curva de calibración se obtuvo de forma automática.

Los procedimientos de ELISA se ajustaron utilizando la siguiente ecuación lineal entre los logaritmos de la absorbancia y de la concentración del analito:

$$\ln(Abs - Abs_0) = b \ln[\text{analito}] + a$$

donde Abs = (media de la absorbancia de la muestra problema), y Abs_0 = (media de la absorbancia del calibrador cero); y , a y b son constantes del ajuste lineal.

En los procedimientos de RIA competitivos, se utilizaron dos modelos matemáticos para el ajuste de la señal (cuentas por minuto, cpm) y la concentración del analito. Uno fue la ecuación logit:

$$-\ln\left(\left(\frac{B_0}{B}\right) - 1\right) = b \ln[\text{analito}] + a$$

donde B_0 = (media de las cpm del calibrador cero) – (media de las cpm de la unión no específica), y B = (cpm de la muestra problema) – (media de las cpm de la unión no específica); y , a y b son constantes del ajuste lineal.

El otro modelo matemático utilizado fue el ajuste sigmoidal:

$$\left(\frac{B}{B_0}\right) \% = \frac{b}{1 + \left(\frac{[\text{analito}]}{c}\right)^s} + a$$

donde B_0 y B se describen de la misma forma que para la ecuación logit; y , a , b , c y s son constantes que definen la forma de la curva sigmoidal. Los valores de a y b corresponden a las asíntotas inferior y superior de la curva, respectivamente. El parámetro c es la concentración que corresponde al punto de inflexión de la curva, y el parámetro s está relacionado con la pendiente de la curva en el punto de inflexión. El modelo sigmoidal fue calculado con el programa GRAFIT (versión 3.01, R.J. Leatherbarrow).

Para el procedimiento de RIA sándwich, se utilizó también un ajuste sigmoïdal entre la señal (cpm) y la concentración del analito, calculado con el programa GRAFIT:

$$\text{cpm} = \frac{b}{1 + \left(\frac{[\text{analito}]}{c}\right)^s} + a$$

La precisión se define como la medida del valor aleatorio expresada por la dispersión obtenida en una serie de medidas repetidas realizadas durante el mismo ensayo (intra-ensayo) o diversos ensayos realizados en distintos días (inter-ensayo). La exactitud es el grado de concordancia entre el resultado de una medición (expresado como la medida de una serie de medidas realizadas durante el mismo ensayo (intra-ensayo), o diversos ensayos realizados en distintos días (inter-ensayo)) y el valor de referencia aceptado. Precisión y exactitud fueron determinadas mediante el análisis de muestras de control de calidad (*quality control*, QC) de la siguiente forma (Tabla 3.1):

- Intra-día (o intra-ensayo): 5 análisis de las muestras QC en el mismo ensayo.
- Inter-día (o inter-ensayo): 5 análisis de las muestras QC en 3 días subsiguientes utilizando el mismo lote de reactivos.

Tabla 3.1: Ejemplo de protocolo de ensayos para la validación de técnicas analíticas.

Descripción	Nivel	Ensayo 1			Ensayo 2		Ensayo 3		
		F/T 0	F/T 1	F/T 2	F/T 0	F/T 1	F/T 0	F/T 1	S/T
Calibrador	1	5			2		2		
Calibrador	2	2			2		2		
Calibrador	3	2			2		2		
Calibrador	4	2			2		2		
Calibrador	5	2			2		2		
Calibrador	6	2			2		2		
Control	Bajo	5	5	5		5		5	5
Control	Alto	5	5	5		5		5	5

F/T, ciclos de congelación/descongelación (*freeze/thaw*); S/T, condiciones de almacenaje y transporte (*storage/transport*).

Previo a la determinación de la precisión y la exactitud, se realizó el test de contraste de Dixon a cada uno de los quintuplicados y fueron eliminados aquellos valores considerados aberrantes (J.N. Miller y J.C. Miller, 2000).

La precisión se expresó como el coeficiente de variancia relativo (CV%) de las determinaciones realizadas. La exactitud se expresó como el error relativo del valor obtenido con respecto al valor asignado de las muestras QC. Para algunas de las muestras QC, en lugar de un valor asignado de concentración, el fabricante definía un rango de aceptación de concentración; en estos casos, la exactitud se evaluó como correcta si la media de los valores obtenidos para la concentración se encontraba dentro del rango de aceptación.

Para calcular los límites de detección (*limit of detection*, LOD) y cuantificación (*limit of quantification*, LOQ) de cada una de las técnicas, una muestra blanco (ausencia de analito) fue analizada cinco veces en el mismo ensayo (Tabla 3.1). La media de los valores obtenidos para la muestra blanco se utilizó como medida del ruido. El LOD y el LOQ se definieron como la concentración estimada del ruido más, o menos (dependiendo de la pendiente de la curva de calibración), tres y diez veces el valor de la desviación estándar de los valores obtenidos para el blanco, respectivamente.

Validación inter-laboratorio

La validación inter-laboratorio de cada una de las técnicas se realizó analizando las mismas muestras de suero humanas en dos laboratorios independientes (Laboratorios 1 y 2). Para evaluar la concordancia entre los resultados obtenidos en los dos laboratorios se calculó el coeficiente de correlación intra-clase (*intra-class correlation coefficient*, ICC) utilizando el modo de efectos aleatorios (Fleiss, 1999).

Para evaluar la dispersión de los resultados obtenidos entre los dos laboratorios, se realizó una modificación de los gráficos de Bland-Altman (1983). La media de los valores de concentración fue representada frente a la diferencia relativa entre concentraciones. Los límites de acuerdo del 95% (*95% limits of agreement*, 95% LA) fueron calculados con la siguiente ecuación:

Media de la diferencia relativa $\pm 1,96$ x desviación estándar de la diferencia relativa

Validación inter-técnica

La validación inter-técnica se realizó en el Laboratorio 1 analizando el mismo analito en las mismas muestras de suero humanas utilizando distintos inmunoensayos; a excepción de las técnicas turbidimétrica y nefelométrica del sTfR, que fueron únicamente validadas en el Laboratorio 3. La concordancia de los resultados obtenidos con las distintas técnicas fue evaluada utilizando el método de Passing-Bablok (1983).

La dispersión de los resultados obtenidos entre las distintas técnicas fue evaluada mediante una modificación de los gráficos de Bland-Altman, igual que para la dispersión inter-laboratorio.

3.2.5. Estudios de estabilidad

Los estudios de estabilidad se realizaron utilizando dos tipos distintos de muestras dependiendo del biomarcador de estudio: muestras QC preparadas o suministradas por los diversos fabricantes, y/o muestras de suero humano (FDA/CDER, GI/BMV, 2001).

Estabilidad en ciclos de congelación/descongelación

La evaluación de la estabilidad bajo ciclos de congelación/descongelación (*freeze/thaw*, F/T) se realizó comparando los resultados de las muestras analizadas sin estar sujetas a ningún ciclo de congelación/descongelación (F/T 0) con aquellos obtenidos después del almacenamiento en las siguientes condiciones (Tabla 3.1):

- un ciclo de congelación/descongelación (F/T 1), muestra guardada a -80°C durante 30 minutos, descongelada a temperatura ambiente durante 30 minutos y descongelada a temperatura ambiente para su análisis; y
- repitiendo el mismo ciclo de congelación/descongelación dos veces (F/T 2) antes de su análisis.

En el caso de las muestras de suero humanas, de las cuales no se tenía un análisis previo a ser congeladas, se tomó el ciclo de congelación/descongelación F/T 1 como referencia, repitiendo este mismo ciclo dos y tres veces (F/T 2 y F/T 3).

Estabilidad en condiciones de almacenaje/transporte

La estabilidad en condiciones de almacenaje/transporte (*storage/transport, S/T*) fue también evaluada de diversas maneras:

- condiciones de transporte simulado, muestras guardadas congeladas a -80°C durante 48 h, a -20°C durante 48 h, a -80°C durante al menos 48 h más, y descongeladas a temperatura ambiente para su análisis;

- condiciones de transporte simulado defectuoso, muestras guardadas congeladas a -80°C durante 48 h, descongeladas a temperatura ambiente durante al menos 48 h antes de su análisis;

- y condiciones reales de transporte, muestras almacenadas a -80°C en el Laboratorio 1 fueron enviadas al Laboratorio 2 en nieve carbónica por mensajería en un intervalo de tiempo de aproximadamente 48 h, y guardadas a -80°C en el Laboratorio 2 hasta su análisis.

El valor de la concentración de las muestras para cada una de las condiciones de estabilidad estudiadas fue determinado mediante su análisis por quintuplicado en el mismo ensayo (Tabla 3.1). Previamente a la determinación del valor medio de la concentración, se realizó el test de contraste de Dixon para eliminar valores aberrantes (J.N. Miller y J.C. Miller, 2000). Finalmente, los resultados obtenidos fueron comparados con aquellos obtenidos para la muestra analizada justo después de su preparación (muestras QC), o su primer ciclo F/T (muestras de suero humanas). Para evaluar la estabilidad del analito, se calculó su porcentaje de degradación en cada una de las condiciones estudiadas.

3.2.6. Análisis estadísticos

Todos los cálculos estadísticos fueron realizados utilizando el paquete estadístico SPSS 2001 para Windows, versión 11.5.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). El método de Passing-Bablok fue calculado con la Macro de SPSS !PB v10.10.1999 (c) de A. Bonillo.

3.3. Resultados

3.3.1. Evaluation of immunoassays for the measurement of erythropoietin (EPO) as an indirect biomarker of recombinant human EPO misuse in sport

Rosario Abellán, Rosa Ventura, Simona Pichini, Ángel F. Remacha, José Antonio Pascual, Roberta Pacifici, Rita Di Giovannandrea, Piergiorgio Zuccaro, Jordi Segura.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2004; 34: 1169-1177.

3.3.2. Evaluation of immunoassays for the measurement of soluble transferrin receptor (sTfR) as an indirect biomarker of recombinant human EPO misuse in sport

Rosario Abellán, Rosa Ventura, Simona Pichini, M. Pilar Sardà, Ángel F. Remacha, José Antonio Pascual, Ilaria Palmi, Antonella Bacosi, Roberta Pacifici, Piergiorgio Zuccaro, Jordi Segura.

Journal of Immunological Methods 2004; 295: 89-99.

3.3.3. Evaluation of immunoassays for the measurement of IGF-I and P-III-P, indirect biomarkers of recombinant human growth hormone misuse in sport

Rosario Abellán, Rosa Ventura, Simona Pichini, José Antonio Pascual, Roberta Pacifici, Simonetta Di Carlo, Antonella Bacosi, Jordi Segura, Piergiorgio Zuccaro.

Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2005; 43: 75-85.

[Nota: Por problemas de copyright, no es posible ofrecer el texto completo.]



Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis
35 (2004) 1169–1177

JOURNAL OF
PHARMACEUTICAL
AND BIOMEDICAL
ANALYSIS

www.elsevier.com/locate/jpba

Evaluation of immunoassays for the measurement of erythropoietin (EPO) as an indirect biomarker of recombinant human EPO misuse in sport

Rosario Abellan^{a,b}, Rosa Ventura^{a,b}, Simona Pichini^c, Angel Francisco Remacha^d,
Jose Antonio Pascual^{a,b}, Roberta Pacifici^c, Rita Di Giovannandrea^c,
Piergiorgio Zuccaro^c, Jordi Segura^{a,b,*}

^a *Unitat de Recerca en Farmacologia, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, C/Doctor Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain*

^b *Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, C/Doctor Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain*

^c *Drug Research and Control Department, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Rome, Italy*

^d *Departament d'Hematologia, Hospital de Sant Pau, C/Sant Antoni M^o Claret 167, 08025 Barcelona, Spain*

Received 13 October 2003; received in revised form 20 January 2004; accepted 3 February 2004

Available online 7 June 2004

Abstract

The measurement of serum erythropoietin (EPO) has been proposed as one of the indirect biomarkers for the detection of recombinant human EPO misuse in sport. An extended inter-laboratory validation of two commercial immunoassays for EPO measurement is described. A chemiluminescent immunoassay kit (CHEM) and an enzyme-linked immunosorbent assay kit (ELISA) were evaluated.

The CHEM assay showed intra-laboratory precision better than 6% and correct accuracy values for all quality control samples tested. Precisions and accuracies better than 7 and 13%, respectively, were obtained for the ELISA assay for most of the quality control samples. The limit of quantification estimated for CHEM assay was lower than for the ELISA assay.

Inter-laboratory concordance was good for both the assays, with lower dispersion shown by the CHEM assay. Results obtained with the ELISA assay were always lower than those of the CHEM assay. However, a good inter-technique correlation was obtained ($[ELISA] = 0.76 [CHEM] + 0.06$, $r^2 = 0.92$).

Quality control samples had a good stability after one and two freeze/thaw cycles and in simulated transportation conditions.

In conclusion, CHEM and ELISA assays showed similar characteristics regarding intra-laboratory validation. Better inter-laboratory results were obtained with the CHEM assay and, hence, it is considered the recommended assay for anti-doping control analysis.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: EPO; Indirect biomarker; Doping; Validation; Immunoassay; Stability

1. Introduction

The administration of recombinant human erythropoietin (rhEPO) produces an increase of the red cell

* Corresponding author. Tel.: +34-93-2211009;

fax: +34-93-2213237.

E-mail address: jsegura@imim.es (J. Segura).

mass, haemoglobin concentration and the maximal aerobic power, thus inducing an improvement of exercise performance [1–3]. There is evidence that rhEPO is misused by elite athletes to enhance sport performance [4].

The International Olympic Committee (IOC), the World Anti-Doping Agency (WADA) as well as major sports authorities have banned the use of EPO by athletes [5]. Different methods to detect rhEPO misuse have been described including direct measurement in urine [6,7], and indirect measurements based on blood markers of altered erythropoiesis [8–11].

The direct identification method is based on the analysis by isoelectric focusing, double blotting and chemiluminescent detection of the erythropoietin (EPO) present in urine. Both exogenous rhEPO and endogenous EPO, although having identical amino acid sequences, have a different glycosylation pattern giving different isoelectric profile [6,7]. However, the application of that method is limited by the time and workload required to conduct the assay. The major drawback of the urine-based tests is the disappearance of measurable levels of rhEPO from the urine soon after administration [12], despite the athlete can retain the physiologic benefits associated with an elevated red cell mass for a longer time [13,14]. EPO concentrations in urine return to base line values 4 days after the last subcutaneous rhEPO administration [13]; moreover, after 7 days from the last subcutaneous rhEPO administration, isoelectric focusing method only detects rhEPO in approximately one-half of the administered subjects [14].

Regarding indirect biomarkers, mathematical models have been developed to indicate current (ON models) or recently discontinued (OFF models) rhEPO administration [8–11]. Those models have been refined in order to reduce the number of markers monitored while keeping their discriminating power and, very importantly, selecting those more robust and having well characterised international standards. At present, the proposed models are based on combinations of the following markers: percent reticulocytes and haemoglobin, serum soluble transferrin receptor (sTfR) and total serum EPO (endogenous plus recombinant EPO) concentrations.

Regardless the model chosen, precise and accurate measurement of sTfR and EPO are needed. Measurements have to be made using techniques

giving consistent results in both inter-laboratory and inter-techniques. Since serum EPO and sTfR are usually measured using immunoassays and many of them are available, studies are necessary in order to characterise their behaviour among them and between laboratories [15].

Different immunoassays exist for measuring EPO [16–20]. In this paper, we report an extended evaluation of the two immunoassays for EPO measurement that were used to develop the mathematical models to detect rhEPO misuse [8,9,11], together with an study on the stability of EPO subjected to freezing/thawing cycles and simulated storage/transportation conditions.

2. Materials and methods

2.1. Immunological techniques

Two immunoassays, a chemiluminescent immunoassay and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), were evaluated for EPO measurement.

The chemiluminescent immunoassay was the Immulite EPO from Diagnostic Products Corporation (DPC, Los Angeles, CA, USA) (referred as CHEM). The procedure was applied using the automated analyser Immulite[®] chemiluminescent immunoassay system (DPC). A volume of 250 μ l of serum was required. The Immulite system uses stored master curves generated by DPC for each internal batch of reagents. Each new batch has to be calibrated before its use using two adjustor points (low and high) supplied by the manufacturer. The adjustor points were analysed in quadruplicate. Quality control (QC) samples supplied by the manufacturer were also used (see Table 1).

The ELISA assay was the Quantikine Human EPO Immunoassay from R&D Systems (Minneapolis, USA) (referred as ELISA). A volume of 100 μ l serum sample was analysed according to the instructions of the manufacturer. The absorbance at 450 nm was measured, taken 565 or 570 nm as reference wavelength using a microplate reader (Multiskan MS, Labsystems, Vantaa, Finland, in laboratory 1; and Novopath TM, Biorad, Milan, Italy, in laboratory 2). Calibration samples, supplied by the manufacturer were analysed always in duplicate at the following concentrations: 0, 2.5, 5, 20, 50, 100 and 200 mIU/ml. The QC samples

Table 1
Validation parameters of CHEM assay obtained in laboratories 1 and 2

QC	mIU/ml ^a	Assay	Intra-assay					Inter-assay				
			<i>n</i>	Mean (mIU/ml)	S.D. (mIU/ml)	Precision ^b R.S.D. (%)	Accuracy ^c error (%)	<i>n</i>	Mean (mIU/ml)	S.D. (mIU/ml)	Precision ^b R.S.D. (%)	Accuracy ^c error (%)
Laboratory 1												
1	13–17.2	1	5	14.1	0.7	5.3	Correct	14	14.2	0.5	3.6	correct
		2	5	14.5	0.4	2.8	Correct					
		3	4	14.1	0.2	1.6	Correct					
2	25.2–32.8	1	5	27.3	0.2	0.7	Correct	15	26.8	0.8	3.1	correct
		2	5	27.0	0.5	1.8	Correct					
		3	5	26.2	1.1	4.4	Correct					
3	48.5–66.5	1	5	53.4	1.6	3.1	Correct	15	51.8	2.5	4.7	correct
		2	5	51.0	2.6	5.1	Correct					
		3	5	51.1	2.7	5.2	Correct					
Laboratory 2												
1	11.7–16.5	1	4	14.2	0.4	2.5	Correct	13	13.8	0.6	4.3	correct
		2	4	14.2	0.3	2.2	Correct					
		3	5	13.1	0.2	1.8	Correct					
2	23.3–31.5	1	4	26.9	1.0	3.7	Correct	12	26.1	1.1	4.1	correct
		2	3	26.7	0.2	0.6	Correct					
		3	5	25.1	0.4	1.8	Correct					
3	45.4–61.4	1	4	51.2	1.4	2.7	Correct	13	51.2	2.0	3.9	correct
		2	4	53.2	0.6	1.1	Correct					
		3	5	49.5	1.6	3.3	Correct					

LOD: 0.2 mIU/ml; LOQ: 0.5 mIU/ml; measure range up to 200 mIU/ml.

^a Acceptance concentration range according to the manufacturers.

^b Measured as relative standard deviation (R.S.D.).

^c Correct: inside the acceptance range defined by the manufacturer.

were prepared by dilution of the EPO 200 mIU/ml calibration sample with the specimen diluent (both supplied by the manufacturer) to a final concentration of 4 mIU/ml (QC 4), and 10 mIU/ml (QC 5).

2.2. Serum samples

A group of 112 healthy subjects (91 males and 21 females) aged between 18 and 55 years (mean \pm standard deviation, 30 ± 9 years) took part in the study. The subjects were untrained individuals and not competing athletes. An informed consent was signed by all the subjects. No illness or medications known to impair exercise or to alter endocrine function were declared by any of those individuals. The study was approved by the local ethics committee (CEIC/IMAS no. 2000/1145/I). Confidentiality aspects of samples and results were guaranteed.

Venous blood samples were collected from each volunteer from the antecubital vein and, after an interval for clotting, they were centrifuged. Serum samples were stored at -80°C until analysis.

2.3. Validation assays

Validation assays were performed in two independent laboratories: Pharmacology Research Unit, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Barcelona, Spain (laboratory 1), and Drug Research and Control Department, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy (laboratory 2). The following studies were performed.

2.3.1. Intra-laboratory validation

Intra-laboratory validation for CHEM and ELISA techniques was performed in both laboratories during four consecutive days.

For the ELISA assay, the parameters for the best fit between signal and concentration were calculated according to the mathematical model proposed by the manufacturer (absorbance versus logarithm of EPO concentration). As a measure of the goodness of fit, the error (%) in the back-calculated concentration of the calibration samples was monitored.

Up to five replicates of two or three QC samples were analysed for the determination of intra-assay precision and accuracy, while the inter-assay precision and accuracy were determined for all values obtained along three independent experimental assays of the aforementioned QC samples. Precision was expressed as the relative standard deviation (R.S.D.%) of the measurements performed. For ELISA assay, accuracy was expressed as the relative error (%) of the value obtained with respect to the assigned value for the QC samples 4 and 5. For CHEM assay, accuracy was evaluated as “correct” or “incorrect” if the concentration obtained was inside or outside the acceptance concentration range defined by the manufacturer for QC samples 1–3.

To calculate the limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ), the blank calibration sample (absence of analyte) was analysed five times in the same run. The standard deviation of the values obtained was taken as the measure of the noise. LOD and LOQ were defined as the mean value obtained for the blank sample plus three and ten times the estimated value of the noise, respectively.

2.3.2. Inter-laboratory and inter-technique validation

Inter-laboratory validation was performed by analysing human serum samples from non-athletic as well as athletic population (none having used rhEPO) in two different laboratories. Inter-technique validation was performed in laboratory 1, by analysing human serum samples using both assays.

The intra-class correlation coefficient (ICC) using random effects mode was calculated to evaluate the concordance of results between laboratories [21]. Inter-technique concordance was evaluated using the Passing–Bablok method [22].

To evaluate the dispersion of the results obtained between different laboratories or between different techniques, a modification of Bland–Altman plots was used [23]. The mean values of concentrations were represented versus the relative dif-

ferences between concentrations. The 95% limits of agreement (95% LA) was calculated according to the following expression: relative difference mean \pm 1.96 \times standard deviation of relative differences.

2.3.3. Stability studies

Stability studies were performed using the QC samples prepared from the reagents supplied by the ELISA assay manufacturer (QC samples 4 and 5, Table 2).

2.3.3.1. Freeze/thaw (F/T) cycles. The stability in freeze/thaw cycles of QC samples was assessed by comparing the results of the QC samples analysed immediately after their preparation (F/T0) with those obtained after storage at -80°C for 30 min, thawed at room temperature and analysed (F/T1) or repeating the same cycle two times (F/T2).

2.3.3.2. Storage/transportation conditions. Stability in storage/transportation conditions was evaluated in QC samples following a simulated transportation conditions protocol consisting of storing QC samples at -80°C for 48 h (simulated storage), at -20°C for 48 h (simulated transportation), at -80°C for at least 48 h (simulated storage at destination), and thawed at room temperature for analysis. Results obtained were compared with those obtained for the sample analysed right after preparation.

Stability was evaluated by monitoring the percentage of the degradation of the analyte in each storage condition.

All statistical calculations were done using the statistical package SPSS 2001 for Windows, version 11.5.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

Validation parameters for the CHEM assay are shown in Table 1. Intra- and inter-assay precision, measured as the R.S.D., was always lower than 6%. The concentrations of the QC samples analysed were in all cases inside the acceptance range described by the manufacturer. The LOD and LOQ values estimated for CHEM assay in laboratory 1 were 0.2 and 0.5 mIU/ml, respectively.

Table 2
Validation parameters of ELISA assay obtained in laboratories 1 and 2

QC	mIU/ml	Assay	Intra-assay					Inter-assay				
			<i>n</i>	Mean (mIU/ml)	S.D. (mIU/ml)	Precision ^a R.S.D. (%)	Accuracy ^b error (%)	<i>n</i>	Mean (mIU/ml)	S.D. (mIU/ml)	Precision ^a R.S.D. (%)	Accuracy ^b error (%)
Laboratory 1												
4	4	1	5	3.6	0.2	6.5	10.9	15	3.5	0.2	4.7	11.8
		2	5	3.5	0.1	3.9	11.8					
		3	5	3.5	0.1	4.1	12.8					
5	10	1	5	9.3	0.2	2.3	7.0	15	9.3	0.3	3.4	7.3
		2	5	9.4	0.5	5.1	6.2					
		3	5	9.2	0.2	2.3	8.5					
Laboratory 2												
4	4	1	5	3.9	0.3	8.4	5.6	15	4.0	0.7	18.0	11.7
		2	5	4.0	1.3	30.9	22.5					
		3	5	4.1	0.4	9.2	6.9					
5	10	1	5	10.1	0.8	8.0	5.8	15	10.0	0.9	8.7	6.7
		2	5	9.6	1.0	10.7	8.6					
		3	5	10.3	0.8	7.5	5.7					

LOD: 0.6 mIU/ml; LOQ: 2.0 mIU/ml; measure range 2.5–200 mIU/ml.

^a Measured as relative standard deviation (R.S.D.).

^b Measured as the relative error respect the assigned QC sample value.

Intra-laboratory validation for ELISA assay is described in Table 2. The intra- and inter-assay precision for laboratory 1 were lower than 7% for both QC samples. The intra- and inter-assay accuracy was better for the QC 5 (QC with the highest concentration) but in all cases lower than 13%. For laboratory 2, the precision and accuracy results were in almost all cases of the same order than in laboratory 1. The LOD and the LOQ calculated in laboratory 1 were 0.6 and 2 mIU/ml, respectively, higher than those obtained by the CHEM assay.

Inter-laboratory results for CHEM and ELISA assays are presented in Figs. 1 and 2. High concordances were obtained for both assays (ICC = 0.980 and 0.920, respectively). The dispersion of results obtained with CHEM measured as the 95% LA was from –16.87 to 14.44% (Fig. 1). Higher dispersion was obtained for ELISA assay, from –37.42 to 15.97% (Fig. 2).

The inter-technique comparison results are shown in Fig. 3. The results obtained with the ELISA test were always lower than those obtained with the CHEM assay. Passing–Bablok method showed that CHEM and ELISA assays were not comparable (95% confidence intervals did not include the value 0 for

intercept, nor value 1 for the slope). The differences in results obtained between techniques expressed as 95% LA were from –51.22 to –5.13%. However, the relation between results follows the equation: [ELISA] = 0.76 [CHEM] + 0.06, with a good correlation ($r^2 = 0.92$).

In reference to freeze/thaw stability studied for QC samples 4 and 5 (Fig. 4), no relevant degradation was observed after one and two freeze/thaw cycles, with differences to initial concentration (F/T0) lower than 5% for both QC samples. Regarding the stability in simulated transportation conditions, differences to initial concentration lower than 5% were also obtained.

4. Discussion

The measurement of serum EPO concentration has been proposed as one of the serum biomarkers of rhEPO misuse in sport [8,9,11]. Moreover, EPO measurement has important clinical applications in differential diagnosis of anemia and polycythemia, and monitoring rhEPO administration in EPO deficient patients [18].

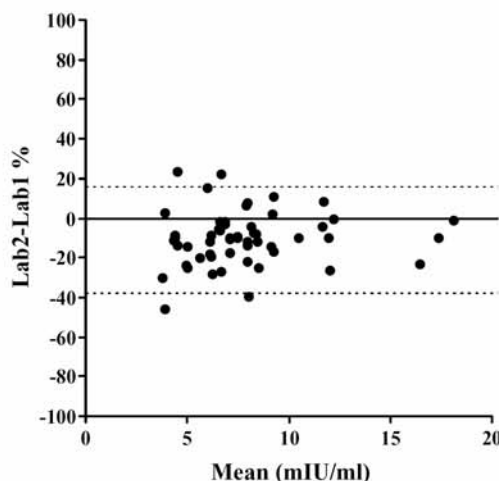
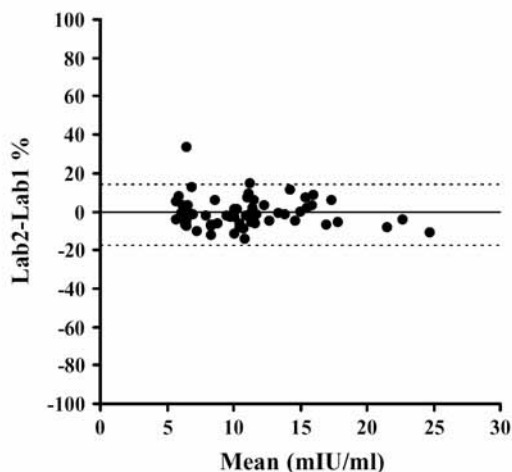
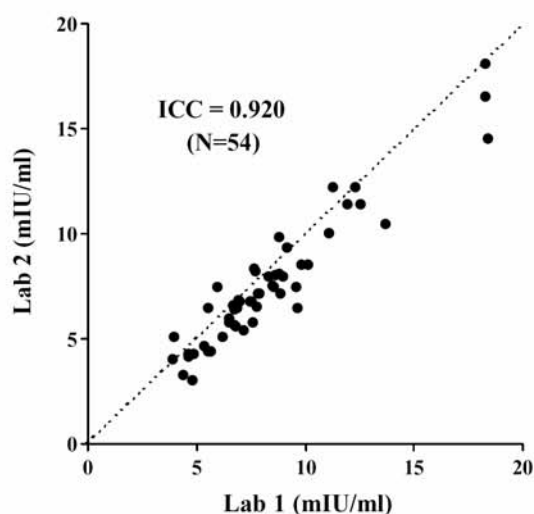
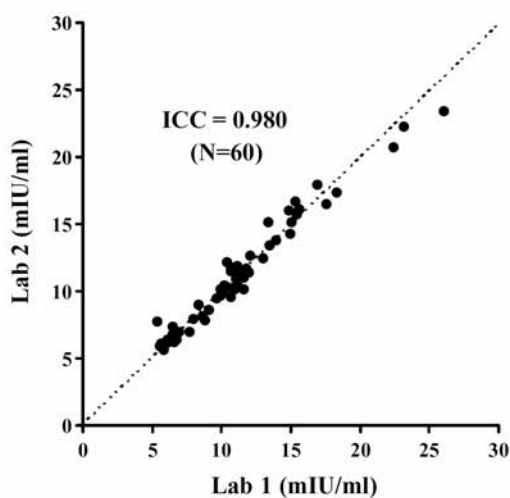


Fig. 1. Inter-laboratory comparison of EPO CHEM assay. Top: graphical comparison between laboratories and intra-class correlation coefficient (ICC), dotted lines representing total concordance. Bottom: modified Bland–Altman plots (see text), dotted lines representing the 95% limits of agreement.

Fig. 2. Inter-laboratory comparison of EPO ELISA assay. Top: graphical comparison between laboratories and intra-class correlation coefficient (ICC), dotted lines representing total concordance. Bottom: modified Bland–Altman plots (see text), dotted lines representing the 95% limits of agreement.

Usually, concentration of EPO in serum samples is measured by using immunological techniques [16–19]. The measurement methods need intra-laboratory validation to assure satisfactory intra- and inter-assay precision and accuracy allowing clinically and analytically acceptable results. In addition, in immunological methods, the difference in specificity of the used antibodies may lead to different results when using different assays [16–19]. Thus, reference ranges for EPO concentration can vary depending

on the technique used. Therefore, immunoassays require also an inter-technique validation to evaluate the concordance in the concentrations obtained using different methods. Besides, in anti-doping control analyses an homogeneous application of criteria to suspect rhEPO abuse among the different anti-doping centres is needed to assume a fair outcome for different athletes. Even sometimes, samples of the same athlete can be analysed in different laboratories,

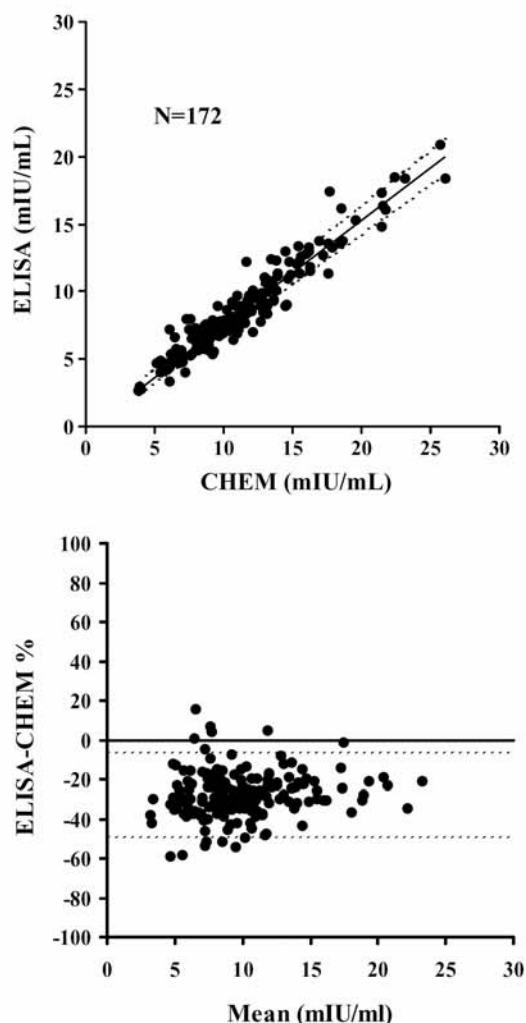


Fig. 3. Inter-technique comparison of EPO assays: CHEM and ELISA. Top: Passing–Bablok plots, dotted lines representing the 95% limits of confidence. Bottom: modified Bland–Altman plots (see text), dotted lines representing the 95% limits of agreement.

emphasising the need to guarantee the transferability and concordance of results between laboratories. For this reason, inter-laboratory comparisons are also needed.

In this study, two different analytical techniques have been evaluated for EPO measurement and the degree of concordance of the results obtained was also investigated. Both immunoassays were those used in previous studies of biomarkers of rhEPO misuse [8,9,11]. The main difference between the two

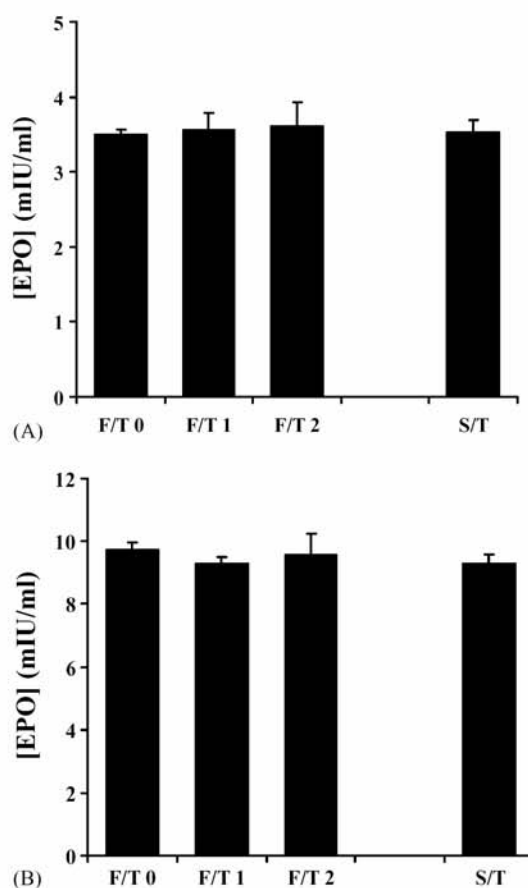


Fig. 4. Results of EPO concentrations after freeze/thaw (F/T) stability study and in simulated storage/transportation (S/T) conditions (see text): (A) QC 4 and (B) QC 5.

techniques was that the CHEM assay is performed using Immulite automated analyser, which allows a reduction of the handling error as has been shown in Table 1. The two EPO assays, CHEM and ELISA, had a turnaround time for results of 1.5 and 4 h, respectively. Accordingly, in the CHEM, a shorter and easier protocol is proposed, while in ELISA more manipulations are needed.

Concentrations of QC samples of ELISA test were lower than those of CHEM test (Tables 1 and 2). The results of precision and accuracy for CHEM and ELISA tests were similar when comparing QC samples of the same level of concentration (see results of QC 1 in Table 1, and results of QC 5 in Table 2). However, the results of ELISA test were also acceptable

even for the lowest QC sample at 4 mIU/ml, located in the low limit of the serum EPO concentrations range found for the studied population (from 4 to 26 mIU/ml). The range of EPO serum concentrations studied is normal or moderately high. Higher and lower levels can be found for different pathologies or doped subjects during and after rhEPO administration [8].

The precision and accuracy obtained in the present study were similar or better than those obtained in previous studies using the same [8,9,19] or other commercially available kits for EPO measurement [16,18]. Besides, estimated LOD and LOQ for CHEM and ELISA tests were lower than most of the previously reported methods [16–18].

The results of the stability tests with EPO QC samples, prepared in a protein stabilised buffer, showed that samples were stable after two freeze/thaw cycles (-80°C to room temperature) and also in simulated storage/transportation conditions.

Regarding inter-laboratory comparison, higher degree of concordance was obtained for the CHEM assay (Fig. 1), although results obtained with the ELISA technique appeared also acceptable (Fig. 2). The use of autoanalyser in CHEM assay would have an important role in the low differences in results obtained between both laboratories. On the other hand, the high degree of concordance in results between laboratories observed in inter-laboratory comparison showed that EPO is also stable in actual serum samples after real storage/transportation conditions. Serum samples analysed in laboratory 2 were sent from laboratory 1 using a regular courier system, i.e. packed in dry ice and arriving at destination in approximately 48 h.

Taking into account the Passing–Bablok regression method, the results obtained by both techniques are not comparable, being ELISA results lower than those obtained by the CHEM assay (Fig. 3). However, the correlation obtained between ELISA and CHEM was good and equivalent to that reported in previous studies [9]. In spite of using different calibrators (CHEM assay uses the WHO standard 67/343, natural human EPO; and ELISA assay uses the WHO standard 87/684, recombinant human EPO), the WHO standard 87/684 showed essentially identical reactivity to WHO standard 67/343 when assayed in ELISA assay (manufacturer's information). Therefore, the differences in results may not be due to the calibrators

and may be explained, at least in part, by different specificity of the antibodies used.

Both studied assays (ELISA and CHEM) have been used to develop the mathematical models to detect rhEPO misuse [8,9,11], as mentioned in previous paragraphs. The CHEM assay was proposed for the initial screen and for quantitative data as it uses automated analysers that permitted a high throughput, and the ELISA tests, used in the initial studies for screening purposes, was finally considered the best choice for confirmation purposes [9]. Taking into account that EPO concentrations obtained with ELISA technique were around 25% lower than with CHEM assay, different results may be obtained depending on the assay used for screening and confirmation. In the mathematical models proposed, EPO contributes as the natural logarithm of the serum concentration [11]. A reduction of 25% in concentration may lead to a difference in the final score value of around 2 units less (ON model) or more (OFF model), which may have impact on the final evaluation of a sample with a score close to a threshold value for a given probability.

Taking into account the study performed, the CHEM technique obtained better intra- and inter-assay precision and accuracy, lower LOD and LOQ, and good inter-laboratory concordance with a low dispersion. However, this technique uses an analyser available in clinical laboratories and not usual in anti-doping control laboratories. On the other hand, ELISA test uses universally available equipment and, thus, it can be easily implemented both in clinical and anti-doping control laboratories, although it can be subjected to a higher variability due to the different technical skills of the analysts, and also subjected to inter-laboratory variation. The final choice should be dependent on the availability of equipment and the type of analysis to be performed (clinical, anti-doping control, ...). For clinical applications, where samples are analysed in one single laboratory with reference ranges obtained with the same immunological test, both assays may be suitable. However, in anti-doping control analysis, where comparability of results between laboratories is a key feature, in spite of potential use of any of both techniques for screening, it seems advisable to use the CHEM assay to release final results which can be used in inter-laboratory comparable criteria to suspect rhEPO abuse.

Acknowledgements

This study has been founded by: Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Sanidad y Consumo de España (Research project no. 01/1328) and by Progetto dell'Istituto Superiore di Sanità n.1039/RI "Tossicodipendenze e Doping".

References

- [1] B. Berglund, B. Ekblom, *J. Intern. Med.* 229 (1991) 125–130.
- [2] B. Ekblom, in: S. Karch (Ed.), *Drug Abuse Handbook*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1998, pp. 710–720.
- [3] M. Audran, R. Gareau, S. Matecki, F. Durand, C. Chenard, M.-T. Sicart, B. Marion, F. Bressolle, *Med. Sci. Sports Exerc.* 31 (1999) 639–645.
- [4] K. Birchard, *Lancet* 352 (1998) 42.
- [5] World Anti-Doping Agency, *World Anti-Doping Code* (revision 20 February 2003).
- [6] F. Lasne, J. de Ceaurriz, *Nature* 405 (2000) 635.
- [7] F. Lasne, L. Martin, N. Crepin, J. de Ceaurriz, *Anal. Biochem.* 311 (2002) 119–126.
- [8] R. Parisotto, C. Gore, K. Emslie, M. Ashenden, C. Brugnara, C. Howe, D. Martin, G. Trout, A. Hahn, *Haematologica* 85 (2000) 564–572.
- [9] R. Parisotto, M. Wu, M. Ashenden, K. Emslie, C. Gore, C. Howe, R. Kazlauskas, K. Sharpe, G. Trout, M. Xie, A. Hahn, *Haematologica* 86 (2001) 128–137.
- [10] K. Sharpe, W. Hopkins, K. Emslie, C. Howe, G. Trout, R. Kazlauskas, M. Ashenden, C. Gore, R. Parisotto, A. Hahn, *Haematologica* 87 (2002) 1248–1257.
- [11] C. Gore, R. Parisotto, M. Ashenden, J. Stray-Gundersen, K. Sharpe, W. Hopkins, K. Emslie, C. Howe, G. Trout, R. Kazlauskas, A. Hahn, *Haematologica* 88 (2003) 333–344.
- [12] L. Wide, C. Bengtsson, B. Berglund, B. Ekblom, *Med. Sci. Sports Exerc.* 27 (1995) 1569–1576.
- [13] A. Souillard, M. Audran, F. Bressolle, R. Gareau, A. Duvallet, J.-L. Chanal, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 42 (1996) 355–364.
- [14] A. Breidbach, D.H. Catlin, G.A. Green, I. Tregub, H. Truong, J. Gorzek, *Clin. Chem.* 49 (2003) 901–907.
- [15] R. Abellan, R. Ventura, S. Pichini, J.A. Pascual, R. Pacifici, S. Di Carlo, A. Bacosi, J. Segura, P. Zuccaro, *Clin. Chem. Lab. Med.*, submitted for publication.
- [16] D. Ma, A.-Q. Wei, L. Downton, K. Lau, Z.-H. Wu, M. Ueda, *Br. J. Haematol.* 80 (1992) 431–436.
- [17] G. Lindstedt, P.-A. Lundberg, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 58 (1998) 441–458.
- [18] J. Marsden, R. Sherwood, T. Peters, *Ann. Clin. Biochem.* 36 (1999) 380–387.
- [19] E. Benson, R. Hardy, C. Chaffin, C. Robinson, R. Konrad, *J. Clin. Lab. Anal.* 14 (2000) 271–273.
- [20] C. Breyman C, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 14 (2000) 135–145.
- [21] J.L. Fleiss, *The Design and Analysis of Clinical Experiments*, Wiley, New York, 1986.
- [22] H. Passing, W. Bablok, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 21 (1983) 709–720.
- [23] D. Altman, J. Bland, *Statistician* 32 (1983) 307–317.



Research paper

Evaluation of immunoassays for the measurement of soluble transferrin receptor as an indirect biomarker of recombinant human erythropoietin misuse in sport

R. Abellan^{a,b}, R. Ventura^{a,b}, S. Pichini^c, M.P. Sarda^d, A.F. Remacha^d, J.A. Pascual^{a,b},
 I. Palmi^c, A. Bacosi^c, R. Pacifici^c, P. Zuccaro^c, J. Segura^{a,b,*}

^aUnitat de Recerca en Farmacologia, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, IMIM, C/Doctor Aiguader, 80, 08003 Barcelona, Spain

^bDepartament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, UPF, Barcelona, Spain

^cDrug Research and Control Department, Istituto Superiore di Sanità, ISS, Roma, Italy

^dHaematology Department, Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain

Received 5 May 2004; received in revised form 9 September 2004; accepted 16 September 2004

Available online 30 October 2004

Abstract

Soluble transferrin receptor (sTfR) has been proposed as an indirect biomarker of the misuse of recombinant human erythropoietin in sport. An extended validation of four commercially available immunoassays for its measurement in serum is presented. Two ELISA techniques (ELISA1: Orion Diagnostica; ELISA2: R&D Systems), an immunoturbidimetric technique (Turbid: Roche Diagnostics), and a nephelometric technique (Nephel: Dade Behring) were investigated.

Intra-laboratory precision better than 3% and correct accuracies were obtained for the Turbid and Nephel techniques using autoanalysers. Slightly worse precision (but always better than 11%) and correct accuracies were also obtained in almost all cases for the two ELISA techniques. Inter-laboratory results showed higher concordances for the ELISA procedures (intra-class correlation coefficients of 0.848 for ELISA1 and 0.973 for ELISA2 which was clearly better).

Inter-technique correlations were good for the four techniques with lower dispersions found for the techniques using autoanalysers, i.e. Turbid and Nephel. While Turbid and ELISA1 results (expressed in mg/l) were comparable, results obtained with Nephel were approximately 2.7 times lower. The relationship between those three techniques was maintained when compared with ELISA2, which uses different units (nmol/l).

We conclude that ELISA2 and Nephel in our hands were the most suitable techniques in terms of sensitivity, precision and accuracy, and adequacy of the calibration curve for the measurement of sTfR in real serum samples. Discrepancies observed in

Abbreviations: TfR, transferrin receptor; sTfR, soluble transferrin receptor; EPO, erythropoietin; rhEPO, recombinant human erythropoietin; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; QC sample, quality control sample; RSD%, percent relative standard deviation; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; ICC, intraclass correlation coefficient; 95%LA, 95% limits of agreement; CI, confidence interval.

* Corresponding author. Unitat de Recerca en Farmacologia, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, IMIM, C/Doctor Aiguader, 80, 08003 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 2211009; fax: +34 93 2213237.

E-mail address: jsegura@imim.es (J. Segura).

0022-1759/\$ - see front matter © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.jim.2004.09.014

the results obtained with the different sTfR techniques showed that different reference standards were used and harmonization is recommended in order to obtain comparable results.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: sTfR; rhEPO biomarker; Validation; Immunoassays; Doping

1. Introduction

The soluble transferrin receptor (sTfR) is the truncated form of the transmembrane receptor which mediates the cellular uptake of iron on virtually all mammalian cells (Feelders et al., 1999). Its concentration in serum is affected by the cellular iron demands and the erythroid proliferation rate. The measurement of sTfR is a powerful tool for the diagnosis of iron deficiency in a variety of clinical situations and in monitoring the erythropoiesis (Feelders et al., 1999; Remacha et al., 1998).

The serum concentration of sTfR has been proposed as an indirect biomarker of recombinant human erythropoietin (rhEPO) misuse in sport (Gareau et al., 1996; Parisotto et al., 2000). The more recent mathematical models for indirect detection use combinations of haemoglobin, percent reticulocytes, total serum concentration of EPO (endogenous plus recombinant), and the concentration of serum sTfR (Gore et al., 2003).

Measurement of sTfR in serum samples is usually performed using immunoassays that have been designed for clinical purposes. In the clinical field, the result obtained is compared to a range defined for a normal population using that particular immunoassay and, in some cases, within the same laboratory. Thus, accuracy and inter-laboratory variation have low importance. Moreover, as in the case of many other measured clinical parameters, the majority of immunoassays for serum sTfR are designed to be used in autoanalysers (high-throughput instruments).

Conversely, in doping control, the concentration of direct and indirect biomarkers of prohibited substances are usually compared to an established cut-off, or to reference ranges which are internationally accepted. Concentration values obtained by different laboratories around the world are compared one to another; therefore, accuracy and reproducibility of the result are of great importance. Indeed, inter-laboratory variation and stability of an analyte in a biological

matrix may affect the final results. In addition, autoanalysers are not commonly available in anti-doping control laboratories.

In this context, extended validation studies are always necessary, and essential in the case of new direct and indirect biomarkers for prohibited substances, to confirm that concentration values found in different laboratories are independent of the technique applied. (Abellan et al., 2004).

Comparability of concentration results obtained by different immunoassays generally depends on the features of the immunoassay used such as the antibody (specificity, cross-reactivities, etc.), the origin and the purity of the standard used for the preparation of the calibration curve, the measurement units and type of laboratory instrument (automatic vs. manual). Immunoassays for the measurement of serum sTfR concentrations described in previous studies (Hikawa et al., 1996; Kuiper-Kramer et al., 1996; Akesson et al., 1999; Cotton et al., 2000) use different units and, among those using the same units, different serum sTfR reference ranges are described. The main reasons for the discordances observed are the absence of an international standard of sTfR and the lack of a clear definition of the chemical entity (and molecular weight) which is monitored by each of those techniques.

Here, we report an extended evaluation of four of the most extensively used immunoassays for the measurement of serum sTfR concentrations. Two of the immunoassays validated, an ELISA and a nephelometric assay, had been applied to develop the mathematical models for detection of rhEPO misuse (Parisotto et al., 2000, 2001). The other two assays, another ELISA and an immunoturbidimetric assay, were chosen from among the most used and commercially available. The evaluation includes intra-laboratory, inter-laboratory and inter-technique validation together with a study of the stability of sTfR in real serum samples after freeze/thaw cycles and differing storage/transportation conditions.

2. Materials and methods

2.1. Immunological techniques

Four different techniques were evaluated for sTfR measurement: IDeA sTfR IEMA immunoassay from Orion Diagnostica (Espoo, Finland) (herein referred to as ELISA1); Quantikine Human sTfR Immunoassay from R&D Systems (Minneapolis, USA) (herein referred to as ELISA2); Tina-quant sTfR immunoturbidimetric technique from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) (herein referred to as Turbid); and N Latex sTfR nephelometric technique (Dade Behring, Marburg, Germany) (herein referred to as Nephel).

ELISA1 was a quantitative sandwich enzyme immunoassay technique based on the formation of a complex between the well-coated anti-sTfR monoclonal antibodies, the sTfR protein in the sample, and the enzyme-conjugated anti-sTfR monoclonal antibodies. Substrate solution was metabolised by the enzyme (horseradish peroxidase) and colour was developed. The absorbance at 405 nm was measured using a microplate reader (Elx 808 Ultra Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA, in Laboratory 1; Novapath TM, Biorad, Milan, Italy, in Laboratory 2). A volume of 20 μ l serum sample was used without sample pretreatment. Calibration samples were always analysed in duplicate at the following concentrations (expressed in manufacturer's units): 0, 0.4, 1.5, 2.8, 5.4 and 9 mg/l. The QC samples were supplied by the manufacturer (QC 1, acceptance range 1.16–2.07 mg/l; and QC 2, acceptance range 3.27–4.25 mg/l).

ELISA2 was a quantitative sandwich enzyme immunoassay technique based on the formation of a complex between the well-coated anti-sTfR monoclonal antibodies, the sTfR protein in the sample, and the enzyme-conjugated anti-sTfR monoclonal antibodies. Substrate solution was metabolised by the enzyme (alkaline phosphatase) and colour was developed. The absorbance at 450 nm with a correction wavelength set at 565 or 570 nm was measured using a microplate reader, as indicated by the kit manufacturer (Multiskan MS, Labsystems, Vantaa, Finland, in Laboratory 1. Novapath TM, Biorad in Laboratory 2). A volume of 20 μ l serum sample was analysed without sample pretreatment. Calibration samples were analysed always in

duplicate at the following concentrations (expressed in manufacturer's units): 0, 3, 7, 20, 40 and 80 nmol/l. The QC samples were supplied by the manufacturer (QC 3, acceptance range 5.3–7.5 nmol/l; QC 4, acceptance range 13.6–20.5 nmol/l; and QC 5, acceptance range 35.5–52.5 nmol/l).

Turbid is an immunoturbidimetric assay technique based on the formation of a complex between the latex-linked anti-sTfR monoclonal antibodies, and the sTfR protein in the sample. Sample pretreatment was not needed. The immunoturbidimetric procedure was applied to 300 μ l of serum sample following the instructions described by the manufacturer using the Roche/Hitachi 911 System autoanalyser (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Calibration samples were analysed in duplicate at the following concentrations (expressed in manufacturer's units): 0, 1.7, 3.8, 9.5, 30.2 and 39.6 mg/l. Quality control (QC) samples supplied by the manufacturer were used (QC 6, acceptance range 1.9–2.5 mg/l; and QC 7, acceptance range 6.0–8.2 mg/l).

Nephel is an immunonephelometric assay technique based on the formation of a complex between the polystyrene-linked anti-sTfR monoclonal antibodies, and the sTfR protein in the sample. Serum samples were automatically diluted 1:20 with a supplied N-Diluent. A volume of 300 μ l of serum sample was analysed in a BNTH System autoanalyser (Dade Behring) following the instructions described by the manufacturer. Calibration samples were automatically prepared by the autoanalyser from the N-Protein Standard at the following final concentrations (expressed in manufacturer's units): 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.3 and 4.7 mg/l. The QC samples were supplied by the manufacturer (QC 8, acceptance range 0.64–0.86 mg/l; and QC 9, acceptance range 1.38–1.86 mg/l).

2.2. Serum samples

A group of 92 subjects (32 males and 60 females), aged between 10 and 92 years (mean \pm standard deviation, 61 \pm 20 years), took part in the study. Those subjects were chosen from the normal population to represent different age ranges and from patients of the Hospital de Sant Pau with haematological pathologies in order to have sTfR values throughout the calibration ranges, and not to infer any inter-individual differences between them.

The study was approved by the Local Ethics Committee. Confidentiality aspects of samples and results were guaranteed.

Venous blood samples were obtained from the antecubital vein and, after an interval for coagulation, they were centrifuged. Serum samples were stored at -80°C until analysis.

2.3. Validation assays

Validation assays for the ELISA1 and ELISA2 techniques were performed in two independent laboratories: Unitat de Recerca en Farmacologia, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, IMIM, Barcelona, Spain (Laboratory 1); and Drug Abuse and Doping Unit, Drug Research and Control Department, Istituto Superiore di Sanità, ISS, Rome, Italy (Laboratory 2). For Turbid and Nephel tests, validation assays were performed only in a third independent Hospital laboratory: Haematology Department, Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain (Laboratory 3). The following studies were performed.

2.3.1. Intra-laboratory validation

Intra-laboratory validation was performed following a 4-day validation protocol.

For each ELISA technique, the parameters for the best fit between signal and concentration were calculated according to the mathematical model proposed by the manufacturer. For Nephel and Turbid assays, the mathematical model was calculated automatically by the autoanalyser.

Five replicates of two QC samples were analysed for the determination of intra-assay precision and accuracy, while the inter-assay precision and accuracy were determined for all values obtained with the first three independent experimental assays of the aforementioned QC samples. Precision was expressed as the percent relative standard deviation (RSD%) of the measurements performed. Accuracy was evaluated as “correct” or “incorrect” if the concentration obtained was inside or outside the acceptance concentration range defined by the manufacturer. To calculate the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), the blank calibration sample (absence of analyte) was analysed five times in the same run. The standard deviation of the values obtained was taken as the measure of the

noise. LOD and LOQ were defined as the mean value obtained for the blank sample plus 3 and 10 times (respectively) the estimated value of the noise.

2.3.2. Inter-laboratory and inter-technique validation

Inter-laboratory validation for ELISA1 and ELISA2 was performed by analysing the same set of human serum samples in two different laboratories (Laboratories 1 and 2). Inter-technique validation was performed by analysing the same set of human serum samples by two different techniques.

The intraclass correlation coefficient (ICC) using random effects mode was calculated to evaluate the concordance of results between laboratories (Fleiss, 1999). Inter-technique concordance was evaluated using the Passing–Bablok method (Passing and Bablok, 1983).

To evaluate the dispersion of the results obtained between different laboratories or between different techniques, a modification of Bland–Altman plots was used (Altman and Bland, 1983). The mean values of concentrations were represented in front of the relative differences between concentrations. The 95% limits of agreement (95% LA) was calculated according to the following expression: relative difference mean \pm $1.96 \times$ standard deviation of relative differences.

2.3.3. Stability studies

Stability studies of sTfR in human serum samples were performed using the Nephel technique.

2.3.3.1. Freeze/thaw (F/T) cycles. The stability of sTfR in human serum samples submitted to freeze/thaw cycles was assessed by comparing the results of three human serum samples analysed after storage at -80°C (F/T 1), with those obtained after two (F/T 2), and three (F/T 3) freeze/thaw cycles of freezing at -80°C for 30 min and thawing at room temperature for 30 min.

2.3.3.2. Storage/transportation conditions. Stability in storage/transportation conditions was evaluated in human serum samples following two different protocols. Condition A (S/T A): simulated transportation conditions, i.e. human serum samples were stored frozen at -80°C for 48 h, at -20°C for 48 h, at -80°C for at least 48 h, and thawed at room temperature for analysis. Condition B (S/T B): simulated wrong trans-

portation conditions, i.e. samples were stored frozen at -80°C , and thawed at room temperature for at least 48 h before being analysed. For both conditions, the results obtained were compared with those obtained for the sample analysed after storage at -80°C .

Stability was evaluated by monitoring the percentage of the degradation of the analyte using each storage condition.

All statistical calculations were done using the statistical package SPSS 2001 for Windows, version 11.5.1 (SPSS, Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Intra-laboratory validation

Results regarding validation parameters of the sTfR techniques are shown in Table 1.

The intra- and inter-assay precision for ELISA1 were found to be lower than 11% in Laboratory 1. Values in the same range were obtained by Laboratory 2 for QC2, but for lower concentrations (QC1) greater imprecision was observed.

For ELISA2, the intra- and inter-assay validation results in Laboratory 1 were better, with RSD% values lower than 8% and correct accuracies for all QC samples. Those results were worse in Laboratory 2, for which only the highest concentration (QC5) gave comparable precision values and correct accuracies.

Turbid and Nephel techniques were validated only in Laboratory 3. Precision values lower than 3%, and correct accuracy results were obtained for the intra and inter-assay validation of both techniques.

To calculate LOD and LOQ for the Nephel technique, the N-Diluent supplied by the manufacturer (blank sample) was analysed five times in the same run. However, all values obtained were expressed by the instrument as <0.15 mg/l, making the calculation of the standard deviation of the concentrations impossible. For this reason, the standard deviation of the lowest QC sample (QC 8) obtained in three runs using five replicates per run was used as a measure of the noise. The LOD and LOQ were expressed as 3 or 10 times the noise value. These results are also shown in Table 1.

The lowest LOD and LOQ were obtained for the Turbid assay, although the values obtained for the

others were also acceptable, taking into account the concentration range in real serum samples (Figs. 1 and 2). However, it is worth noting that, for ELISA1 and Turbid, 9% and 17% of the real serum samples, respectively, were below their lowest calibration point.

As can be seen in Figs. 1 and 2, the concentrations of sTfR in real serum samples were different depending on the technique used even if the units used were the same (mg/l). For the ELISA1 and Turbid techniques, the concentrations ranged from 0.2 to 24.6 mg/l; for the Nephel assay, the values ranged from 0.4 to 9.9 mg/l; and for the ELISA2, they ranged from 4.6 to 131.9 nmol/l.

3.2. Inter-laboratory validation

Results of inter-laboratory correlations for ELISA1 and ELISA2 are presented in Fig. 3. A good concordance in the results was obtained for both techniques (ICC=0.848 and ICC=0.973 for ELISA1 and ELISA2, respectively). However, dispersion in the results was much lower for ELISA2 (95% LA=-16.65% to 35.10%) than for ELISA1 (95% LA=-86.63% to 72.16%).

3.3. Inter-technique validation

The inter-technique validation was evaluated using Passing-Bablok regression and Bland-Altman plots. Comparisons between ELISA1, Turbid and Nephel are shown in Fig. 1 and Table 2. Comparable results were observed between ELISA1 and Turbid, as shown by the slope of the Passing-Bablok regression; however, the dispersion in results obtained between them (95% LA=-83.65% to 54.02%) was very high. No comparable results were observed between Nephel and the other two techniques, despite using the same units (mg/l). The results obtained with Nephel were approximately 2.7 times lower than those obtained by ELISA1 and Turbid, as shown by the slope of the Passing-Bablok regression and the Bland-Altman plots. The lowest dispersion in results was obtained when comparing techniques using autoanalysers (Turbid and Nephel) (Fig. 1).

The inter-technique comparison between the ELISA2 (using nmol/l) and the other three techniques showed the same differences between Nephel,

Table 1
Validation parameters of sTfR immunoassays obtained in laboratories 1, 2 and 3

ELISA1									
QC	mg/l ^a	Laboratory 1				Laboratory 2			
		Intra-assay		Inter-assay		Intra-assay		Inter-assay	
		Precision RSD (%)	Accuracy	Precision RSD (%)	Accuracy	Precision RSD (%)	Accuracy	Precision RSD (%)	Accuracy
1	1.16–2.07	3.5–10.7	correct	7.8	correct	2.2–20.6	incorrect ^b	21.7	correct
2	3.27–4.25	4.9–9.6	incorrect ^b	8.5	correct	4.1–8.6	incorrect ^b	7.6	correct
LOD (mg/l)								0.12	
LOQ (mg/l)								0.30	
Calibration curve (mg/l)								0.4–9	
ELISA2									
QC	nmol/l ^a	Laboratory 1				Laboratory 2			
		Intra-assay		Inter-assay		Intra-assay		Inter-assay	
		Precision RSD (%)	Accuracy	Precision RSD (%)	Accuracy	Precision RSD (%)	Accuracy	Precision RSD (%)	Accuracy
3	5.3–7.5	5.1–6.1	correct	6.3	correct	14.8–26.6	incorrect ^b	26.4	incorrect ^b
4	13.6–20.5	1.0–7.7	correct	6.8	correct	4.5–13.4	incorrect ^b	7.0	correct
5	35.5–52.5	2.1–6.1	correct	5.5	correct	3.0–7.9	correct	7.6	correct
LOD (nmol/l)								0.59	
LOQ (nmol/l)								1.42	
Calibration curve (nmol/l)								3–80	
Turbid									
QC	mg/l ^a	Laboratory 3							
		Intra-assay		Inter-assay					
		Precision RSD (%)	Accuracy	Precision RSD (%)	Accuracy				
6	1.9–2.5	0.8–1.0	correct			1.8	correct		
7	6–8.2	0.1–0.8	correct			1.0	correct		
LOD (mg/l)						0.04			
LOQ (mg/l)						0.09			
Calibration curve (mg/l)						1.7–39.6			
Nephel									
QC	mg/l ^a	Laboratory 3							
		Intra-assay		Inter-assay					
		Precision RSD (%)	Accuracy	Precision RSD (%)	Accuracy				
8	0.64–0.86	1.8–2.8	correct			2.3	correct		
9	1.38–1.86	0.3–1.5	correct			1.7	correct		
LOD (mg/l)						0.07			
LOQ (mg/l)						0.22			
Calibration curve (mg/l)						0.15–4.7			

^a Acceptable concentration range according to the manufacturers.

^b In one of the three assays, the mean value obtained for the QC sample was outside the acceptable concentration range.

ELISA1 and Turbid (Fig. 2; Table 2). While the slope of the Passing–Bablok regression (Table 2) was the same between ELISA1/ELISA2 and Turbid/ELISA2,

it was approximately 2.60-fold lower between Nephel/ELISA2. The lowest dispersion in results was obtained between ELISA2 and Nephel (Fig. 2).

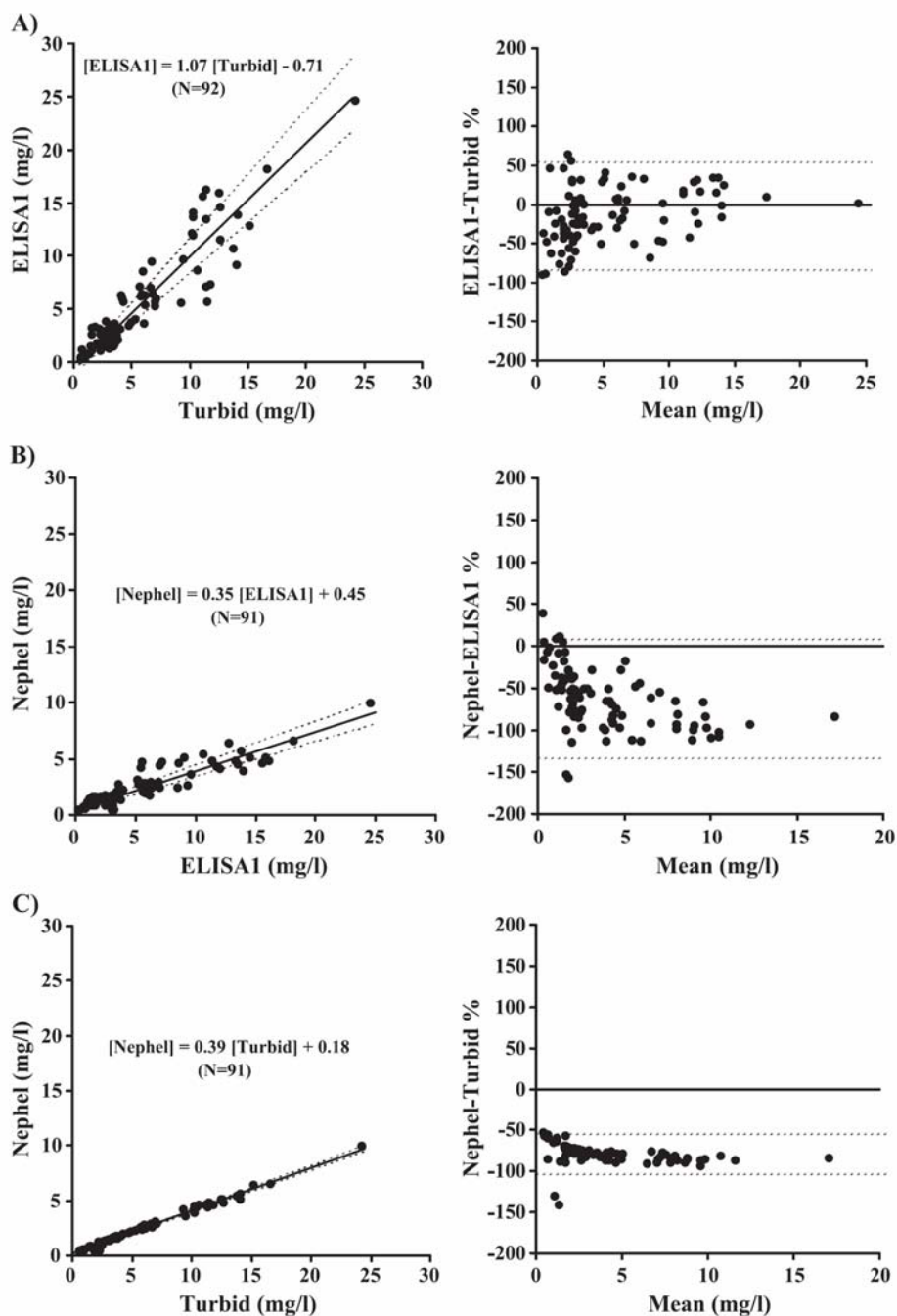
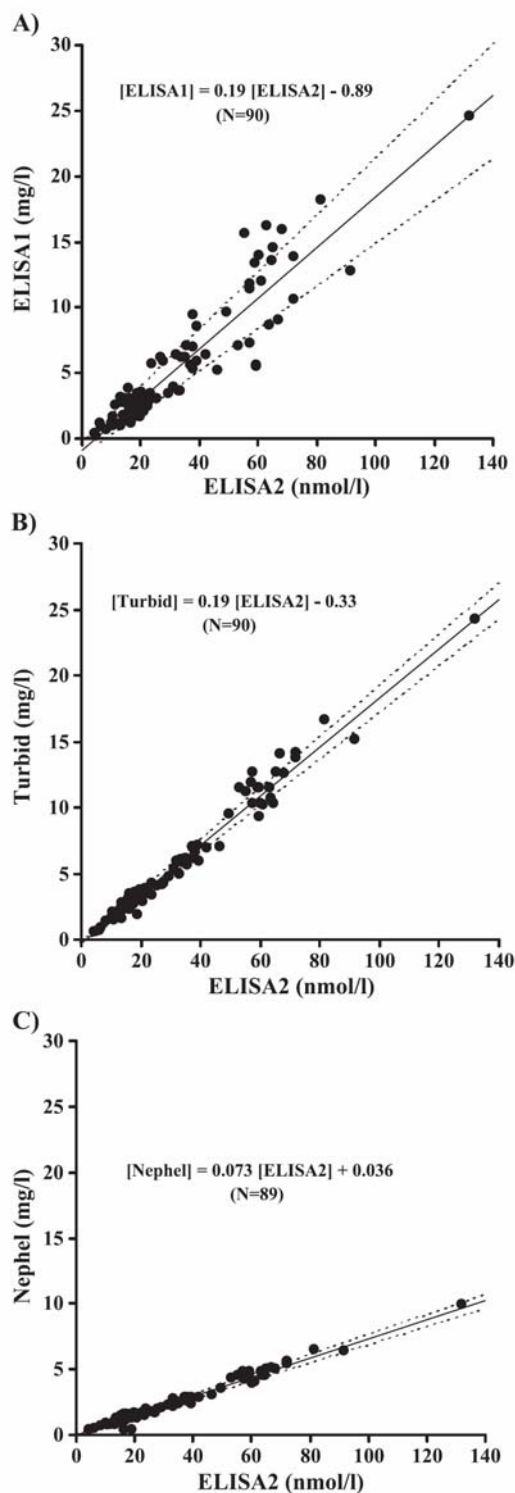


Fig. 1. Inter-technique comparison of sTfR assays: (A) Turbid and ELISA1, (B) ELISA1 and Nephel, and (C) Turbid and Nephel. Left: Passing–Bablok plots, dotted lines representing the 95% limits of confidence. The equation represents the Passing–Bablok regression. Right: Modified Bland–Altman plots (see text), dotted lines representing the 95% limits of agreement.



3.4. Stability studies

Stability results are shown in Fig. 4. Using freeze/thaw stability assays evaluated in human serum samples, no significant degradation was observed after two or three freeze/thaw cycles. Differences from the first freeze/thaw cycle concentration were lower than 2%. Regarding stability in simulated transportation conditions A and B, differences from the first freeze/thaw cycle concentration lower than 3% were obtained for all human serum samples.

4. Discussion

In this study, four different immunoassays have been exhaustively evaluated for the measurement of sTfR in serum samples and the degree of concordance of the results obtained with each of the applied techniques was also investigated.

All of the four studied techniques are simple to perform, with little preparation of reagents and no sample pretreatment. The turnaround time for results was about 10 min for those immunoassays using autoanalysers (Nephel and Turbid), and 4 h for both ELISA techniques.

The degrees of precision and accuracy obtained in the present study were adequate and they were similar to those obtained in previous studies describing commercially available kits for sTfR measurement (Kuiper-Kramer et al., 1996; Akesson et al., 1999; Cotton et al., 2000; Wians et al., 2001). Only in ELISA2 were poor precision and accuracy obtained particularly for the lowest concentration checked (QC3 sample) in one of the laboratories. As expected, the Turbid and Nephel tests, run on automated analysers, were better in terms of precision and accuracy than the ELISA tests.

The estimated LOD and LOQ for the ELISA1, ELISA2, Turbid and Nephel tests were similar or lower than most of those represented in the methods

Fig. 2. Inter-technique comparison of sTfR ELISA2 with the other sTfR techniques: (A) ELISA1 and ELISA2, (B) Turbid and ELISA2, and (C) Nephel and ELISA2. Passing–Bablok plots, dotted lines representing the 95% limits of confidence. The equation represents the Passing–Bablok regression.

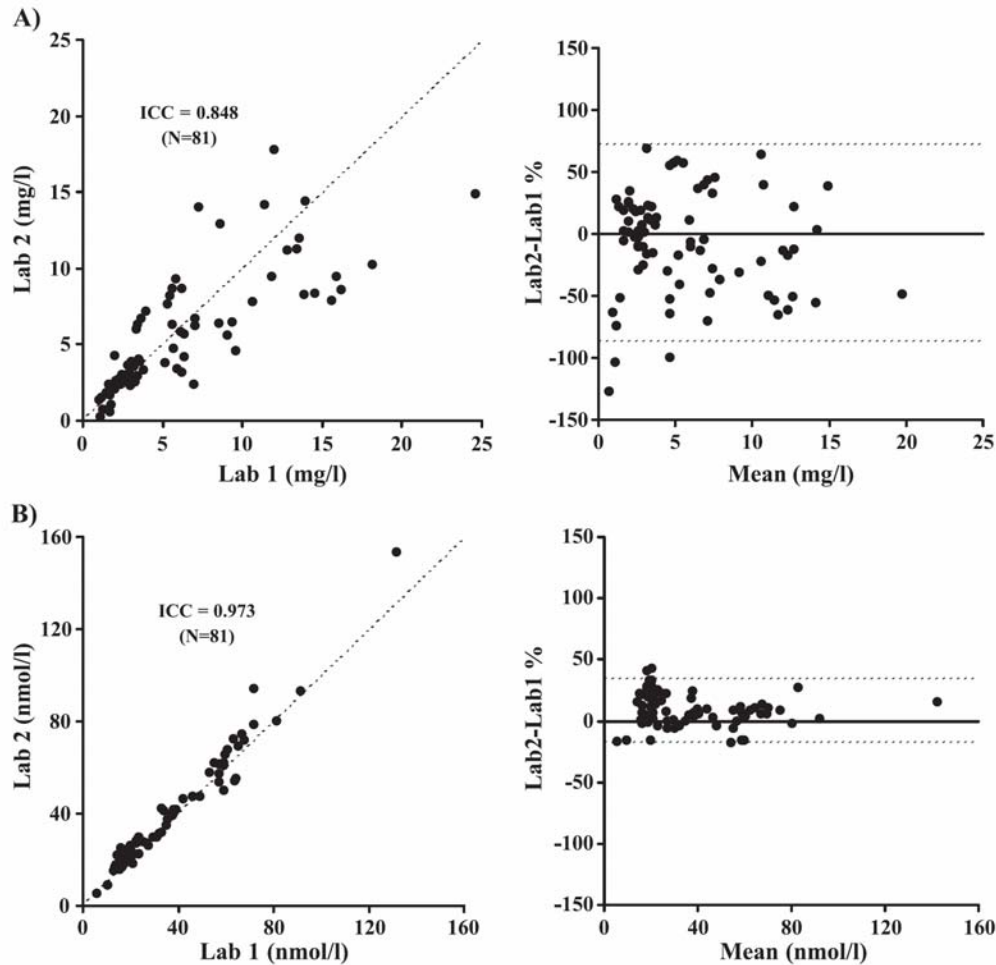


Fig. 3. Inter-laboratory comparison of sTfR techniques: (A) ELISA1; (B) ELISA2. Left: Graphical comparison between laboratories and intraclass correlation coefficient (ICC). The dotted lines represent total concordance. Right: Modified Bland–Altman plots (see text), with dotted lines representing the 95% limits of agreement.

previously reported (Kuiper-Kramer et al., 1996; Suominen et al., 1997; Allen et al., 1998; Cotton et al., 2000).

Table 2

Inter-technique Passing–Bablok comparison of sTfR techniques: equations and 95% confidence interval (CI)

Passing–Bablok comparison	95% CI for slope	95% CI for intercept
ELISA1=1.07 Turbid–0.71	0.96 to 1.21	–1.17 to –0.35
Nephel=0.35 ELISA1+0.45	0.31 to 0.39	0.33 to 0.56
Nephel=0.39 Turbid+0.18	0.38 to 0.40	0.14 to 0.21
ELISA1=0.19 ELISA2–0.89	0.16 to 0.22	–1.35 to –0.36
Turbid=0.19 ELISA2–0.33	0.18 to 0.19	–0.51 to –0.15
Nephel=0.073 ELISA2+0.036	0.069 to 0.076	–0.021 to 0.103

STfR was shown to be stable in serum samples after freeze/thaw cycles and also under the simulated storage/transportation conditions studied (Fig. 4). A further demonstration of this was the high degree of concordance in results between laboratories for ELISA1 and ELISA2 (Fig. 3) after real storage/transportation conditions. In fact, the serum samples analysed in Laboratory 2 were sent from Laboratory 1 by a regular courier system, i.e. packed in dry ice and arrived at their destination in approximately 48 h.

Inter-technique validation showed important discrepancies among results obtained using different immunoassays. Good agreement was observed between the results obtained using the ELISA1 and

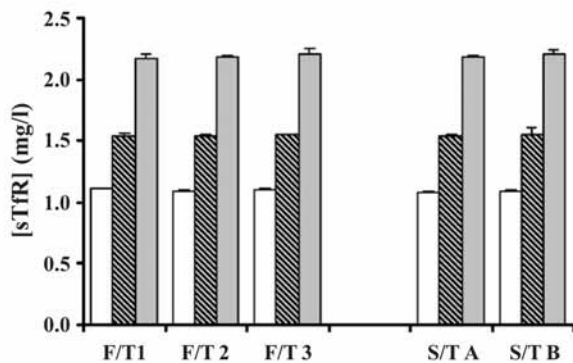


Fig. 4. Results of sTfR concentrations in three human serum samples after a freeze/thaw (F/T) stability study and under simulated storage/transportation (S/T) conditions. F/T cycles: cycles of freezing at -80°C for 30 min and thawing at room temperature for 30 min. S/T in condition A (S/T A): samples were stored frozen at -80°C for 48 h, at -20°C for 48 h, at -80°C for at least 48 h, and thawed at room temperature; S/T in condition B (S/T B): samples were stored frozen at -80°C , and thawed at room temperature for at least 48 h.

Turbid assays. However, significantly lower results were obtained with the Nephel assay. In comparison with ELISA2 (using a different unit, i.e. nmol/l), the differences between the other three assays were maintained. The slope of the Passing–Bablok regressions was significantly lower for Nephel/ELISA2 than for ELISA1/ELISA2 and Turbid/ELISA2. Although the specificity of the antibodies used in the different assays may be one of the causes, it seems that differences in the standard used for the calibration curve play the most important role in explaining the discrepancies found in results.

The sTfR is a truncated form of the transferrin receptor (TfR). The TfR is a membrane glycoprotein that contains two identical subunits, each of 95 kDa. The two subunits are linked by two disulfide bridges located in the extracellular domain. The sTfR is a soluble fragment of the TfR resulting from proteolytic cleavage above the two interchain disulfide bridges; the molecular weight for each monomer has been estimated to be 85 kDa (Shih et al., 1990). To the best of our knowledge, the proteins available as reference standards are the whole TfR (extracted mainly from placenta) and the sTfR. Although the structure and molecular weight of these two proteins is known, there is controversy regarding the possibility of their union with one or two transferrin units and the sTfR has not been clearly identified as a monomer or as a

dimmer (Shih et al., 1990; Hikawa et al., 1996; Lawrence et al., 1999; Feelders et al., 1999).

Among the immunoassays evaluated in the present study, the chemical entity of the calibration standard was only clearly described for the ELISA2 procedure. The sTfR standard was not bound to transferrin and the mass of the purified protein was estimated to be 74 kDa from amino-acid analysis (Allen et al., 1998). The difference in molecular weight from that described by other authors for each monomer may be due to the glycosylated portion. In order to elucidate which was the standard used for the other three assays, ELISA2 was used as a reference assay. Transforming ELISA2 results from nmol/l to mg/l, using the conversion factor of 74 kDa/mol, and in comparison with the Nephel results (mg/l), the following Passing–Bablok equation was obtained: $[\text{Nephel}] = 1.00 [\text{ELISA2}] - 0.02$, showing a complete agreement in results and suggesting that Nephel uses the same calibration standard as ELISA2.

On the other hand, transforming ELISA1 and Turbid from mg/l to nmol/l using a conversion factor of 190 kDa/mol, the following Passig–Bablok regressions were obtained:

$$[\text{ELISA1}] = 1.09 [\text{ELISA2}] - 5.90 \text{ and}$$

$$[\text{Turbid}] = 0.99 [\text{ELISA2}] - 2.17$$

indicating a high level of agreement in results between ELISA1 or Turbid and ELISA2, and showing that the calibration standards used in ELISA1 and Turbid were the same, namely the one with a molecular weight of approximately 190 kDa. Therefore, the different nature of the calibration standards seems to explain the discrepancies observed in the results from different immunoassays.

Finally, the inter-technique correlation between Nephel and ELISA2 was similar to that obtained by other authors (Parisotto et al., 2001).

In summary, four commercially available techniques for measuring serum levels of sTfR have been evaluated. Taking into account anti-doping control requirements and all the data evaluated, the results obtained for the ELISA2 and Nephel tests showed the best characteristics in terms of sensitivity, precision and accuracy at low sTfR concentrations, adequacy of the calibration curve to cover actual serum concentrations and, for ELISA2, inter-laboratory validation results.

Furthermore, both tests seem to use the same calibration standard. Regarding equipment requirements, the ELISA2 technique uses universally available equipment rather than specialized equipment and thus can be easily implemented in anti-doping control laboratories. However, it is more subject to variations due to the expertise of the analysts and has a longer turnaround time for results than the autoanalysers. Moreover, ELISA2 reagents are more expensive than Nephel. The final decision on the immunoassay used would be a compromise between the costs of the reagents and availability of equipment.

On the other hand, our results show the need for harmonization of the reference standard used for the calibration of the different immunoassays in order to obtain comparable results between the different techniques. The absence of an international standard for the sTfR protein or its recombinant form makes the harmonization of immunoassays measuring sTfR difficult. Finally, it is worth noting that our study has relevance not only in the anti-doping control field, but also in clinical immunology and research laboratories when there is a need to compare sTfR results obtained by different immunoassays.

Acknowledgments

This study has been funded by the following: Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Sanidad y Consumo de España (Research project no. 01/1328) and Progetto N.1039/1 "Tossicodipendenze e Doping" dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia.

References

- Abellan, R., Ventura, R., Pichini, S., Remacha, A.F., Pascual, J.A., Pacifici, R., Di Giovannandrea, R., Zuccaro, P., Segura, J., 2004. Evaluation of immunoassays for the measurement of erythropoietin (EPO) as an indirect biomarker of recombinant human EPO misuse in sport. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35, 1169.
- Akesson, A., Bjellerup, P., Vahter, M., 1999. Evaluation of kits for measurement of the soluble transferrin receptor. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 59, 77.
- Allen, J., Backstrom, K.R., Cooper, J.A., Cooper, M.C., Detwiler, T.C., Essex, D.W., Fritz, R.P., Means, R.T., Meier, P.B., Pearlman, S.R., Roitman-Johnson, B., Seligman, P.A., 1998. Measurement of soluble transferrin receptor in serum of healthy adults. *Clin. Chem.* 44, 35.
- Altman, D.G., Bland, J.M., 1983. Measurement in medicine: the analysis of method comparison studies. *Statistician* 32, 307.
- Cotton, F., Thiry, P., Boeynaems, J.-M., 2000. Measurement of the soluble transferrin receptor by immunoturbidimetry and immunonephelometry. *Clin. Biochem.* 33, 263.
- Feelders, R., Kuiper-Kramer, E., van Eijk, H., 1999. Structure, function and clinical significance of transferrin receptors. *Clin. Chem. Lab. Med.* 37, 1.
- Fleiss, J.L., 1999. *The Design and Analysis of Clinical Experiments*. Wiley Classics Library, Chichester, UK.
- Gareau, R., Audran, M., Baynes, R.D., Flowers, C.H., Duvallat, A., Senecal, L., Brisson, G.R., 1996. Erythropoietin abuse in athletes. *Nature* 380, 113.
- Gore, C.J., Parisotto, R., Ashenden, M.J., Stray-Gundersen, J., Sharpe, K., Hopkins, W., Emslie, K.R., Howe, C., Trout, G.J., Kazlauskas, R., Hahn, A.G., 2003. Second-generation blood test to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica* 88, 333.
- Hikawa, A., Nomata, Y., Suzuki, T., Ozasa, H., Yamada, O., 1996. Soluble transferrin receptor–transferrin complex in serum: measurement by latex agglutination nephelometric immunoassay. *Clin. Chim. Acta* 254, 159.
- Kuiper-Kramer, E.P.A., Huisman, C.M.S., van Raan, J., van Eijk, H.G., 1996. Analytical and clinical implications of soluble transferrin receptors in serum. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 34, 645.
- Lawrence, C., Ray, S., Babyonyshev, M., Galluser, R., Borhani, D., Harrison, S., 1999. Crystal structure of the ectodomain of human transferrin receptor. *Science* 286, 779.
- Parisotto, R., Gore, C.J., Emslie, K.R., Ashenden, M.J., Brugnara, C., Howe, C., Martin, D.T., Trout, G.J., Hahn, A.G., 2000. A novel method utilizing markers of altered erythropoiesis for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica* 85, 564.
- Parisotto, R., Wu, M., Ashenden, M.J., Emslie, K.R., Gore, C.J., Howe, C., Kazlauskas, R., Sharpe, K., Trout, G.J., Xie, M., Hahn, A.G., 2001. Detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes utilizing markers of altered erythropoiesis. *Haematologica* 86, 128.
- Passing, H., Bablok, W., 1983. A new biomedical method procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 21, 709.
- Remacha, A., Sarda, M., Parellada, M., Ubeda, J., Manteiga, R., 1998. The role of serum transferrin receptor in the diagnosis of iron deficiency. *Haematologica* 83, 963.
- Shih, Y., Baynes, R., Hudson, B., Flowers, C., Skikne, B., Cook, J., 1990. Serum transferrin receptor is a truncated form of tissue receptor. *J. Biol. Chem.* 265, 19077.
- Suominen, P., Punnonen, K., Rajamaki, A., Irjala, K., 1997. Evaluation of new immunoenzymometric assay for measuring soluble transferrin receptor to detect iron deficiency in anemic patients. *Clin. Chem.* 43, 1641.
- Wians, F., Urban, J., Kroft, S., Keffer, J., 2001. Soluble transferrin receptor (sTfR) concentration quantified using two sTfR kits: analytical and clinical performance characteristics. *Clin. Chim. Acta* 303, 75.

3.4. Discusión

En este capítulo se han evaluado distintos inmunoensayos para la determinación de los niveles séricos de la EPO y el sTfR, y la IGF-I y el P-III-P, biomarcadores propuestos para la detección indirecta del abuso de rhEPO y rhGH, respectivamente (J.D.Wallace y cols., 1999; S. Longobardi y cols., 2000; C.J. Gore y cols., 2003). Para cada biomarcador, las técnicas seleccionadas fueron exhaustivamente evaluadas junto con el grado de concordancia de los resultados obtenidos con cada una de ellas.

La discusión específica de los inmunoensayos evaluados para cada uno de los biomarcadores de estudio se encuentra en los artículos científicos presentados en el apartado Resultados del presente capítulo. Además de la obtención de resultados aceptables de precisión y exactitud intra e inter-día, y una buena correlación inter-laboratorio, se han identificado ciertos parámetros críticos en los inmunoensayos estudiados:

3.4.1. El pre-tratamiento de la muestra

Los resultados finales obtenidos por una técnica analítica no sólo dependen de la capacidad de detección de la propia técnica, sino también del procesamiento previo de la muestra, si este es necesario. La utilización de un procedimiento eficiente, capaz de obtener buenas recuperaciones, asegura la obtención del valor real de una muestra.

De los biomarcadores estudiados, el pre-tratamiento de la muestra sólo fue necesario en la determinación de la IGF-I total, pues requiere de una disociación previa de las IGFBPs. Los inmunoensayos seleccionados para la determinación de la IGF-I total fueron dos RIA y un ELISA con distintos protocolos de disociación de las IGFBPs.

En el RIA1, la separación de la IGF-I de las IGFBPs se obtuvo por precipitación utilizando un proceso de extracción ácido-etanol largo y laborioso, con una eficiencia de recuperación descrita del 70-80% (B.H. Breier y cols., 1991; W.F. Blum y B.H. Breier, 1994). El RIA2, de protocolo más sencillo y corto, consistía en una disociación ácida seguida de la adición de un exceso de IGF-II para competir por la unión con las IGFBPs. En el ensayo de ELISA, se realizaba una disociación ácida no seguida de un proceso de extracción de las IGFBPs. En las técnicas evaluadas, la distinta eficiencia obtenida en el pre-tratamiento estaba siendo la causa, al menos en parte, de la baja correlación inter-técnica obtenida. Los resultados

consistentemente inferiores obtenidos por el ELISA, comparados con los obtenidos por las técnicas de RIA, concuerdan con la inferior capacidad de disociación de las IGF-BPs de la técnica de ELISA, procedimiento de separación débil e inferior recuperación de la IGF-I total.

Al comparar los resultados de los RIA1 y RIA2, con el aumento de la concentración de la IGF-I, los resultados obtenidos con el RIA2 se hacían proporcionalmente inferiores en relación con los resultados obtenidos por el RIA1. Además de la probable distinta afinidad de los anticuerpos utilizados en ambos ensayos RIA, este efecto observado en función de la concentración de la IGF-I podría explicarse por la disminución de la eficiencia del proceso de disociación del RIA2 a concentraciones altas de IGF-I.

3.4.2. El rango de calibración

El rango de calibración de una técnica analítica debe ajustarse perfectamente a los niveles esperados en las muestras reales. Esto fue así para los inmunoensayos estudiados de la EPO y el sTfR. De igual forma, los LOQ obtenidos para estos inmunoensayos se mantuvieron por debajo del punto de concentración más bajo de sus correspondientes curvas de calibración, asegurando la buena determinación de los resultados analizados.

Los inmunoensayos de IGF-I evaluados presentaron resultados de precisión y exactitud similares cuando se comparaban las respectivas muestras QC de aproximadamente igual concentración. Sin embargo, tan sólo para el ELISA, las muestras reales analizadas se ajustaron al rango de calibración suministrado por los fabricantes y el LOQ obtenido se localizó por debajo del punto de concentración más baja de su curva de calibración. Para los otros dos inmunoensayos evaluados, RIA1 y RIA2, pese a que las muestras reales quedaron incluidas dentro del rango de calibración, los LOQ obtenidos se encontraban dentro de sus respectivos rangos. En el caso del RIA1, el LOQ calculado quedó por encima del tercer punto de la curva de calibración y, por debajo de él, el 17% de las muestras reales.

En la evaluación de los inmunoensayos del P-III-P, al comparar el rango de concentración de las muestras reales de suero analizadas con el rango de calibración del RIA3, se pudo apreciar que aproximadamente el 30% de las muestras reales se encontraban fuera del rango de calibración (por debajo de la muestra de calibración de concentración más baja), y que alrededor del 80% tenía una concentración inferior a 1 U/ml. Por el contrario, para el RIA4, todas las muestras se encontraban dentro del rango de calibración y por encima del LOQ calculado, donde la precisión y la exactitud de las muestras QC fueron adecuadas; aspecto que

también se vio reflejado en una mejor correlación inter-laboratorio. Aún así, los resultados del LOQ obtenidos para el RIA4 se encontraban por encima del punto de concentración más baja de su curva de calibración.

3.4.3. La armonización del estándar de calibración

La existencia de un estándar internacional y su utilización en la producción de las curvas de calibración de los distintos inmunoensayos comerciales es de gran importancia para la homogenización de los ensayos para un mismo analito.

Los inmunoensayos evaluados para la determinación de la EPO utilizaban cada uno un estándar internacional distinto en la preparación de sus curvas de calibración (el ensayo CHEM usaba el estándar WHO 67/343, hEPO urinaria; y el ELISA usaba el estándar WHO 87/684, rhEPO). Sin embargo, la reactividad del estándar WHO 87/684 fue también analizada utilizando el ELISA y se demostró que, esencialmente, este tenía la misma reactividad que el estándar WHO 67/343 (información proporcionada por el fabricante). A pesar de la buena correlación, ambos inmunoensayos no son exactamente comparables; siendo los resultados del ELISA sistemáticamente más bajos que los del CHEM. Estas diferencias en los resultados podrían ser debidas, no a los calibradores, sino a la distinta especificidad de los anticuerpos.

Para la determinación del sTfR, no existe un estándar internacional. A nuestro conocimiento, las proteínas disponibles comercialmente para su utilización como estándares de referencia en las curvas de calibración son el receptor de la transferrina no fragmentado y el sTfR. A pesar de que la estructura y peso molecular de estas dos proteínas es conocido, existe controversia en referencia a la posibilidad de su unión con una o dos unidades de transferrina y el sTfR circulante no ha sido claramente identificado como un monómero o un dímero (Shih et al., 1990; Hikawa et al., 1996; Lawrence et al., 1999; Feelders et al., 1999). Entre los inmunoensayos evaluados para el sTfR, la entidad química del estándar de calibración está únicamente descrita en el ELISA2. El estándar de sTfR no se encontraba unido a transferrina y la masa de la proteína purificada fue estimada en 74 kDa a partir del análisis de sus aminoácidos (Allen et al., 1998). La diferencia de este peso molecular con el descrito por otros autores para cada uno de los monómeros [85 kDa] (Y. Kohgo y cols., 1986; Y.J. Shih y cols., 1990 y 1993) puede ser debida a la porción glucosilada de la proteína. Utilizando el ensayo ELISA2 como ensayo de referencia, probamos de elucidar cuál era el estándar utilizado por los otros tres inmunoensayos evaluados. Transformando los resultados del ELISA2 de nmol/l a

mg/l, y comparándolo con los resultados del inmunoensayo Nephel (mg/l), se observó una concordancia completa en los resultados sugiriendo la utilización del mismo estándar de calibración por el inmunoensayo Nephel. Por otro lado, la transformación de los resultados de los inmunoensayos ELISA1 y Turbid de mg/l a nmol/l utilizando el factor de conversión de 190 kDa/mol, mostró un alto nivel de concordancia entre el ELISA1 o el Turbid y el ELISA2, lo que parece demostrar que los estándares de calibración utilizados por el ELISA1 y el Turbid eran el mismo, y de aproximadamente un peso molecular de 190 kDa, que correspondería a la glicoproteína transmembrana completa (dos subunidades idénticas de 95 kDa cada una) (J.D. Cook, 1999; R.A. Feelders y cols., 1999). Aunque los inmunoensayos utilizan distintos anticuerpos, la distinta naturaleza de los estándares de calibración del sTfR parece explicar las discrepancias observadas entre los resultados de los distintos inmunoensayos.

Para la IGF-I, los inmunoensayos evaluados utilizaron IGF-I recombinante para sus curvas de calibración, y estas fueron calibradas frente al estándar internacional WHO IRR 87/518. Mientras que en el RIA1 los valores de concentración de IGF-I descritos para cada uno de los puntos de la curva de calibración eran directamente los obtenidos al ser analizados frente al estándar internacional; en el RIA2 y el ELISA, los fabricantes proponían un factor de conversión (1,66 y 0,816, respectivamente) para dar los resultados equivalentes frente al estándar internacional. En nuestro estudio, los factores de conversión propuestos no fueron aplicados pues, en lugar de homogeneizar los resultados entre inmunoensayos, magnificaban sus discrepancias.

En el caso del biomarcador P-III-P, no existe un estándar internacional y los inmunoensayos evaluados no describían la naturaleza exacta del estándar de calibración utilizado. Tan sólo para el RIA3, la información del fabricante describe el P-III-P como una proteína de peso molecular 45 kDa; sin embargo, las unidades utilizadas por este inmunoensayo eran unidades arbitrarias indefinidas (U/mL) y distintas de las utilizadas por el RIA2 (ng/ml), dificultando la comparación directa de los resultados. Por otro lado, esta comparación directa no es del todo correcta, pues al parecer cada uno de los inmunoensayos determina distintos fragmentos del P-III-P (el RIA-gnost determina el P-III-P y los péptidos Col 1-3 y Col 1, mientras que el RIA UniQ PIIIINP determina sólo el P-III-P) (Rohde H y cols., 1979; O. Niemela y cols., 1982 y 1985).

En cualquier caso, se haya realizado o no la armonización de los estándares del biomarcador de interés, es recomendable que el inmunoensayo seleccionado utilice en su calibración un estándar de naturaleza claramente definida para, de este modo, facilitar la comparación con otros inmunoensayos que utilicen el mismo estándar o proporcionar un factor

de conversión que permita la transformación de los resultados a resultados equivalentes entre inmunoensayos.

3.4.4. La utilización de autoanalizadores frente a técnicas manuales

Desde un punto de vista estratégico, las técnicas inmunológicas manuales evaluadas (RIAs y ELISAs) son las más adecuadas por su fácil introducción en los laboratorios de control antidopaje, donde el tipo de equipos necesario para estas técnicas se encuentra habitualmente disponible. Y entre ellas, la utilización de los ELISAs tiene ventajas adicionales, puesto que tampoco requiere de unas instalaciones específicas, y la utilización de soluciones peligrosas se reduce considerablemente. Sin embargo, estas técnicas manuales están más sujetas a las variaciones debidas a la destreza del analista y, habitualmente, la obtención final de los resultados es mucho más larga y laboriosa que con los autoanalizadores. De esta forma, y a la vista de los resultados en la determinación de la EPO y el sTfR, las técnicas automatizadas mejoran significativamente la precisión y exactitud intra e inter-ensayo, y reducen la variabilidad inter-laboratorio.

Puesto que los resultados obtenidos para algunos de los ELISAs evaluados (el ELISA de EPO y el ELISA2 de sTfR) han sido correctos, la decisión final del inmunoensayo a utilizar será un compromiso entre el coste de reactivos, la disponibilidad del equipo y el tipo de análisis a realizar (clínico, control antidopaje, etc.). En aplicaciones clínicas, donde las muestras son analizadas en un único laboratorio con rangos de referencia obtenidos con el mismo test inmunológico, la concordancia inter-laboratorio no es tan relevante. Sin embargo, en el análisis del control antidopaje, donde la comparación de resultados entre laboratorios es un punto clave, parece aconsejable la utilización de autoanalizadores.

3.4.5. La discrepancia de resultados entre inmunoensayos

En el caso de la IGF-I, el inmunoensayo utilizado para su determinación en el desarrollo de los modelos matemáticos del Proyecto GH2000 desapareció del mercado antes de que pudiera ser evaluado frente a otros inmunoensayos comerciales (J.D. Wallace y cols., 1999 y 2000; R. Dall y cols., 2000). Como se ha demostrado en el presente trabajo, la correlación inter-técnica de la determinación de IGF-I es muy baja, lo que demuestra que los resultados de las

concentraciones de IGF-I son dependientes del inmunoensayo utilizado. Este hecho limita el valor de los resultados obtenidos en los estudios de administración de rhGH, pues ahora estos no pueden ser exactamente reproducidos.

La aplicación de los resultados de estos biomarcadores, obtenidos a partir de distintos inmunoensayos, afectará al resultado final de los modelos matemáticos. Un ejemplo claro de la inducción a error que puede conllevar se observa para la determinación de la EPO utilizando dos inmunoensayos distintos. A pesar de que ambos inmunoensayos estaban calibrados por el mismo estándar internacional y correlacionaban bien, la concentración de EPO obtenida con la técnica de ELISA fue alrededor de un 25% inferior que la obtenida con la técnica CHEM. El ensayo CHEM fue propuesto como técnica de cribado inicial debido a que utiliza un autoanalizador, lo que permite la realización de una gran cantidad de muestras, y el ensayo de ELISA fue propuesto como técnica de confirmación (R. Parisotto y cols., 2001). Por tanto, dependiendo del ensayo utilizado para el cribado y la confirmación se pueden obtener resultados distintos. En los modelos matemáticos propuestos, la EPO contribuye como el logaritmo neperiano de la concentración en suero (J. Gore y cols., 2003). La diferencia observada del 25% en la concentración de la EPO entre ambos inmunoensayos puede llevar a una puntuación final distinta de aproximadamente 2 unidades (modelos ON y OFF), lo que puede tener impacto en la evaluación final de una muestra con una puntuación cercana al valor límite para una probabilidad determinada. Este efecto se ve incrementado para el sTfR, donde valores significativamente inferiores (aproximadamente del 60%) fueron obtenidos con el ensayo Nephel comparado con las otras técnicas evaluadas (ELISA1 y Turbid).

3.4.6. Estabilidad de las proteínas

La estabilidad de estas proteínas durante el almacenamiento y el transporte asegura la reproducibilidad de los resultados entre distintas determinaciones, realizadas en uno o varios laboratorios. Los estudios de estabilidad se realizaron en distintas muestras dependiendo del biomarcador de estudio. Los resultados de los estudios de estabilidad de la EPO en muestras QC, preparadas en tampón estabilizador de proteínas, mostraron que estas eran estables tras dos ciclos de congelación/descongelación y en condiciones de transporte simulado. En muestras de suero, la estabilidad de la proteína en condiciones de transporte real quedó demostrada por la gran concordancia de los resultados obtenidos en la validación inter-laboratorio.

El sTfR se mostró estable en muestras de suero tras ciclos de congelación/descongelación y también tras las condiciones de transporte/almacenamiento simulado estudiadas. La gran estabilidad de esta proteína también quedó demostrada por el alto grado de concordancia de los resultados inter-laboratorio obtenidos para el ELISA1 y ELISA2, en condiciones de transporte real.

En el caso de los biomarcadores IGF-I y P-III-P, ambos demostraron buena estabilidad tras ciclos de congelación/descongelación y tras las condiciones de transporte estudiadas, tanto para muestras QC como para muestras reales.

Como conclusión de los estudios de validación, debido a la alta dependencia de los resultados de concentración de los biomarcadores de interés por el inmunoensayo utilizado, las recomendaciones sobre la utilización de un inmunoensayo específico en el control antidopaje deben tener en consideración los resultados de la validación intra-laboratorio así como de la validación inter-laboratorio e inter-técnica. En general, el pre-tratamiento de la muestra, la distinta naturaleza de los estándares de calibración y la distinta especificidad de los anticuerpos utilizados en cada uno de los inmunoensayos son las principales causas de las discrepancias observadas.

Previamente a la introducción de estos parámetros como biomarcadores indirectos del abuso de rhEPO o rhGH, es necesario el control de estos factores con el objeto de mejorar la reproducibilidad y concordancia entre distintos laboratorios y distintos estudios, y poder definir con rigor los modelos matemáticos de la detección de la administración de estas hormonas recombinantes y sus rangos de concentración en poblaciones seleccionadas. Hay que destacar que, desde el punto de vista del control antidopaje, la utilización de técnicas comerciales tiene su principal limitación en que estas están sujetas a las exigencias del mercado y, por tanto, como ocurrió para el inmunoensayo de la IGF-I con el que se desarrollaron los modelos de detección indirecta de rhGH, su producción puede detenerse afectando a futuras aplicaciones. En la actualidad, laboratorios de control antidopaje han iniciado planes de desarrollo de nuevos inmunoensayos a partir de clones que produzcan sus propios anticuerpos para la detección de biomarcadores indirectos de rhGH.

Finalmente, tras la exhaustiva evaluación de todas las técnicas seleccionadas, los resultados obtenidos demuestran la necesidad de validación de los inmunoensayos previamente a su utilización; pero no sólo en el campo del control antidopaje, sino también en la clínica

inmunológica y los laboratorios de investigación cuando hay necesidad de comparar estudios en los cuales los resultados han sido obtenidos utilizando distintos inmunoensayos.

4. Efecto de la intensidad de entrenamiento y el ejercicio de resistencia en deportistas sobre la concentración de los biomarcadores indirectos del abuso de rhEPO y rhGH

4.1. Introducción

Con la intención de ampliar la ventana de detección del consumo de rhEPO y rhGH, se han desarrollado modelos matemáticos basados en la combinación de diversos biomarcadores indirectos (R. Parisotto y cols., 2001; C.J. Gore y cols., 2003; informe interno de la Comisión Médica del COI). Sin embargo, antes de la utilización de estos métodos indirectos, es necesario demostrar su aplicabilidad en las poblaciones de interés profundizando en el estudio del comportamiento de los biomarcadores en distintas situaciones fisiológicas y ambientales.

Como se ha descrito en la introducción general de la presente memoria, tanto en deportistas como en la población estándar, las concentraciones de los biomarcadores pueden estar influenciadas por factores individuales, como el género, la edad, el índice de masa corporal, por diversos factores ambientales o patologías que afecten al comportamiento fisiológico de la EPO o la GH. Además, en población atlética, también hay que tener en cuenta la distinta intensidad o tipo de entrenamiento, el estrés de competición o la frecuente presencia de lesiones. Estos estudios son necesarios para establecer, con mayor fiabilidad, los rangos de normalidad de dichos biomarcadores y validar los criterios propuestos para detectar el consumo de rhEPO y rhGH.

En el siguiente capítulo se recoge la metodología utilizada y los resultados obtenidos en los estudios realizados para determinar el efecto del nivel atlético y el ejercicio de resistencia sobre la concentración sérica de los biomarcadores indirectos del abuso de las hormonas recombinantes rhEPO y rhGH en poblaciones seleccionadas de deportistas.

4.2. Material y métodos

A continuación, se incluye una breve descripción de los sujetos que intervinieron en estos estudios y los métodos utilizados en los análisis.

4.2.1. Selección de las poblaciones de interés

Criterios de selección y exclusión de los voluntarios

Teniendo en cuenta el objetivo principal de los estudios, los criterios de selección de los voluntarios se basaron en: edad y sexo; nivel atlético del voluntario (deportista no profesional, recreacional, o deportista profesional, de élite); y deporte practicado.

Los sujetos fueron excluidos del estudio si presentaban desórdenes endocrinos, historias clínicas con enfermedades recientes o crónicas, si habían recibido una transfusión sanguínea o participado en otros estudios clínicos durante el mes previo al inicio del estudio, o admitían la utilización de GH, IGF-I, EPO o cualquier sustancia conocida con efectos anabólicos o activadoras de la eritropoyesis. Dentro del *Cuaderno de recogida de muestras* (ver apartado 8. Anexos), se incluye un ejemplar de los "Criterios de inclusión y exclusión" para el estudio de poblaciones atléticas.

Los voluntarios, tras ser seleccionados según estos criterios, recibieron la explicación completa del estudio en el cual iban a participar y rellenaron un informe de consentimiento personal. Un total de 246 (200 hombres y 46 mujeres) voluntarios sanos de raza caucásica, de edades comprendidas entre los 12 y los 55 años, participaron en el estudio.

Aspectos éticos

Los estudios realizados fueron previamente aprobados por el Comitè Ètic per la Investigació Clínica del IMAS (Institut Municipal d'Assistència Sanitària, Barcelona, España), número de protocolo 2000/1145/I; y realizados de acuerdo con las recomendaciones de la Declaración de Helsinki.

Registro de datos antropométricos y recolección de muestras

Al inicio del estudio y para cada uno de los voluntarios, se realizó un cuestionario detallado (*Cuadernos de recogida de muestras*, ver apartado 8. Anexos) dónde se encontraban los datos antropométricos e información de los antecedentes rutinarios (actividad física, dieta, etc.) y toxicológicos (consumo de tabaco y alcohol, y fármacos) de los voluntarios, además de los antecedentes alérgicos, patológicos y quirúrgicos. Ningún voluntario declaró tomar medicaciones de conocido efecto sobre la práctica del ejercicio o sobre la función endocrina sin

previa prescripción médica. En el cuestionario también se describía la actividad física realizada, el deporte practicado y la carga de entrenamiento semanal. Finalmente, todos ellos fueron sometidos a una completa revisión médica.

El cuestionario fue completado en todas las ocasiones siguientes en las que el voluntario se presentó para la recogida de muestras, con información detallada de cualquier herida, enfermedad, medicación eventual u otros cambios relevantes que pudieran haber ocurrido durante el periodo de estudio. Junto a la información referente al voluntario, se registró el tipo de muestras (sangre total, suero y orina) recogidas en cada ocasión. Todos los datos obtenidos y todas las muestras recogidas fueron registrados en archivos de base de datos.

En todo momento se garantizaron los aspectos confidenciales de muestras y resultados, y se informó a los voluntarios de la posibilidad de consultar sus respectivos resultados si así lo requerían.

4.2.2. Inmunoensayos utilizados

Tras la validación de inmunoensayos realizada en el apartado 3 de la presente memoria, se seleccionó, para cada uno de los biomarcadores, el inmunoensayo que mejor se adaptaba a las necesidades del estudio. Estos fueron:

- EPO: inmunoensayo quimioluminiscente de Immulite, DPC, Los Angeles, CA, USA;
- sTfR, técnica nefelométrica N Latex sTfR de Dade Behring (Marburg, Germany) utilizando el autoanalizador BNTH System de Dade Behring Inc;
- IGF-I total: ELISA Quantikine Human IGF-I Immunoassay de R&D Systems, Minneapolis, MN, USA;
- P-III-P: Radioinmunoensayo competitivo Intact PIIINP RIA kit de Orion Diagnostica, Espoo, Finlandia.

Además de la determinación de las concentraciones de los biomarcadores séricos, los parámetros hematológicos necesarios para la aplicación de los modelos matemáticos de detección indirecta del abuso de rhEPO (hemoglobina y porcentaje de reticulocitos) (C.J. Gore y cols., 2003) fueron determinados utilizando el analizador hematológico ADVIA 120 (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). En el caso del grupo de triatlón, tanto las determinaciones de EPO y sTfR, como de hemoglobina y porcentaje de reticulocitos, fueron realizadas con

distintos inmunoensayos (ELISA Quantikine IVD Human EPO ELISA, R&D Systems, Minneapolis, USA, y Tina-quant sTfR, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) y autoanalizador hematológicos (Symex XE-2100, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) de los utilizados en el desarrollo de los modelos matemáticos. Las transformaciones realizadas para la aplicación de los resultados de estos parámetros a los modelos se encuentran ampliamente descritas en los Capítulos 3 y 5 de la presente memoria.

4.2.3. Análisis estadísticos

Para cada una de los biomarcadores de interés se obtuvieron la media y desviación estándar de los distintos grupos poblacionales estudiados. En los deportistas de élite, se calcularon los coeficientes de variación individual (definido como la medida de la variabilidad del marcador para un mismo individuo en distintas condiciones) y el intervalo de confianza del 95%.

Los análisis de variancia multifactorial (ANOVA), los test post-hoc de t-Student y Tukey se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS 2001 para Windows, versión 11.5.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Las correlaciones bivariadas de los biomarcadores se realizaron utilizando el coeficiente de correlación de Pearson para una significación bilateral. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de p inferiores a 0,05.

Se probaron diversas ecuaciones matemáticas para determinar la relación de las concentraciones de algunos de los biomarcadores con la edad de los sujetos. Para la IGF-I y el P-III-P, el mejor ajuste se obtuvo con la regresión lineal del logaritmo de la concentración frente a la inversa de la edad. Los límites de confianza del 95% de estos dos biomarcadores también se calcularon en función de la edad.

4.3. Resultados

4.3.1. Effect of physical fitness and endurance exercise on indirect biomarkers of recombinant erythropoietin misuse

Rosario Abellán, Rosa Ventura, Simona Pichini, Ilaria Palmi, Monserrat Bellver, Ramón Olivé, José Antonio Pascual, Roberta Pacifici, Piergiorgio Zuccaro, Jordi Segura. *International Journal of Sport Medicine*, *International Journal of Sports Medicine* 2006, aceptado.

4.3.2. Effect of physical fitness and endurance exercise on indirect biomarkers of recombinant growth hormone misuse: Insulin-like growth factor I and procollagen type III peptide

Rosario Abellán, Rosa Ventura, Simona Pichini, Rita De Giovandrea, Monserrat Bellver, Ramón Olivé, José Antonio Pascual, Roberta Pacifici, Piergiorgio Zuccaro, Jordi Segura. *International Journal of Sports Medicine* 2006, aceptado.

Physiology & Biochemistry

Effect of physical fitness and endurance exercise on indirect biomarkers of recombinant erythropoietin misuse

R. Abellan^{1,2}, R. Ventura^{1,2}, S. Pichini³, I. Palmi³, M. Bellver⁴, R. Olive⁴, R. Pacifici³, J.A. Pascual^{1,2}, P. Zuccaro³, J. Segura^{1,2}.

¹Pharmacology Research Unit, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Barcelona, Spain;

²Department of Experimental and Health Research, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain;

³Drug Research and Evaluation Department, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy;

⁴Centre d'Alt Rendiment, Barcelona, Spain.

Corresponding author:

Jordi Segura, PhD

Pharmacology Research Unit,

Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM)

Doctor Aiguader 80, E-08003 Barcelona, Spain

Tel +34-93-2211009, fax +34-93-2213237, e-mail: jsegura@imim.es

Running title: Exercise effects on biomarkers of rhEPO misuse.

ABSTRACT

Erythropoietin (EPO) and soluble transferrin receptor (sTfR) in serum have been proposed as indirect biomarkers for the detection of recombinant human EPO (rhEPO) misuse in sport. The purpose of the present study was to investigate the influence of different levels of physical fitness, sport, different training workload during the sport season, and endurance exercise in the concentrations of these serum biomarkers for their application into mathematical models to indirectly detect rhEPO misuse.

Serum EPO and sTfR concentrations were measured in 96 elite athletes of various sports along the sport season, in 21 recreational athletes at baseline (non-exercising) conditions and in other 129 recreational athletes before and after long-distance races (10 and 21 km). In elite athletes, haemoglobin concentrations and percentage of reticulocytes were also measured, and indirect detection models applied.

In recreational athletes, for EPO and sTfR, significant differences were only observed after the 21 km race. In baseline conditions, no differences were observed between recreational and elite athletes for EPO and sTfR. In elite athletes, individual EPO and sTfR concentrations slightly changed over the sport season, with coefficients of variation (CV) of 26.1% and 9.0%, respectively. Haemoglobin and reticulocytes were influenced by sport, but their individual variation over the sport season was not physiologically relevant (CV of 3.7% and 21.3%, respectively). When applying mathematical models for detection of rhEPO administration, only one elite athlete obtained an individual model score above the established thresholds.

Physical fitness, sport and different training workload during the sport season had no substantial effect on serum EPO and sTfR concentrations, except in recreational athletes after a 21 km race. Variations observed in mathematical models to detect EPO administration were mainly due to fluctuation in haemoglobin concentrations, commonly observed in elite athletes.

Keywords: EPO, sTfR, indirect markers, doping detection, exercise.

INTRODUCTION

The abuse of recombinant human erythropoietin (rhEPO) and analogues (stimulants of the red blood cell system) to improve athletic performance is nowadays a major concern in sport. Therefore, a reliable and feasible detection of such abuse is a new challenge to researchers involved in the anti-doping field. Different methods to detect rhEPO misuse have been described including indirect measurements based in the fact that artificially accelerated erythropoiesis leads to characteristic changes in peripheral blood variables. In year 2000, Parisotto R. et al. [14] defined mathematical models for indirect detection of current (ON-model) and recent discontinued (OFF-model) rhEPO abuse based on haematological parameters and serum variables. Since then, these models have been refined and simplified [8]. These second-generation mathematical models (ON he, ON hes, OFF hr and OFF hre) used concentrations of haemoglobin (Hb), serum erythropoietin (EPO) and serum soluble transferrin receptor (sTfR), as well as percentage of blood reticulocytes.

In previous studies, athletic population reference ranges have been described for the above-mentioned haematological parameters [21, 22, 26]. Caution should be taken when interpreting blood results to avoid aberrant results which may be caused by genetic, health or environmental circumstances [3, 4, 15].

In the case of athletes, it has to be considered that exercise itself is known to influence the blood cell system and vascular volumes on long- and short-term bases [9, 27]. Therefore, the physiologic responses to exercise could be misinterpreted with changes caused by artificially stimulated erythropoiesis. This might be of importance when evaluating the results of indirect tests done in athletes during training and in competition. Although many authors have studied the influence of various types of training exercise on haematological variables and iron metabolism [5, 7, 10, 12, 13, 17, 19, 20, 23, 25, 29], data comparing these variables in different sports, different levels of physical fitness or during the sport season are scarce [21, 22, 24, 26].

Two main factors support the choice of EPO and sTfR as indirect biomarkers of rhEPO misuse in sport. First, the clear response of serum EPO and sTfR concentrations to rhEPO administration [14]. Serum EPO and sTfR concentrations were significantly altered in the rhEPO treated group throughout administration; and, remained modified the first two weeks of wash-out compared to the placebo treated group [14]. Second, the high stability of EPO and sTfR in serum samples [1, 2]. In contrast to whole blood samples where haemoglobin and reticulocytes are measured, serum samples can be frozen and stored for a long time. This factor is of great importance in the anti-doping field, where concentration values obtained by different laboratories around the world may need to be compared and even samples exchange for confirmation between different laboratories is possible.

In this context, the present study aimed to evaluate concentrations of serum EPO and sTfR in athletes at different levels of physical fitness, in different occasions of the sport season and from sports involving different type of exercise. Moreover, how eventual variations in the concentration of these two parameters could affect the final value of model scores for the indirect detection of rhEPO when mathematical were applied, was also investigated in elite athletes.

DESING AND METHODS

Subjects and study design

A total of 245 healthy Caucasian subjects (198 males, 47 females) participated in the study: 96 elite athletes of various sports along the sport season, 21 recreational athletes at baseline (non-exercising) conditions and 129 recreational athletes before and after long-distance races. All participants completed a detailed questionnaire concerning physical activity, sport, weekly training workload, smoking, use of drugs, iron or other dietary supplementation, and underwent a complete medical revision. Subjects were excluded from the study if they had received a blood transfusion during the previous month, stayed at high altitude throughout the study, or admitted the use erythropoietin, or any substance known to enhance red blood cell formation. However, the non declared abuse of erythropoietic stimulants can not be excluded in any of the populations studied.

Subjects were informed and gave written consent to participate in the study, which was approved by the Instituto Municipal de Asistencia Sanitaria Ethical Committee of Clinical Research (CEIC/IMAS nº. 2000/1145/I) and it was conducted in accordance with the Helsinki Declaration.

Subjects were divided in two different main groups according to their physical fitness: elite athletes (members of sport federations, national and international sporting squads) and recreational athletes (subjects regularly practicing any type of sport in the last five years for at least 5 hours a week). Elite athletes participated in different sports (swimming, synchronized swimming, tae kwon do, rhythmic gymnastics, soccer, triathlon, and weight lifting). A detailed description of the subjects is given in Table 1.

To look for an eventual effect of time of blood collection, two blood samples were collected in recreational athletes at baseline (non-exercising) the same day, at 9:00 hours (in fasting conditions) and 17:00 hours (in non-fasting conditions).

To study the effect of strenuous prolonged physical exercise, blood samples from two groups of male recreational athletes were collected. A group of 99 males performed a 10 km race (around 45-50min), and blood samples were obtained before and immediately after the race. Another group of 30 males performed a semi-marathon race (21 km) (around 1h 50min), and blood samples were obtained the day before the race, and immediately after the race.

To study the effects of physical fitness on serum concentration of both EPO and sTfR, baseline (non-exercising) blood samples were obtained in both recreational and elite athletes (end of the vacation period when subjects did not practise their usual training).

Finally, to study the effect of specific type of exercise and different training workloads in elite athletes, whole blood (EDTA to prevent clotting) and serum samples from athletes of different sports were collected in three different occasions during the sport season: shortly before the beginning of the season when training workload was minimal (baseline), in the middle of training preparation when training workload was at a mean level (training), and immediately after the first competition when training workload was maximum (competition). Unfortunately, samples were not available in some of the occasions due to the inherent difficulties to collect samples from elite athletes, especially after competition. Subjects for which samples were collected in each situation are listed in Table 1.

Sample analysis

Serum samples were stored at -80°C until analysis. EPO and sTfR were measured using a chemiluminescent immunoassay kit (Immulite, DPC, Los Angeles, USA) and a N Latex sTfR nephelometric technique (Dade Behring, Marburg, Germany) with the automated analyser BNTH System (Dade Behring Inc.), respectively. Imprecision was less than 5.3% and 2.8% (within-run), and 4.7% and 2.3% (between-run) for EPO and sTfR, respectively. The complete validation of both immunoassays for doping purposes has been already published elsewhere [1, 2].

In case of elite athletes, haematological parameters including Hb and reticulocytes were measured using the ADVIA 120 Hematology Analyzer (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). Second-generation mathematical models (ON he, ON hes, OFF hr and OFF hre) to detect rhEPO abuse developed by Gore C. et al. [8] were applied, where h means Hb; e, serum EPO; s, serum sTfR; and r, blood reticulocytes.

Statistics

For each parameter, and after the confirmation of its normal distribution in the different groups studied, mean and standard deviation were obtained. In elite athletes, 95% intervals of confidence and tolerance intervals (defined herein as the range where the 90% of the athletic population will be contained with a 95% of certainty) in baseline conditions, together with individual coefficients of variation (defined herein as the measure of the “within-athlete” variability of the marker in different conditions) along the sport season were also calculated.

Multifactor analysis of variance (ANOVA) using the Tukey multiple-comparison, repeated measures ANOVA and post-hoc Student test were carried out using the statistical package SPSS 2001 for Windows, version 11.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). P-values < 0.05 were considered to be significant.

RESULTS

Anthropometrical and physiological data

Anthropometrical and physiological data of elite athletes compared to recreational athletes are summarized in Table 1. Considering the different sports studied for elite athletes, rhythmic gymnastics group presented the youngest athletes and, soccer and triathlon groups the oldest.

EPO and sTfR serum concentration

Preliminary evaluation of data was performed to look for eventual effect of time of blood collection, gender and age in serum concentrations of EPO and sTfR in athletes. No differences due to blood collection time nor gender were observed, and only sTfR concentration was significantly influenced by age ($p = 0.039$).

Between recreational and elite athletes, no significant differences were observed in baseline concentrations for EPO (10.5 ± 2.8 and 11.4 ± 4.2 IU/l EPO, respectively) neither for sTfR (1.42 ± 0.25 and 1.55 ± 0.29 mg/l sTfR, respectively).

Among elite athletes from different sports at baseline conditions (Table 2), statistical differences were only observed for serum EPO between swimming and weight lifting athletes in baseline conditions. The 95% interval of confidence and the interval of tolerance of elite athletes for EPO and sTfR in baseline conditions are presented in Table 3. Within the same sport, different training workload during the sport season did not affect concentration values of serum EPO and sTfR in elite athletes (Table 2). Indeed, the “within-athlete” coefficients of variation obtained were relatively low for EPO and sTfR (Table 3).

Direct influence of strenuous acute exercise on EPO and sTfR serum concentrations was determined in recreational athletes before and after long-distance races (races of 10 and 21 km). While EPO and sTfR serum levels remained constant after the 10 km race; significant differences were observed after the 21 km race for EPO and sTfR (Table 4).

Hb concentrations and percentage of reticulocytes

Hb concentration and percentage of reticulocytes are reported in Table 2 for elite athletes. Gender significantly influenced Hb values under all conditions, and for that reason, values were represented separately for males and females. Within the elite athletes from different sports, statistical differences were observed in baseline conditions for percentage of reticulocytes and male Hb concentrations. Different training workload during sport season only affected Hb concentration values of female synchronized swimming group (Table 2).

In baseline conditions, mean \pm standard deviation, 95% interval of confidence and interval of tolerance for Hb and percentage of reticulocytes observed for the whole elite athletes group are presented in Table 3. The “within-athlete” coefficients of variation along the sport season observed for Hb and percentage of reticulocytes are also summarized in Table 3.

Mathematical models

As different threshold scores for men and women have been proposed in mathematical models [8], results are analysed separately.

Individual ON and OFF models scores for elite athletes are represented in Figure 1. For males and females, ON and OFF model scores differed among sports and, for the same sport, in different occasions during the sport season (data not shown). However, only one athlete's individual score (male triathlete, baseline) was above the threshold corresponding to 1:100 (random chance for one false positive in one hundred cases) for ON he model [8]. That male triathlon athlete showed the highest Hb concentration value (17.7 g/dl). On the other hand, for some female elite athletes, very low individual OFF models scores were obtained. Those female athletes (swimming, baseline; rhythmic gymnastics, training) showed low Hb concentration values, and one of them (rhythmic gymnastics, training) showed the highest EPO and sTfR values recorded (33.6 IU/l and 3.8 mg/l, respectively). After checking the other haematological parameters determined for those female volunteers (haematocrit, iron and ferritin concentrations), iron deficiencies were presumed.

DISCUSSION

The use of secondary blood markers has been proposed to disclose rhEPO misuse. However, serum and blood biomarkers proposed to indirectly detect rhEPO misuse could potentially be confounded by numerous factors such as diseases, exercise, altitude and also longitudinal biological variation of blood parameters [3, 4, 11, 15, 21, 24]. Therefore, reference ranges should be established for elite athlete population to differentiate between the fluctuations associated with exposure to such influences and the atypical variation of these parameters caused by administration of rhEPO use or other stimulants of the erythropoietic system.

Serum concentration of EPO and sTfR found in our study groups were consistent with those described in previous studies for populations of various age, gender and physical activity [3, 5, 16, 19, 23, 26]. For both biomarkers, no differences were observed for different physical fitness (elite versus recreational) neither at different times of blood collection [18]. As previously observed by other authors [16, 28], higher concentration values of serum sTfR were observed in younger volunteers, a difference that was not influenced by the athletes' physical fitness.

There are scarce studies in elite athletes from different sports or in different occasions of the sport season comparing EPO or sTfR concentrations [26, 29]. Therefore, the main results of our study are that the specific type of sport does not affect substantially EPO serum values; and, besides, those values show a great stability during the sport season. Similarly, sTfR did not

show differences in elite athletes from different sports or in different occasions of the sport season. Moreover, the “within-athlete” variability of sTfR (9%) agrees with previous studies where “within-subject” day-to-day variation observed was about 10% in healthy men and women [6, 11] and about 6% specifically in male and female judoists [12, 13].

The impossibility to collect samples previous to a competition from the elite athletes’ population prevented the study of the effect of acute endurance exercise in this population. When studying acute endurance exercise in recreational athletes, no differences were observed in EPO or sTfR concentrations after a 10 km race. However, after the semi-marathon race (21 km), EPO decreased while sTfR increased. The sTfR increase observed after the 21 km race, although significant, was not clinically relevant and, in accordance with other authors [7, 19, 23], it could be mainly attributed to changes in vascular volume. However, for EPO, taking into account data previously published [5, 10, 17, 19, 20, 25, 29], concentrations are expected not to be modified under the effect of different types of exercise and, in case of changes in vascular volume, exercise-dehydration would have produced the opposite effect. Moreover, taking into account that samples were obtained at the same hour both the previous and the competition day, the difference observed in EPO concentrations in the 21 km race group can not be attributed to circadian rhythm. Therefore, with the information at hand, we could not explain the decrement in EPO concentrations observed after the semi-marathon race (21 km).

In elite athletes, the levels of the studied haematological parameters were within normal ranges [21, 22, 24, 26]. However, in some female elite athletes, Hb levels were in the low limit of normal ranges. Female are not only submitted to exercise- or diet-related changes in their blood and iron metabolism, but also the monthly blood loss through menstruation might lead to a further decrease in the related variables. In male elite athletes, higher Hb values observed in weight lifting group coincide with haematological changes reported for strength-trained sportsmen when compared with endurance-trained athletes [21, 27]. Haematological changes known to be produced by endurance training include decreased Hb, Hct, and red blood cells, associated with an increased number of reticulocytes and increase in plasma volume [22, 24]. Similar seasonal changes in Hb concentrations have been observed in a previous study where national team cyclists showed a 3% decrement between periods of reduced training (winter) and periods of intense training (summer) [24]. For percentage of reticulocytes, we observed differences between sports in baseline conditions. Those differences between sports did not coincide with the type of sport (endurance versus non-endurance athletes), similarly to previous studies [26 Appendix]. In each elite athlete sport group and along the sport season, no difference was observed; this is in agreement with a relatively low “within athlete” variability (21.3%), which also includes the within instrument variation for reticulocytes counts. The

stability observed in the percentage of reticulocytes along the sport season agrees with results described in previous studies after short-term [19] and prolonged endurance exercise [25].

Regarding the detection of rhEPO misuse by indirect methods [8], only one score of the ON hr model (at baseline) was above the thresholds previously described, due to a natural high Hb concentration, the highest Hb concentration value observed (17.7 g/dl). None of the scores of the OFF hr model was above the established threshold; on the contrary, for some female elite athletes, very low individual OFF models scores were obtained. Those female athletes (swimming, baseline; rhythmic gymnastics, training) showed low Hb concentration values, and one of them (rhythmic gymnastics, training) showed the highest EPO and sTfR values recorded (33.6 IU/l and 3.77 mg/l, respectively). After checking the other haematological parameters for those female volunteers (haematocrit, iron and ferritin concentrations), iron deficiencies were presumed.

Variations of scores over time without reaching threshold values were also observed in a previous study after five days of road cycling stage race at sea level [25], which indicates the stability of the indirect method based in second-generation ON/OFF models in front of exercise. Some sport federations prohibit the participation of athletes when one of their haematological parameters (Hb, haematocrit or percentage of reticulocytes), or their combination in the OFF hr model, exceed established cut-offs values. Those safety regulations try to avoid making worse the effects of blood viscosity, natural or induced, with exercise induced haemoconcentration. An additional step in the detection of rhEPO misuse should be detection of the current administration where the analysis of serum markers (such as EPO and sTfR) in combination with Hb and percentage of reticulocytes may contribute to a higher reliability of the screening detection.

In summary, serum biomarkers proposed for indirect detection of rhEPO appear not substantially affected by physical fitness, sport and different training workload during the sport season . Variations observed in mathematical models to detect rhEPO administration were mainly due to fluctuation in haemoglobin concentrations, commonly observed in elite athletes. However, the results herein presented confirm that the intra-individual variability observed along the sport season of the indirect biomarkers studied does not appear to produce a false positive result for rhEPO abuse using the indirect method based in second-generation ON/OFF models in blood.

Acknowledgements

The present work has been supported by Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Sanidad y Consumo de España (Research project n.01/1328) and Progetto N.1039/1 "Tossicodipendenze e Doping" dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia.

References

1. Abellan R, Ventura R, Pichini S, Remacha AF, Pascual JA, Pacifici R, Di Giovannandrea R, Zuccaro P, Segura J. Evaluation of immunoassays for the measurement of erythropoietin (EPO) as an indirect biomarker of recombinant human EPO misuse in sport *J Pharm Biomed Anal* 2004; 35: 1169-1177.
2. Abellan R, Ventura R, Pichini S, Sarda MP, Remacha AF, Pascual JA, Palmi I, Bacosi A, Pacifici R, Zuccaro P, Segura J. Evaluation of immunoassays for the measurement of soluble transferrin receptor (sTfR) as an indirect biomarker of recombinant human erythropoietin misuse in sport. *J Immunol Methods* 2004; 295: 89-99.
3. Allen J, Backstrom KR, Cooper JA, Cooper MC, Detwiler TC, Essex DW, Fritz RP, Means RT, Meier PB, Pearlman SR, Roitman-Johnson B, Seligman PA. Measurement of soluble transferrin receptor in serum of healthy adults. *Clin Chem* 1998; 44: 35-39.
4. Ashenden J, Gore CJ, Parisotto R, Sharpe K, Hopkins WG, Hahn AG. Effect of altitude on second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica* 2003; 88: 1053-1062.
5. Berglund B, Birgegard G, Hemmingsson P. Serum erythropoietin in cross-country skiers. *Med Sci Sports Exerc* 1988; 20: 208-209.
6. Cooper MJ, Zlotkin SH. Day-to-day variation of transferrin receptor in healthy men and women. *Am J Clin Nutr* 1996; 64: 738-742.
7. Deruisseau KC, Roberts LM, Kushnick MR, Evans AM, Austin K, Haymes EM. Iron status of young males and females performing weight-training exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2004; 36: 241-248.
8. Gore C, Parisotto R, Ashenden M, Stray-Gundersen J, Sharpe K, Hopkins W, Emslie KR, Howe C, Trout GJ, Kazlauskas R, Hahn AG. Second-generation blood test to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica* 2003; 88: 333-344.

9. Kargotich S, Goodman C, Keast D, Morton D. The influence of exercise-induced plasma volume changes on the interpretation of biochemical parameters used for monitoring exercise, training and sport. *Sports Med* 1998; 26: 101-117.
10. Klausen T, Breum L, Fogh-Andersen N, Bennet P, Hippe E. The effect of short and long duration exercise on serum erythropoietin concentrations. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1993; 67: 213-217.
11. Maes M, Bosmans E, Scharpe S, Hendriks D, Cooremans W, Neels H, De Meyer F, D'Hondt P, Peeters D. Components of biological variation in serum soluble transferrin receptor: Relationships to serum iron, transferrin and ferritin concentrations, and immune and haematological variables. *Scand J Clin Lab Invest* 1997; 57: 31-41.
12. Malczewska J, Blach W, Stupnicki R. The effects of physical exercise on the concentrations of ferritin and transferrin receptor in plasma of female judoists. *Int J Sports Med* 2000; 21: 175-179.
13. Malczewska J, Stupnicki R, Blach W, Turek-Lepa E. The effects of physical exercise on the concentrations of ferritin and transferrin receptor in plasma of male judoist. *Int J Sports Med* 2004; 25: 516-521.
14. Parisotto R, Gore C, Emslie K, Ashenden M, Brugnara C, Howe C, Martin DT, Trout GJ, Hahn AG. A novel method utilizing markers of altered erythropoiesis for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica* 2000; 85: 564-572.
15. Parisotto R, Ashenden MJ, Gore CJ, Sharpe K, Hopkins W, Hahn AG. The effect of common hematologic abnormalities on the ability of blood models to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica* 2003; 88: 931-940.
16. Raya G, Henny J, Steinmetz J, Herbeth B, Siest G. Soluble transferrin receptor (sTfR): Biological variations and reference limits. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 1162-1168.
17. Remacha AF, Ordoñez J, Barceló MJ, García-Die F, Arza B, Estruch A. Evaluation of erythropoietin in endurance runners. *Haematologica* 1994; 79: 350-352.
18. Roberts D, Smith DJ. Erythropoietin does not demonstrate circadian rhythm in healthy men. *J Appl Physiol* 1996; 80: 847-851.
19. Robinson N, Saugy M, Magin P. Effects of exercise on the secondary blood markers commonly used to suspect erythropoietin doping. *Clin Lab* 2003; 49: 57-62.
20. Schmidt W, Eckardt KU, Hilgendorf A, Strauch S, Bauer C. Effects of maximal and submaximal exercise under normoxic and hypoxic conditions on serum erythropoietin level. *Int J Sports Med* 1991; 12: 457-461.

21. Schumacher YO, Grathwohl D, Barturen JM, Wollenweber M, Heinrich L., Schmid A, Huber G, Keul J. Haemoglobin, haematocrit and red blood cell indices in elite cyclists. Are the control values for blood testing valid? *Int J Sports Med* 2000; 21: 380-385.
22. Schumacher YO, Schmid A, Grathwohl D, Bültermann D, Berg A. Hematological indices and iron status in athletes of various sports and performances. *Med Sci Sports Exerc* 2002; 34: 869-875.
23. Schumacher YO, Schmidt A, Köning D, Berg A. Effects of exercise on soluble transferrin receptor and other variables of the iron status. *Br J Sports Med* 2002; 36: 195-200.
24. Schumacher YO, Jankovits R, Bültermann D, Schmidt A, Berg A. Hematological indices in elite cyclists. *Scand J Med Sci Sports* 2002; 12: 301-308.
25. Schumacher YO, Temme J, Bueltermann D, Schmidt A, Berg A. The influence of exercise on serum markers of altered erythropoiesis and the indirect detection models of recombinant human erythropoietin abuse athletes. *Haematologica* 2003; 88: 712-714.
26. Sharpe K, Hopkins W, Emslie KR, Howe C, Trout GJ, Kazlauskas R, Ashenden MJ, Gore CJ, Parisotto R, Hahn AG. Development of reference ranges in elite athletes for markers of altered erythropoiesis. *Haematologica* 2002; 87: 1248-1257.
27. Shaskey DJ, Green GA. Sports haematology. *Sports Med* 2000; 29: 27-38.
28. Virtanen MA, Viinikka LU, Virtanen MKG, Svahn JCE, Anttila RM, Krusius T, Cook JD, Axelsson IEM, Raiha NCR, Siimes MA. Higher concentrations of serum transferrin in children than adults. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 256-260.
29. Weight LM, Alexander D, Elliot T, Jacobs P. Erythropoietic adaptations to endurance training. *Appl Physiol Occup Physiol* 1992; 64: 444-448.

Table 1. Anthropometric and physiological characteristics of the studied subjects (mean \pm SD).

	N (♂/♀)	Age (yr)	Height (cm)	BMI	Training (h/week)	Sample collection
Recreational	10 ♂/ 11 ♀	23 \pm 5	170 \pm 10 ²	22.2 \pm 2.2	5 - 8	9 and 17 h
Recreational race 10 km	99 ♂	23 \pm 3	182 \pm 5 ^{1,4}	21.7 \pm 1.3	10	• Pre race • Post race
Recreational race 21 km	30 ♂	39 \pm 6 ⁴	-	-	-	• Pre race • Post race • Basal
Elite athletes	59 ♂/ 36 ♀	22 \pm 5 ³	173 \pm 8 ²	21.9 \pm 3.3	7 - 35	• Training • Competition
Swimming	3 ♂/ 9 ♀	18 \pm 2 ^{6,9,10}	175 \pm 7 ⁷	20.8 \pm 1.3 ^{8,10,11}	Up to 35	• Basal • Training • Competition
Synchronized swimming	14 ♀	23 \pm 3 ^{5,8}	170 \pm 6	20.6 \pm 1.0 ^{8,10,11}	Up to 25	• Basal • Training • Basal
Tae kwon do	10 ♂/ 6 ♀	21 \pm 4 ^{9,10}	175 \pm 10 ⁸	21.6 \pm 1.9 ^{8,11}	Up to 20	• Training • Competition • Basal
Rhythmic gymnastics	6 ♀	16 \pm 4 ^{6,9,10}	162 \pm 5 ^{5,7,10,11}	16.4 \pm 1.0 ^{5,6,7,10,11}	Up to 35	• Training • Basal
Soccer	18 ♂	26 \pm 4 ^{5,7,8,11}	-	-	Up to 30	• Basal
Triathlon	16 ♂	27 \pm 6 ^{5,7,8,11}	177 \pm 4 ⁸	23.5 \pm 1.3 ^{5,6,8}	Up to 25	• Basal • Basal
Weight lifting	12 ♂/ 1 ♀	22 \pm 5 ^{9,10}	173 \pm 8 ⁸	25.6 \pm 4.9 ^{5,6,7,8}	Up to 14	• Training • Competition

BMI: Body mass index, measured as $\frac{\text{Weight}}{\left(\frac{\text{Height}}{100}\right)^2}$, weight measured in kg and height in cm.

Significantly different ($p < 0.05$) from: ¹ Recreational; ² Recreational 10 km race; ³ Recreational 21 km race; ⁴ Elite athletes; ⁵ Swimming; ⁶ Synchronized swimming; ⁷ Tae kwon do; ⁸ Rhythmic gymnastics; ⁹ Soccer; ¹⁰ Triathlon; ¹¹ Weight lifting.

Table 2. Seasonal changes in erythropoietic serum markers and haematological variables in elite athletes. Values are mean \pm SD (N).

Group	Time	EPO (IU/l)	sTfR (mg/l)	Hb (g/dl)		Retis (%)
		♂/♀	♂/♀	♂	♀	♂/♀
Swimming	B	14.8 \pm 6.3 ⁶ (10)	1.4 \pm 0.2 (10)	15.1 \pm 1.4 ⁴ (3)	12.7 \pm 0.7 (7)	2.02 \pm 0.58 ^{2,4,5,6} (10)
	T	10.9 \pm 1.8 (6)	1.4 \pm 0.1 (7)	-	12.9 \pm 0.6 (6)	1.39 \pm 0.13 (7)
	C	11.8 \pm 3.7 (11)	1.6 \pm 0.3 (11)	15.0 \pm 1.0 (3)	13.4 \pm 0.8 (8)	1.40 \pm 0.21 (11)
Synchronized Swimming	B	10.1 \pm 3.4 (14)	1.43 \pm 0.25 (10)	-	12.8 \pm 0.7 (12)	1.42 \pm 0.31 ^{1,4,5} (12)
	T	10.2 \pm 4.4 (12)	1.40 \pm 0.14 (7)	-	12.4 \pm 0.8 * (12)	1.18 \pm 0.27 (12)
Tae kwon do	B	11.2 \pm 3.7 (16)	1.58 \pm 0.26 (11)	14.3 \pm 0.9 ⁷ (10)	13.3 \pm 0.7 (6)	1.69 \pm 0.36 ^{4,5} (15)
	T	9.8 \pm 2.1 (16)	1.53 \pm 0.43 (14)	-	-	-
	C	9.9 \pm 4.6 (16)	1.40 \pm 0.37 (12)	-	-	-
Rhythmic Gymnastics	B	10.8 \pm 2.7 (6)	1.66 \pm 0.34 (16)	-	-	-
	T	14.4 \pm 10.9 (5)	1.63 \pm 0.30 (16)	-	12.8 \pm 1.2 (5)	1.32 \pm 0.21 (4)
Soccer	B	11.4 \pm 2.8 (13)	1.61 \pm 0.25 (16)	13.7 \pm 0.6 ^{1,5,6} (18)	-	0.95 \pm 0.17 ^{1,2,3,6} (18)
Triathlon	B	12.6 \pm 4.3 (16)	1.67 \pm 0.27 (6)	15.0 \pm 0.9 ⁴ (16)	-	0.81 \pm 0.19 ^{1,2,3,6} (16)
Weight lifting	B	8.7 \pm 3.5 ¹ (11)	2.06 \pm 0.97 (5)	15.5 \pm 0.6 ^{3,4} (10)	-	1.50 \pm 0.52 ^{1,4,5} (11)
	T	11.5 \pm 3.1 (9)	1.46 \pm 0.33 (7)	14.4 \pm 0.6 (8)	-	1.19 \pm 0.24 (9)
	C	10.1 \pm 2.6 (9)	1.51 \pm 0.13 (16)	14.8 \pm 0.9 (8)	-	1.19 \pm 0.41 (9)

Abbreviators: B, baseline; T, training; C, competition; % Retis, percentage of reticulocytes.

Significantly different ($p < 0.05$) from: ¹ Swimming; ² Synchronized Swimming; ³ Tae kwon do; ⁴ Football;

⁵ Triathlon; ⁶ Weight lifting; * Baseline concentrations.

Table 3. Mean and standard deviations (SD), 95% intervals of confidence and intervals of tolerance in baseline conditions, and “within athlete” variability along the sport season for erythropoietic serum markers and haematological variables in elite athletes.

	EPO (IU/l)	sTfR (mg/l)	Hb (g/dl)		Retis (%)
	♂/♀	♂/♀	♂	♀	♂/♀
Mean ± SD (N) in baseline conditions	11.4±4.2 (86)	1.55±0.29 (80)	14.5±1.0 (57)	12.9±0.7 (26)	1.33±0.54 (82)
95% interval of confidence in baseline conditions	10.5-12.3	1.49-1.62	14.3-14.8	12.6-13.2	1.21-1.45
Interval of tolerance in baseline conditions	3.5-19.3	1.00-2.11	12.5-16.6	11.3-14.5	0.30-2.36
“Within athlete” variability along the sport season	26.1%	9.0%	3.7%		21.3%

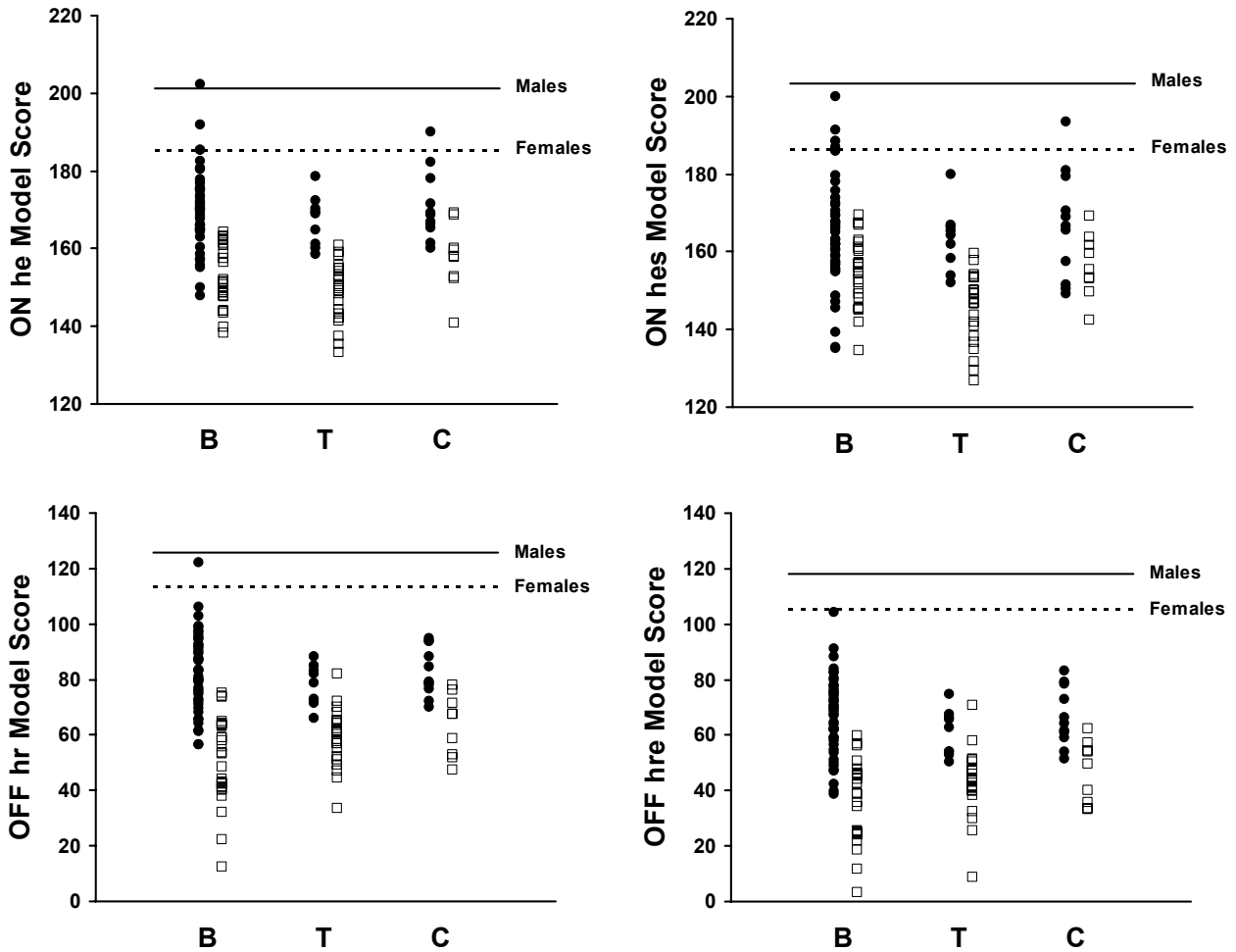
Abbreviators: % Retis, percentage of reticulocytes.

Table 4. EPO and sTfR serum concentrations in pre and post long-distance race conditions in recreational athletes. Values are mean ± SD.

Group	Time	EPO (IU/l)	sTfR (mg/l)
10 km race	Pre	9.0±4.0	1.5±0.4
	Post	12.9±5.4	1.5±0.4
21 km race	Pre	14.5±4.4	1.5±0.4
	Post	11.7±3.9 *	1.6±0.3 *

Significantly different ($p < 0.05$) from: * Pre-race concentrations.

Figure 1: Plot of individual scores for the two ON and two OFF models over the sport season.



Footnote: The lines represent the threshold values corresponding to selected false-positive rates for worst-case male (solid lines) and female (dashed lines) endurance athletes at sea level (1 in 100 for the ON models and 1 in 1000 for the OFF models) defined by Gore C. et al. [8]. Empty squares represent female individual scores; full circles represent male individual scores.

Physiology & Biochemistry

Effect of physical fitness and endurance exercise on indirect biomarkers of recombinant growth hormone misuse: Insulin-like growth factor I and procollagen type III peptide

R. Abellan^{1,2}, R. Ventura^{1,2}, S. Pichini³, R. Di Giovannandrea³, M. Bellver⁴, R. Olive⁴, R. Pacifici³, J. A. Pascual^{1,2}, P. Zuccaro³, J. Segura^{1,2}.

¹Pharmacology Research Unit, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Barcelona, Spain;

²Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona,

Spain; ³Drug Research and Evaluation Department, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italy;

⁴Centre d'Alt Rendiment, Sant Cugat, Barcelona, Spain.

Corresponding author:

Jordi Segura, PhD

Pharmacology Research Unit,

Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM)

Doctor Aiguader 80, E-08003 Barcelona, Spain

Telephone +34-93-2211009, fax +34-93-2213237, e-mail: jsegura@imim.es

Running title: Exercise effects on serum IGF-I and P-III-P.

ABSTRACT

Serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) and procollagen type III peptide (P-III-P) have been proposed as indirect biomarkers of rhGH misuse in sport. The purpose of the present study was to investigate concentrations of these biomarkers in athletes at different levels of physical fitness and endurance exercise.

Serum total IGF-I and P-III-P were measured in 96 elite athletes of various sports along the training season; in 21 recreational athletes at baseline non-exercising conditions and in other 129 recreational athletes before and after long-distance races (10 and 21 km).

No differences were evidenced for IGF-I concentrations, but statistically higher values of serum P-III-P were found in elite athletes compared to recreational ones. Among elite athletes, the specific sport did not affect serum IGF-I. However, P-III-P was statistically higher in the sport performed by the youngest athletes (rhythmic gymnastics), even after correction of the logarithm of the concentration by the reciprocal of age. Over the training season, the within-athlete variabilities of IGF-I and P-III-P in elite athletes were low (22.8% and 21.7%, respectively). Recreational athletes taking part in a 21 km competition race showed a significant increase in serum values of IGF-I and P-III-P immediately after the event.

Exercise workload and age had a significant effect on serum concentration of P-III-P, while age alone affected IGF-I serum concentrations. Therefore, athlete's reference concentration ranges for doping detection should include subjects from as many different ages and sports as possible.

Keywords: IGF-I, P-III-P, athletes, GH doping detection, training.

INTRODUCTION

The abuse of recombinant human growth hormone (rhGH) and other artificial stimulants of the GH axis (e.g., insulin-like growth factor-I, growth hormone secretagogues) to improve physical performance is nowadays a major concern in sports. In this context, the International Olympic Committee (IOC), the World Anti-Doping Agency (WADA) as well as major sports authorities have banned the use of those substances by athletes. However, the search for a reliable and feasible detection of such abuse is still a challenge for investigators involved in this field.

Different methods to detect rhGH misuse have been proposed including the measurement of indirect rhGH biomarkers. A large multicenter study by the consortium GH2000 [17, 37, 38], showed, in a group of trained adult males, that the best discrimination between GH exogenous administration and placebo was obtained considering serum concentration of total insulin-like growth factor-I (IGF-I) and procollagen type III peptide (P-III-P). Recently, a similar approximation to detect exogenous rhGH administration, carried out in male athletes from different sports, has been presented in a preliminary study which combined those two biomarkers, together with telopeptide type I collagen [26].

The two indirect biomarkers selected, although having different metabolism, are regulated by GH. IGF-I is a polypeptide hormone produced in many tissues which is considered the major mediator of GH action. IGF-I itself presents, among others, insulin-like effects (hypoglycemic and some antilipolytic), mitogenic actions, and anabolic effects (increase protein synthesis) [39]. P-III-P is the N-terminal extension fragment of procollagen type III, the biosynthetic precursor of collagen type III fibers. Serum concentrations of P-III-P not only reflect the rate of synthesis of collagen type III but its degradation also as, occasionally, P-III-P cleavage from the new procollagen molecules is not completely removed and the peptide will remain linked until degradation [7].

Different population reference ranges have been described for human serum IGF-I and P-III-P concentrations: ranging from 100 to 800 ng/mL for IGF-I [5, 12] and, 1.5-4.5 ng/mL or 0.3-0.8 U/mL for P-III-P [23, 38]. The reason for such wide ranges not only resides in the fact that serum concentrations of IGF-I and P-III-P are influenced by population characteristics (age, pubertal growth, nutritional status and disease) [5, 12, 23, 32] but also because of the use of different immunoassays and different standards for calibration that makes the comparability of results difficult [1, 22, 23, 38]. Moreover, in the case of athletes, it has to be considered that exercise itself influences the GH system [11], and those physiologic responses to exercise might be confused with changes caused by artificially stimulated GH axis.

Recent publications have studied the physiological range of these GH-dependent variables in elite athletes in basal conditions [6, 27] and after a competitive event [9]. Besides, many studies have attempted to describe how physical exercise affects IGF-I and P-III-P serum concentrations after a short-term [3, 4, 6, 20, 29, 36-38], long-term exercise [10, 15, 19, 33-35] and under continuous training [2, 16, 18, 24]. However, contradictory results have been reported probably due to differences in exercise duration and severity, individual nutritional and hormonal status, and technical differences in assay protocols [10]. Therefore, further investigation in this sense is needed before evaluating the significance of results of indirect tests for GH detection done in athletes during training and competitions.

In this context, the present study aimed to evaluate serum concentrations of IGF-I and P-III-P in athletes of different levels of performance, in different moments of the training and competing season and from sports involving different type of exercise.

DESING AND METHODS

Subjects and study design

A total of 246 healthy Caucasian subjects (200 males and 46 females) participated in the study. All participants completed a detailed questionnaire assessing physical activity, sport practice, weekly training workload, smoking, use of drugs, iron or other dietary supplementation, and underwent a complete medical revision.

Subjects were excluded from the study if they reported endocrine disorders, recent or chronic history of disease, if they had received a blood transfusion during the previous month, or admitted to the use of GH, IGF-I, erythropoietin or any substance known to have anabolic effects.

Subjects were informed and gave written consent to participate in the study, which was approved by the Instituto Municipal de Asistencia Sanitaria Ethic Committee of Clinical Research (CEIC/IMAS n°. 2000/1145/I) and was conducted in accordance with the Helsinki Declaration.

Subjects were divided in two different main groups: elite athletes (members of sport federations, national and international sporting squads), and recreational athletes (subjects regularly practicing low intensity sport in the last five years and not belonging to any sports organization). Elite athletes participated in different sports (swimming, synchronized swimming, tae kwon do, rhythmic gymnastics, soccer, triathlon, and weight lifting). A detailed description of the subjects is given in Table 1.

To look for an eventual effect of time of blood collection, two blood samples were collected in recreational athletes at baseline (non-exercising) the same day, at 9:00 hours (in fasting conditions) and 17:00 hours (in non-fasting conditions).

To study the effect of strenuous prolonged physical exercise, blood samples from two groups of male recreational athletes were collected. A group of 99 males performed a 10 km race (around 45-50 min), and blood samples were obtained before and immediately after the race. Another group of 30 males performed a semi-marathon race (21 km) (around 1 h 50 min), and blood samples were obtained the day before the race, and immediately after the race.

To study the effects of physical fitness on serum concentration of both total IGF-I and P-III-P, blood samples were obtained at baseline in recreational (non-exercising) and elite athletes (end of the vacation period when subjects did not practice their usual training).

Finally, to study the effect of specific type of exercise and different training workloads in elite athletes, blood samples from athletes of different sports were collected in three different occasions during the training season: at the beginning of the season when training workload was minimal (baseline), in the middle of training preparation when training workload was at a mean level (training), and immediately after the first competition when training workload was maximum (competition). Unfortunately, samples were not available on some of the occasions due to the inherent difficulties to collect samples from elite athletes, especially after competition. Subjects for which samples were collected in each situation are listed in Table 1.

Sample analysis

Blood samples were centrifuged immediately after collection, and serum was separated and stored at -80°C until analysis. Total (bound and unbound) serum IGF-I was measured using an immunosorbent enzyme-linked assay (ELISA: Quantikine Human IGF-I Immunoassay from R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), with previous acid dissociation from IGF binding proteins. The ELISA was evaluated using two levels of controls (mean 60 and 180 ng/mL), the within-assay CVs were 5.7 and 7.2%, and between-assay CVs were 7.2 and 10.9%, respectively. Serum P-III-P was measured using a competitive radioimmunoassay (RIA: Intact PIIINP RIA kit from Orion Diagnostica, Espoo, Finland). The RIA reliability was evaluated using two levels of controls (mean 5.0 and 6.6 ng/mL), the within-assay CVs were 5.8 and 11.3%, and between-assay CVs were 6.9 and 7.7%, respectively. The complete validation of both immunoassays for doping purposes has been already published elsewhere [1].

Statistical analysis

Mean and standard deviation were calculated for each biomarker in the different groups studied. Individual coefficient of variation (defined herein as the measure of the “within-athlete” variability of the marker in different situations) was also calculated.

Multifactor analysis of variance (ANOVA) and post-hoc Student's *t*-test were carried out using the statistical package SPSS 2001 for Windows, version 11.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Biomarkers' bivariate correlation was calculated using Pearson's coefficient of correlation for bilateral signification. P-values < 0.05 were considered to be statistically significant.

Several mathematical equations were tested to relate the concentrations of the markers to the age of the subjects. Best fitting was obtained for the linear regression of the logarithm of concentration and the reciprocal of the age. Upper and lower predicted limits of confidence for a 95% range were determined.

RESULTS

A preliminary investigation was performed to verify a possible effect of gender in baseline serum concentrations of IGF-I and P-III-P in athletes. Since no statistical difference by gender was found in any of the study groups, subsequent statistical analysis was executed considering male and female subjects together.

Moreover, analysis of variance showed that age was the single most important factor for both biomarkers (Figures 1A and 2A). Therefore, the relationship between age and each of the markers was determined, and it was found that linear relation between the logarithm of the markers and the reciprocal of the age was the best relationship.

Anthropometrical and physiological data

Anthropometrical and physiological data of both recreational and elite athletes are summarized in Table 1. Considering the different sports, the elite athletes of rhythmic gymnastics group were the youngest and the soccer and triathlon ones were the oldest.

Factors affecting IGF-I concentrations

No significant differences were observed in baseline concentrations of serum IGF-I between recreational and elite athletes (170.2 ± 42.2 and 166.4 ± 58.8 ng/ml, respectively); or, in

recreational athletes, due to time of blood collection (170.2 ± 42.2 and 166.3 ± 42.0 ng/ml at 9 and 17 h, respectively).

In elite athletes, the specific sport practiced did not significantly affect serum IGF-I neither at baseline nor after competition (Table 2). In both situations, non-statistical divergence in IGF-I serum concentrations between the different sports might be explained by differences in the age between athletes ($p < 0.001$). When comparing values during training in different sports, significant lower values were observed for synchronized swimming than for tae kwon do or rhythmic gymnastics (Table 2).

Within the same sport, significant differences were observed for synchronized swimming and rhythmic gymnastics in training conditions, and for tae kwon do in competition conditions, as compared with respective baseline values (Table 2); however, these variations did not show the same trend. Taking all the athletes as a whole, the “within-athlete” coefficient of variation was relatively low for IGF-I (22.8%) as compared with baseline situation.

The correlation between the logarithm of IGF-I concentrations and the reciprocal of the age is presented in Figure 1A ($r^2 = 0.303$, $p < 0.001$). The residuals of the IGF-I concentrations of the different sports showed no differences from 0, indicating that variability between groups could be explained by the age (Figure 1B).

When the short-term effect of the endurance exercise (10 and 21 km races) was studied on the IGF-I serum concentration, significant higher values were only observed for recreational athletes in post 21 km race conditions (129.1 ± 35.0 and 141.8 ± 35.6 pre and post conditions, respectively); while no statistical differences were observed for the recreational athletes in post 10 km race conditions (156.4 ± 40.6 and 164.1 ± 37.5 pre and post conditions, respectively).

Factors affecting P-III-P concentrations

Baseline concentrations of serum P-III-P in elite athletes were statistically higher compared to concentrations in recreational athletes (5.4 ± 2.7 and 3.8 ± 0.9 ng/ml, respectively); these differences were significantly influenced by age ($p < 0.001$) and physical fitness ($p < 0.05$). In recreational athletes, no differences in P-III-P serum levels were observed due to different time of blood collection (3.8 ± 0.9 and 3.6 ± 0.9 ng/ml at 9 and 17 h, respectively).

Within elite athletes, significant differences were observed between different sports in baseline conditions (Table 3). These differences might be explained by the age ($p < 0.05$) and, in the case of rhythmic gymnastics, also by the sport ($p < 0.001$).

The correlation between the logarithm of the serum concentrations of P-III-P and the reciprocal of the age is presented in Figure 2A ($r^2=0.320$, $p<0.001$). After adjustment for age, the residuals for rhythmic gymnastics were different from 0, indicating some effect of the sport (Figure 2B) or the need of a specific different mathematical function to correct for the age in young gymnasts.

Regarding the effects of different training workload during sport season, differences with baseline situation were only observed for synchronized swimming. The “within-athlete” coefficients of variation were relatively low for P-III-P (21.7%) over the training season.

Similarly to IGF-I, significant higher values of P-III-P serum concentrations were only observed in recreational athletes at post race 21 km conditions (3.3 ± 1.0 and 4.3 ± 1.0 pre and post conditions, respectively); but not for the recreational athletes in post 10 km race conditions (4.1 ± 1.1 and 4.2 ± 1.1 pre and post conditions, respectively).

Finally, a significant correlation was observed between IGF-I and P-III-P taking all recreational and elite athletes as a whole (Pearson’s correlation = 0.409, $p<0.01$).

DISCUSSION

The biomarkers proposed to indirectly detect rhGH misuse in athletes (IGF-I and P-III-P) are known to be potentially confounded by numerous factors including physical fitness, specific type of exercise and training workloads among different sports. Consequently, differentiating between the fluctuations associated with exposure to such influences, and the atypical variations of these parameters caused by rhGH or other stimulants of the GH axis use can be of importance.

In the present study, no statistical differences in IGF-I and P-III-P concentrations were observed related with the gender of the studied subjects, in agreement with data reported by other authors [12, 23, 27].

Serum concentration ranges of IGF-I found in our subjects, its decrease in relation to older age and the lack of influence observed by time of blood collection were consistent with those described in previous studies for population groups of similar age, gender and physical activity [5, 6, 9, 12, 27, 30, 32].

Controversial results have been described in previous studies on the effect of chronic exercise on IGF-I levels [2, 16, 18, 24]. Although some studies described higher IGF-I levels in trained subjects compared to sedentaries [24, 31], chronic exercise did not always increase serum IGF-I concentrations, and those changes were less extensive in well-trained subjects compared to untrained subjects [24]. Besides, in intense training when expenditure of energy exceeded

energy intake, this caloric restriction can cause an IGF-I decrease in the systemic circulation [21]. The data here presented indicate that, in our hands, physical fitness and specific type of exercise in different sports did not substantially affect IGF-I serum values, and although significant variations were observed along the training season in some sports, these concentrations were within normal population ranges described for same age classes in previous studies [5, 6, 9, 12, 27] and showed a no uniform trend.

When studying acute endurance exercise (10 and 21 km races), contradictory results were obtained. While no differences were observed for a 10 km running race, a significant increase in serum IGF-I was observed for a 21 km race. In the literature, the variability of acute exercise-induced IGF-I changes has been attributed to the different exercise protocols used. Different type and duration of the performances, and training workload seems to be determinant in GH/IGF-I axis responses. Several studies have reported an acute rise in serum IGF-I that occurs within 10-30 min of the onset of exercise [3, 4, 6, 29], and which appears to be dependent on the exercise intensity, but independent of the rise in GH [3, 29]. On the other hand, studies of long-term endurance exercise have been unable to demonstrate any change in serum IGF-I [10, 15, 20] or have observed a decrease dependent from the exercise duration [18, 33]. The decrease is usually related to the physiological adaptation to prolonged exercise by the inhibition of IGF-I insulin-like effects. In our investigation, the 10% increment observed after nearly 2 hours of competitive race could be due to the hemoconcentration produced by extreme exercise, where increments around this range have been described when measuring biochemical parameters in plasma [13].

For P-III-P, in accordance with other authors [25], no differences were observed for different times of blood collection. In contrast to IGF-I, significantly higher serum P-III-P concentrations were observed at baseline for elite athletes compared with recreational ones, although mean age was comparable between groups. Taking into account the different sports, rhythmic gymnastics showed significant differences in P-III-P values as compared to the rest of sports. Although the rhythmic gymnastics group was the youngest studied and age could be the main responsible for the difference [23], it can not be excluded that higher values observed could be related with the increment of serum P-III-P levels occurring during gymnastic training events because of the degradation of collagen type III in soft tissues [7]. The impossibility of finding elite athletes from a wide range of age in all the sports studied, due to the intrinsic characteristics of such population, made difficult to disclose the total effect of age. On the other hand, no significant increment was observed for P-III-P serum concentrations during the training season in the different sports (including rhythmic gymnastics), and a decrease was observed in all sports although it was statistically significant only for the synchronized swimming group. In

previous studies, training has been related with increments in plasma volumes and the subsequent decrement in biochemical parameters [28].

In recreational athletes group, a significant difference between pre and post 21 km race value was observed for P-III-P serum concentration, but not for the 10 km race. The increment observed (30%) appears too high to be only due to haemoconcentration, as it could be in the case of IGF-I. There are few studies describing how exercise affects serum P-III-P concentrations. After an acute high-intensity bout of exercise, no differences were observed [36]; however, increments of P-III-P have been reported after acute exercise of around 30min, and values returned quickly to baseline levels [6, 38]. On the other hand, for long-term exercise, P-III-P increased after the termination of a 24-h run [34], but not after a less intensive 24-h skiing relay with turns of 30-40min [35]. Therefore, it appears that intensity and duration of exercise determines the response of P-III-P, and only after a very exhausting physical exercise, as the long-term exercise of 21 km race, significant increments of P-III-P could be observed.

Concentrations for the markers studied here have shown to be dependent on immunoassays used [1, 22, 23, 38]. Nonetheless, data from a previous extended validation of the immunoassays herein used [1] allowed a comparison of the reference ranges obtained with those obtained in a recent study with elite athletes [27], and they showed to be comparable for both biomarkers. In the cases where the correlation between assays is known, a conversion should be performed in order to compare concentration ranges for normal population.

Changes in serum IGF-I and P-III-P concentrations after exercise can be also compared with those described after rhGH administration [17, 37, 38]. Increments in serum concentration of the two biomarkers after rhGH administration observed in those studies were always higher than after an acute exercise. Although, as mentioned below, the direct correlation between values obtained with different immunoassays has some limitations, the values observed for both biomarkers in the population herein studied do not overlap those observed after rhGH administration [8, 14, 17] even after 96 h post administration [17, 37, 38]. Therefore, clear distinction of biomarkers after rhGH abuse from normal exercise situation appears feasible. Nevertheless, the results presented here only can be applicable in the context of the studied Caucasian athlete's population. Although a previous study, performed in elite athletes from different ethnical origins (Caucasian and Black population), showed no differences for the two biomarkers under investigation [9], further research is needed to evaluate the sensitivity of other ethnic groups to exogenous rhGH administration.

In summary, while physical fitness itself had no significant effect on serum concentration of IGF-I, for P-III-P higher serum concentrations were observed in elite athletes compared to recreational ones. Moreover, differences in P-III-P serum levels among elite athletes from

different sports were maintained even after correction by age. Since those influencing factors (training workload and age) would not be known in all cases, athlete's reference concentration ranges for doping detection should include as many athletes from different ages and sports as possible.

Acknowledgements

The present work has been supported by Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Sanidad y Consumo de España (Research project n.01/1328) and Progetto N.1039/1 "Tossicodipendenze e Doping" dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia.

References

1. Abellan R, Ventura R, Pichini S, Pascual JA, Pacifici R, Di Carlo S, Bacosi A, Segura J, Zuccaro P. Evaluation of immunoassays for the measurement of insulin-like growth factor-I and procollagen type III peptide, indirect biomarkers of recombinant human growth hormone misuse in sport. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 75-85.
2. Borst SE, De Hoyos DV, Garzarella L, Vincent K, Pollock BH, Lowenthal DT, Pollock ML. Effects of resistance training on insulin-like factor-I and IGF binding proteins. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33: 648-653.
3. Cappon J, Brasel JA, Mohan S, Cooper DM. Effect of brief exercise on circulating insulin-like growth factor. *J Appl Physiol* 1994; 76: 2490-2496.
4. Dall R, Lange KHW, Kjaer M, Jorgensen JOL, Christiansen JS, Orskov H, Flyvbjerg A. No evidence of insulin-like growth factor-binding protein 3 proteolysis during a maximal exercise test in elite athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 669-674.
5. De Palo EF, Gatti R, Lancerin F, Cappelin E, Spinella P. Correlations of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor I (IGF-I): effects of exercise and abuse by athletes. *Clin Chim Acta* 2001; 305: 1-17.
6. Ehrnborg C, Lange KHW, Dall R, Christiansen JS, Lundberg P-A, Baxter RC, Boroujerdi MA, Bengtsson B-A, Healy M-L, Pentecost C, Longobardi S, Napoli R, Rosen T. The growth hormone/insulin-like growth factor-I axis hormones and bone markers in elite athletes in response to a maximum exercise test. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88, 394-401.

7. Fleischmajer R, Perlish JS, Burgeson RE, Shaikh-Bahai F, Timpl R. Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis. *Ann NY Acad Sci* 1990; 580, 161-175.
8. Ghigo E, Aimaretti G, Maccario M, Fanciulli G, Arvat E, Minuto F, Giordano G, Delitala G, Camanni F. Dose-response study of GH effects on circulating IGF-I and IGFBP-3 levels in healthy young men and women. *Am J Physiol* 1999; (Endocrinol Metab 39): E1009-E1013.
9. Healy M-L, Dall R, Gibney J, Basset E, Ehrnborg C, Pentecost C, Rosen T, Cittadini A, Baxter RC, Sonksen PH. Towards the development of a test for growth hormone abuse. Study of extreme physiological ranges of growth hormone dependent markers in 813 elite athletes in the post-competition setting. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 641-649.
10. Jahreis G, Hesse V, Schmidt HE, Scheibe J. Effect of endurance exercise on somatomedin-C/insulin-like growth factor I concentration in male and female runners. *Exp Clin Endocrinol* 1989; 94: 89-96.
11. Jenkins PJ. Growth hormone and exercise: physiology, use and abuse. *GH IGF Res* 2001; Suppl A, S71-S77.
12. Juul A, Bang P, Hertel NT, Main K, Dalgaard P, Jorgensen K, Muller J, Hall K, Skakkebaek NE. Serum insulin-like growth factor in 1030 healthy children, adolescents, and adults: Relation to age, sex, stage of puberty, testicular size, and body mass index. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 744-752.
13. Kargotich S, Goodman C, Keast D, Morton D. The influence of exercise-induced plasma volume changes on the interpretation of biochemical parameters used for monitoring exercise, training and sport. *Sports Med* 1998; 26: 101-117.
14. Kicman AT, Miell JP, Teale JD, Powrie J, Wood PJ, Laidler P, Milligan PJ, Cowan DA. Serum IGF-I and IGF binding proteins 2 and 3 as potential markers of doping with human GH. *Clin Endocrinol* 1997; 47: 43-50.
15. Koistinen H, Koistinen R, Selenius L, Ylikorkala O, Seppala M. Effect of marathon run on serum IGF-I and IGF-binding protein 1 and 3 levels. *J Appl Physiol* 1996; 80: 760-764.
16. Koziris LP, Hickson RC, Chatterton RT, Groseth RT, Christie JM, Goldflies DG, Unterman TG. Serum levels of total and free IGF-I and IGFBP-3 are increased and maintained in long-term training. *J Appl Physiol* 1999; 86: 1436-1442.
17. Longobardi S, Keay N, Ehrnborg C, Cittadini A, Rosen T, Dall R, Boroujerdi MA, Bassett EE, Healy ML, Pentecost C, Wallace JD, Powrie J, Jorgensen JO, Sacca L. Growth hormone (GH) effects on bone and collagen turnover in healthy adults and its potential as a marker of

- GH abuse in sports: a double blind, placebo-controlled study. The GH-2000 Study Group. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1505-1512.
18. Marx JO, Ratamess NA, Nindl BC, Gotshalk LA, Volek JS, Dohi K, Bush JA, Gomez AL, Mazzetti SA, Fleck SJ, Häkkinen K, Newton RU, Kraemer J. Low-volume circuit versus high-volume periodized resistance training in women. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33: 635-643.
 19. Nguyen UN, Mouglin F, Simon-Rigaud ML, Rouillon JD, Marguet P, Regnard J. Influence of exercise duration on serum insulin-like growth factor and its binding proteins. *Eur J Appl Physiol* 1998; 78: 533-537.
 20. Nindl BC, Kraemer WJ, Marx JO, Arciero PJ, Dohi K, Kellogg MD, Loomis GA. Overnight responses of the circulating IGF-I system after acute, heavy-resistance exercise. *J Appl Physiol* 2001; 90: 1319-1326.
 21. Nindl BC, Castellani JW, Young AJ, Patton JF, Khosravi MJ, Diamandi A, Montain SJ. Differential responses of IGF-I molecular complexes to military operational field training. *J Appl Physiol* 2003; 95: 1083-1089.
 22. Quarmby V, Quan C, Ling V, Compton P, Canova-Davis E. How much insulin-like growth factor I (IGF-I) circulates? Impact of standarization on IGF-I assay accuracy. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1211-1216.
 23. Risteli J, Niemi S, Trivedi P, Mäentausta O, Mowat AP, Risteli L. Rapid equilibrium radioimmunoassay for the amino-terminal propeptide of human type III procollagen. *Clin Chem* 1988; 34: 715-718.
 24. Rosendal L, Langberg H, Flyvbjerg A, Frystyk J, Orskov H, Kjaer M. Physical capacity influences the response of insulin-like growth factor and its binding proteins to training. *J Appl Physiol* 2002; 93: 1669-1675.
 25. Saggese G, Baroncelli GI, Bertollini S, Cinquanta L, DiNero G. Twenty-four-hour osteocalcin, carboxyterminal propeptide of type I procollagen, and aminoterminal propeptide of type III procollagen rhythms in normal and growth-retarded children. *Pediatr Res* 1994; 35: 409-415.
 26. Sartorio A, Agosti F, Marazzi N, Maffiuletti NA, Cella SG, Rigamonti AE, Guidetti L, Di Luigi L, Muller EE. Combined evaluation of resting IGF-I, N-terminal propeptide of type III procollagen (PIIINP) and C-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen (ICTP) levels might be useful for detecting inappropriate GH administration in athletes: a preliminary report. *Clin Endocrinol* 2004; 61, 487-493.

27. Sartorio A, Marazzi N, Agosti F, Faglia G, Corradini C, De Palo E, Cella SG, Rigamonti AE, Muller EE. Elite volunteer athletes of different sport disciplines may have elevated baseline GH levels divorced from unaltered levels of both IGF-I and GH-dependent bone and collagen markers: A study on-the-field. *J Endocrinol Invest* 2004; 27, 410-415.
28. Schumacher YO, Jankovits R, Bültermann D, Schmidt A, Berg A. Hematological indices in elite cyclists. *Scand J Med Sci Sports* 2002; 12: 301-308
29. Schwarz AJ, Brasel JA, Hintz RL, Mohan S, Cooper DM. Acute effect of brief low- and high-intensity exercise on circulating insulin-like growth factor (IGF) I, II, and IGF-binding protein-3 and its proteolysis in young healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3492-3497.
30. Skjaerbaek C, Frystyk J, Kaal A, Laursen T, Moller J, Weeke J, Jorgensen JOL, Christiansen JS, Orskov H. Circadian variation in serum free and total insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II in untreated and treated acromegaly and growth hormone deficiency. *Clin Endocrinol* 2000; 52: 25-33.
31. Snow CM, Rosen CJ, Robinson TL. Serum IGF-I is higher in gymnasts than runners and predicts bone and lean mass. *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32: 1902-1907.
32. Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Wu Z, Morrison KM. Normal values of insulin-like growth factor I and their clinical utility in adults. *Horm Res* 2001; 55: 100-105.
33. Suikkari A-M, Sane T, Seppala M, Yki-Jarvinen H, Karonen S-L, Koivisto VA. Prolonged exercise increases serum insulin-like growth factor-binding protein concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68: 141-144.
34. Takala TES, Vuori J, Anttinen H, Väänänen K, Myllyla R. Prolonged exercise causes an increase in the activity of galactosylhydroxylysyl glucosyltransferase and in concentration of type III procollagen aminopropeptide in human serum. *Pflugers Arch* 1986; 407: 500-503.
35. Takala TES, Vuori JJ, Rahkila PJ, Hakala EO, Karpakka JA, Alen MJ, Orava YS, Väänänen HK. Carbonic anhydrase III and collagen markers in serum following cross-country skiing. *Med Sci Sports Exerc* 1989; 21: 593-597.
36. Virtanen P, Viitasalo JT, Vuori J, Väänänen K, Takala TES. Effect of concentric exercise on serum muscle and collagen markers. *J Appl Physiol* 1993; 75: 1272-1277.
37. Wallace JD, Cuneo RC, Baxter R, Orskov H, Keay N, Pentecost C, Dall R, Rosen T, Jorgensen JO, Cittadini A, Longobardi S, Sacca L, Christiansen JS, Bengtsson BA, Sonksen PH. Responses of the growth hormone (GH) and insulin-like growth factor axis to exercise, GH administration, and GH withdrawal in trained adult males: a potential test for GH abuse in sport. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3591-3601.

38. Wallace JD, Cuneo RC, Lundberg PA, Rosen T, Jorgensen JO, Longobardi S, Keay N, Sacca L, Christiansen JS, Bengtsson BA, Sonksen PH. Responses of markers of bone and collagen turnover to exercise, growth hormone (GH) administration, and GH withdrawal in trained adult males. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 124-133.
39. Zofkova I. Pathophysiological and clinical importance of insulin-like growth factor-I with respect to bone metabolism. *Physiol Res* 2003; 52: 657-679.

Table 1. Anthropometric and physiological characteristics of the studied subjects (mean ± SD).

	Number (♂/♀)	Age (yr)	Height (cm)	BMI	Training (h/week)	Sample collection
Recreational	10 ♂/ 11 ♀	23±5	170±10 ²	22.2±2.2	5 - 8	9 and 17 h
Recreational 10 km race	99 ♂	23±3	182±5 ^{1,4}	21.7±1.3	10	• Pre race • Post race
Recreational 21 km race	30 ♂	39±6 ⁴	-	-	-	• Pre race • Post race
Elite athletes	60 ♂/ 36 ♀	22±5 ³	173±8 ²	21.9±3.3	7 - 35	• Basal • Training • Competition
Swimming	3 ♂/ 9 ♀	18±2 ^{6,9,10}	175±7 ⁷	20.8±1.3 ^{8,10,11}	Up to 35	• Basal • Training • Competition
Synchronized swimming	14 ♀	23±3 ^{5,8}	170±6	20.6±1.0 ^{8,10,11}	Up to 25	• Basal • Training
Tae kwon do	10 ♂/ 6 ♀	21±4 ^{9,10}	175±10 ⁸	21.6±1.9 ^{8,11}	Up to 20	• Basal • Training • Competition
Rhythmic gymnastics	6 ♀	16±4 ^{6,9,10}	162±5 ^{5,7,10,11}	16.4±1.0 ^{5,6,7,10,11}	Up to 35	• Basal • Training
Soccer	19 ♂	27±5 ^{5,7,8,11}	-	-	Up to 30	• Basal
Triathlon	16 ♂	27±6 ^{5,7,8,11}	177±4 ⁸	23.5±1.3 ^{5,6,8}	Up to 25	• Basal
Weight lifting	12 ♂/ 1 ♀	22±5 ^{9,10}	173±8 ⁸	25.6±4.9 ^{5,6,7,8}	Up to 14	• Basal • Training • Competition

BMI: Body mass index, measured as $\frac{\text{Weight}}{\left(\frac{\text{Height}}{100}\right)^2}$, weight measured in kg and height in cm.

Significantly different (p < 0.05) from: ¹ Recreational; ² Recreational 10 km race; ³ Recreational 21 km race; ⁴ Elite athletes; ⁵ Swimming; ⁶ Synchronized swimming; ⁷ Tae kwon do; ⁸ Rhythmic gymnastics; ⁹ Soccer; ¹⁰ Triathlon; ¹¹ Weight lifting.

Table 2. Seasonal changes in IGF-I concentration in elite athletes. Values are mean \pm SD (N).

	IGF-I (ng/ml)		
	Baseline	Training	Competition
Swimming	203.5 \pm 76.7 (10)	195.1 \pm 43.1 (7)	257.8 \pm 100.0 (11)
Synchronized swimming	157.2 \pm 44.4 (14)	125.8 \pm 29.8 ^{2,3*} (12)	-
Tae kwon do	197.2 \pm 78.3 (16)	203.4 \pm 64.3 ¹ (16)	149.5 \pm 65.4 * (16)
Rhythmic Gymnastics	180.8 \pm 47.7 (6)	223.1 \pm 55.1 ^{1*} (5)	-
Soccer	141.1 \pm 28.3 (19)	-	-
Triathlon	135.9 \pm 41.3 (16)	-	-
Weight lifting	179.8 \pm 56.8 (11)	169.4 \pm 72.9 (9)	188.0 \pm 78.3 (9)

Significantly different ($p < 0.05$) from: ¹ Synchronized swimming; ² Tae kwon do; ³ Rhythmic gymnastics; * Baseline concentration.

Table 3. Seasonal changes in P-III-P concentration in elite athletes. Values are mean \pm SD (N).

	P-III-P (ng/ml)		
	Baseline	Training	Competition
Swimming	5.9 \pm 1.8 ⁴ (10)	4.3 \pm 0.8 (3)	5.1 \pm 1.2 (11)
Synchronized swimming	4.8 \pm 1.3 ⁴ (14)	3.8 \pm 0.7 * (12)	-
Tae kwon do	4.9 \pm 2.0 ⁴ (16)	4.7 \pm 2.2 (16)	3.8 \pm 2.1 (16)
Rhythmic gymnastics	12.1 \pm 4.8 ^{1,2,3,5,6,7} (6)	8.7 \pm 2.9 (5)	-
Soccer	4.7 \pm 0.9 ⁴ (19)	-	-
Triathlon	4.1 \pm 0.5 ⁴ (16)	-	-
Weight lifting	5.5 \pm 3.2 ⁴ (11)	5.0 \pm 3.6 (9)	6.1 \pm 5.4 (9)

Significantly different ($p < 0.05$) from: ¹ Swimming; ² Synchronized swimming; ³ Tae kwon do; ⁴ Rhythmic gymnastics; ⁵ Soccer; ⁶ Triathlon; ⁷ Weight lifting; * Baseline concentration.

Legends to Figures

Figure 1: The top panel (A) represents age-dependent change of IGF-I serum concentrations in 96 (60 male and 36 female) elite athletes in different training conditions. Reference range for athletes represented by the mean (solid line) and the 95% intervals of confidence (dashed lines) are shown. The lower panel (B) shows box-plots of age-adjusted residuals, obtained by comparing the actual IGF-I concentration values with the predicted ones using the logarithmically transformed on the reciprocal of age. Full circles represent outlier values; empty circles represent extreme values.

Figure 2: The top panel (A) represents age-dependent change of P-III-P serum concentrations in 96 (60 male and 36 female) elite athletes in different training conditions. Reference range for athletes represented by the mean (solid line) and the 95% intervals of confidence (dashed lines) are shown. The lower panel (B) shows box-plots of age-adjusted residuals, obtained by comparing the actual P-III-P concentration values with the predicted ones using the logarithmically transformed on the reciprocal of age. Full circles represent outlier values; empty circles represent extreme values.

Figure 1

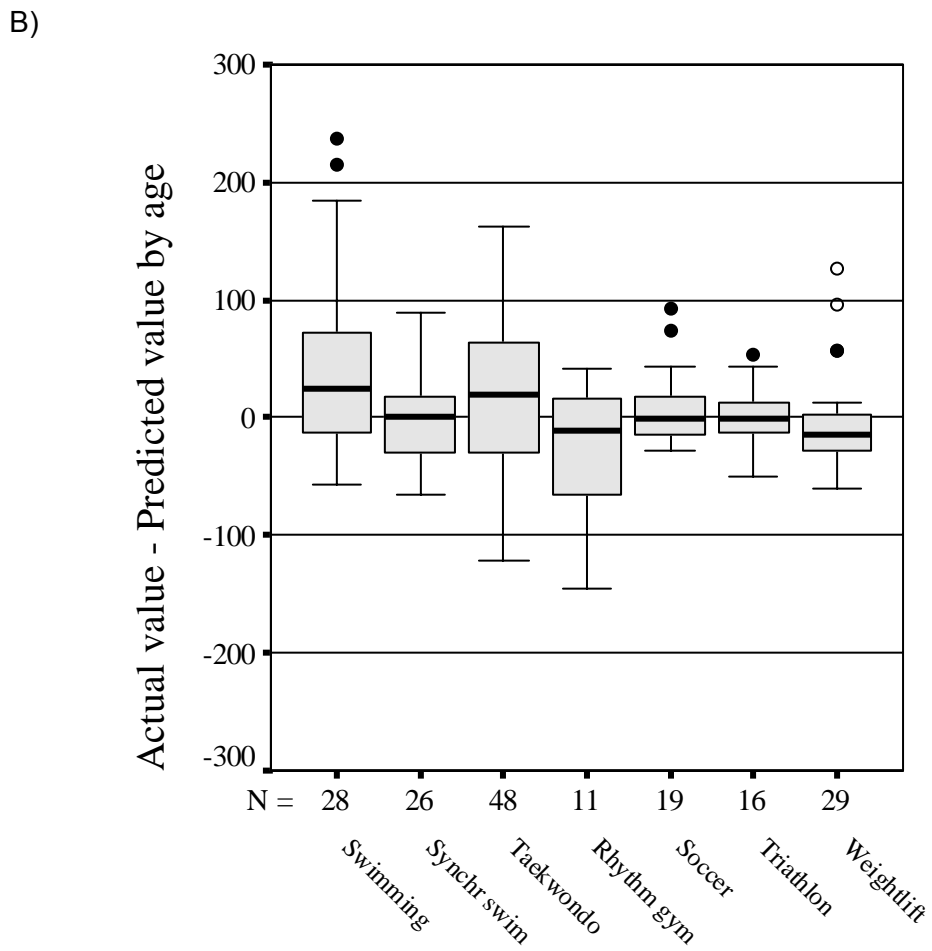
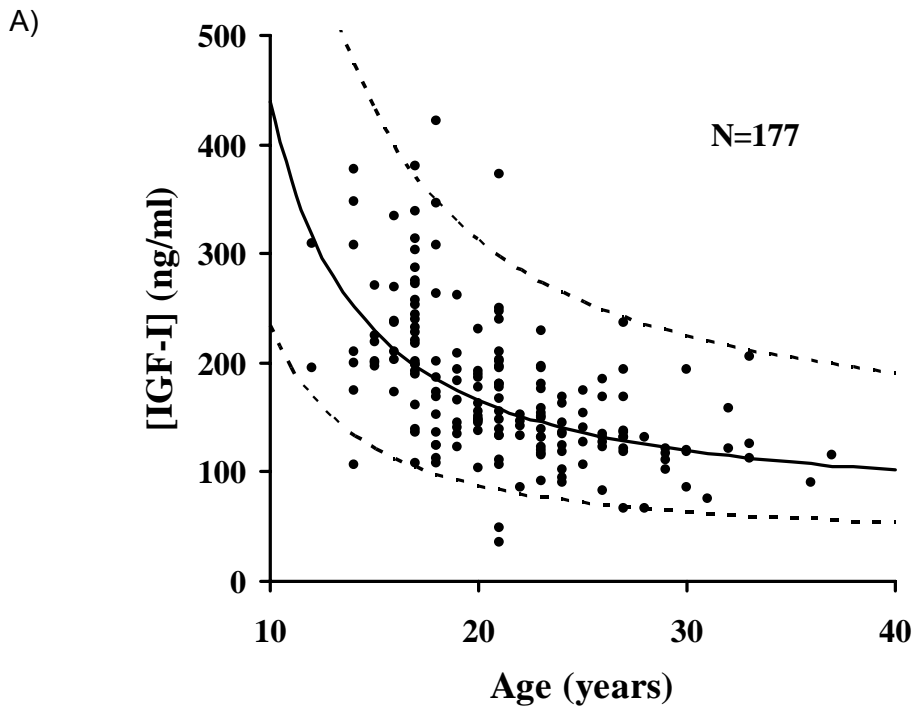
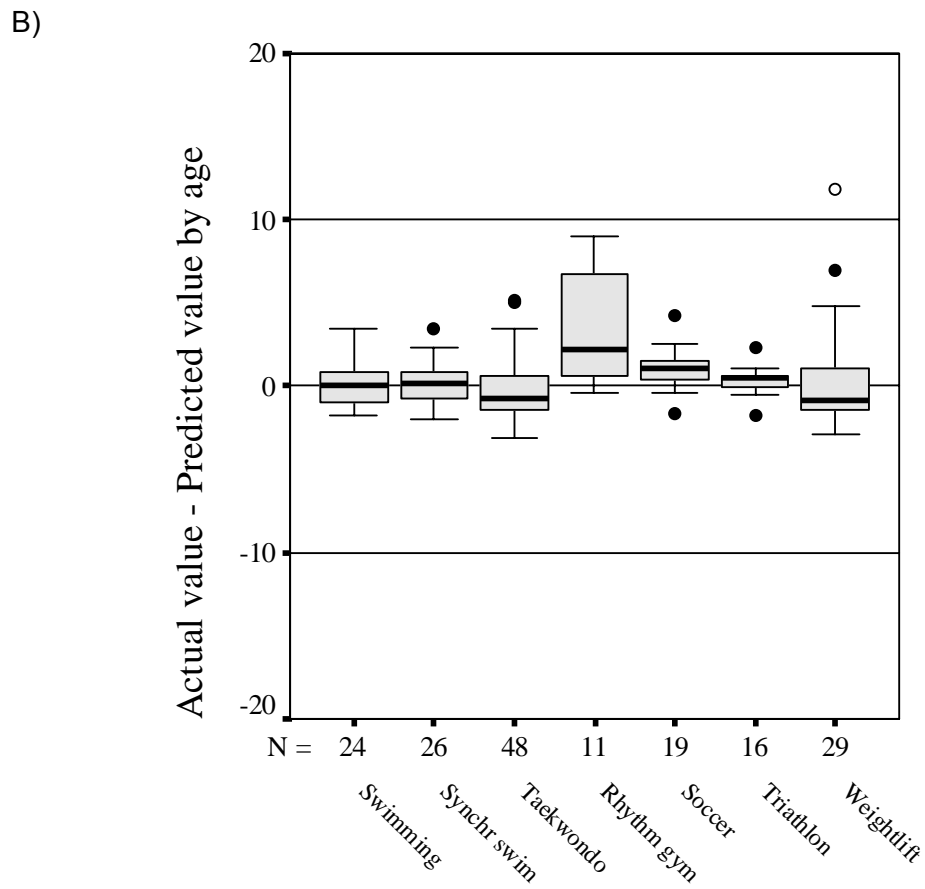
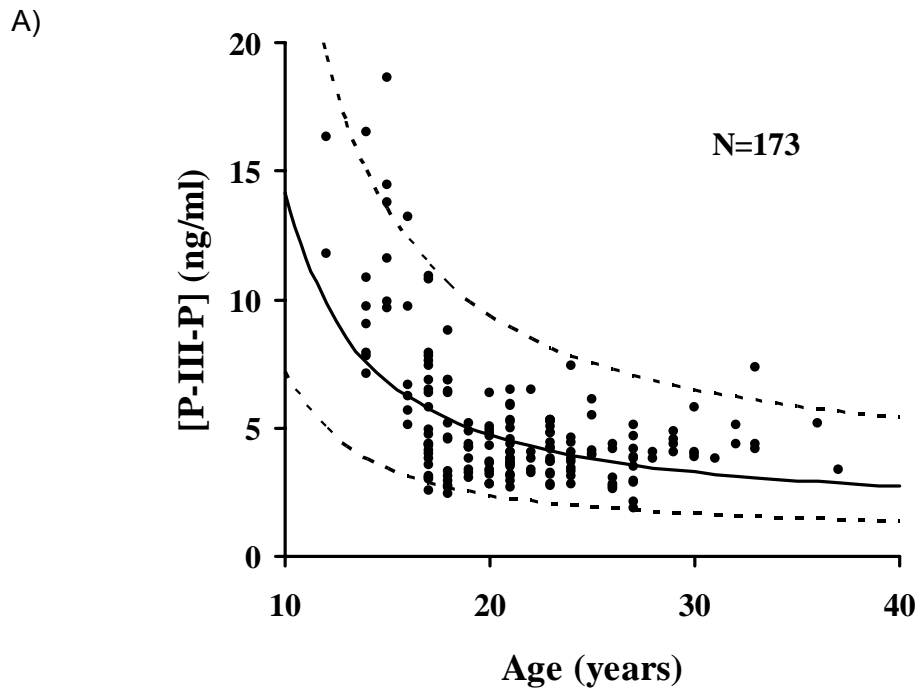


Figure 2



4.4. Discusión

Se ha propuesto la utilización de métodos indirectos para la detección del abuso de rhEPO y rhGH. Sin embargo, los biomarcadores en los cuales se basan estos modelos pueden estar potencialmente modificados por numerosos factores no relacionados con la administración de los productos citados, tales como patologías, ejercicio físico, altitud e, incluso, su propia variabilidad biológica. Por tanto, es necesario el establecimiento de rangos de referencia para la población atlética que nos permitan diferenciar entre fluctuaciones asociadas a la exposición a influencias naturales y la variación atípica de los mismos causada por la administración de rhEPO o rhGH, u otros estimulantes de sistema eritropoyético o del eje de la GH, respectivamente.

4.4.1. Efecto del nivel atlético y el ejercicio de resistencia sobre los marcadores sanguíneos y modelos indirectos de la detección del abuso de rhEPO

Las concentraciones de EPO y sTfR observadas en nuestro estudio son consistentes con las descritas previamente en poblaciones de ambos sexos con el mismo rango de edad y actividad física (J. Allen y cols., 1998; B. Berglund y cols., 1988; G. Raya y cols., 2001; N. Robinson y cols., 2003; Y.O. Schumacher y cols., 2002b, K. Sharpe y cols., 2002). Para los cuatro biomarcadores (EPO, sTfR, hemoglobina y porcentaje de reticulocitos), no se observaron diferencias por efecto del nivel atlético (élite *versus* recreacional) o por las medidas a distintos tiempos de recolección de muestra (D. Roberts y D.J. Smith, 1996). Como han observado otros autores (M.A. Virtanen y cols., 1999; G. Raya y cols., 2001), la concentración de sTfR en suero fue superior en los voluntarios jóvenes, diferencia que no se vio influenciada por el nivel atlético de los deportistas.

Existen pocos estudios en atletas de élite pertenecientes a distintos deportes o realizados en distintas ocasiones a lo largo de la temporada deportiva en los cuales se comparen las concentraciones de EPO y sTfR (L.M. Weight y cols., 1992; K. Sharpe y cols., 2002). Los principales resultados de nuestro estudio son que el tipo específico de deporte no afecta sustancialmente las concentraciones de EPO y sTfR; y, además, estos valores demuestran una gran estabilidad a lo largo de la temporada deportiva. También hay que destacar que la

variabilidad "intra-atleta" de sTfR (9%) coincide con estudios previos, donde la variabilidad "intra-sujeto" observada era del 10% en adultos sanos (M.J. Cooper y S.H. Zlotkin, 1996; M. Maes y cols., 1997) y del 6% específicamente en judocas (J. Malczewska y cols., 2000 y 2004).

En el estudio del efecto del ejercicio agudo en deportistas recreacionales, mientras que no se observaron diferencias en las concentraciones de EPO y sTfR tras una carrera de 10 km, sí tras una competición de semi-maratón (21 km). El aumento observado para sTfR tras la carrera de 21 km, a pesar de ser significativo, no parece clínicamente relevante, y, en concordancia con otros autores (Y.O. Schumacher y cols., 2002b; N. Robinson y cols., 2003; K.C. Deruisseau y cols., 2004), se puede atribuir a cambios en el volumen vascular por efecto del ejercicio continuado. En el caso de la EPO, en la bibliografía no se describen modificaciones de su concentración por efecto de los distintos tipos de ejercicio (B. Berglund y cols., 1988; W. Schmidt y cols., 1991; L.M. Weight y cols., 1992; T. Klausen y cols., 1993; A.F. Remacha y cols., 1994; N. Robinson y cols., 2003; Y.O. Schumacher y cols., 2003). En nuestro estudio, hemos observado una disminución significativa de la concentración de EPO tras la carrera de semi-maratón (21 km). Desafortunadamente, con la información de que disponemos, nos es imposible explicar el porqué de esta diferencia, que no corresponde con un efecto de hemoconcentración tras un ejercicio intenso.

En los atletas de élite, los niveles de los parámetros hematológicos determinados (concentración de hemoglobina y porcentaje de reticulocitos) se encontraron dentro del rango de normalidad (Y.O. Schumacher y cols., 2000, 2002a y c; K. Sharpe y cols., 2002). Sin embargo, para algunas deportistas de élite, la concentración de hemoglobina se encontraba en el límite inferior de los rangos de normalidad descritos. En las mujeres, el metabolismo sanguíneo y los niveles de hierro no se encuentran únicamente afectados por cambios en la dieta o en el ejercicio, sino también por la pérdida periódica de sangre durante la menstruación que puede desembocar en una disminución mayor de la hemoglobina.

En los deportistas de élite varones, los altos valores de concentración de hemoglobina observados en el grupo de halterofilia coinciden con los cambios hematológicos descritos para los deportistas de entrenamiento de fuerza cuando estos son comparados con los deportistas de entrenamiento de resistencia (Y.O. Schumacher y cols., 2000; D.J. Shaskey y G.A. Green, 2000). Entre los cambios hematológicos observados por efecto del entrenamiento de resistencia, se incluyen la disminución de la concentración de hemoglobina, del hematocrito y del número de eritrocitos, efectos asociados al incremento del número de reticulocitos y del volumen plasmático (Y.O. Schumacher y cols., 2000a y c). En los grupos de natación

sincronizada y halterofilia, puede observarse la disminución significativa de la concentración de hemoglobina a lo largo de la temporada. En un estudio realizado en ciclistas, se demostraron cambios similares en las concentraciones de hemoglobina a lo largo de la temporada deportiva, con una disminución del 3% entre los períodos de bajo (invierno) e intenso entrenamiento (verano) (Y.O. Schumacher y cols., 2000c).

Respecto a la detección indirecta del abuso de rhEPO, a pesar de las variaciones apreciadas a lo largo de la temporada, estas no tendieron hacia los límites descritos para los modelos. El estudio del efecto del ejercicio continuado sobre los modelos indirectos es muy limitado, siendo este uno de los factores de mayor importancia de nuestro estudio. Además, nuestros resultados coinciden con un estudio de competición ciclista de cinco días duración, realizado a nivel del mar, en el cual se observaron variaciones de los marcadores a lo largo del tiempo, pero sin alcanzar los límites (Y.O. Schumacher y cols., 2003).

Únicamente para uno de los atletas (en condiciones basales) el valor obtenido con el modelo ON se encontró por encima de los límites descritos a causa de la alta concentración natural de hemoglobina (C.J. Gore y cols., 2003). En los modelos indirectos, la utilización de puntos de corte derivados de estudios poblacionales puede tener como consecuencia la obtención de falsos positivos, casos que podrían evitarse mediante la monitorización longitudinal de los perfiles hematológicos de los atletas (K. Sarpe y cols., 2006).

En la actualidad, algunas federaciones (IAAF, UCI, etc.) prohíben la participación de atletas cuando alguno de sus parámetros hematológicos (hemoglobina, hematocrito o porcentaje de reticulocitos) sobrepasan los puntos de corte para ellos establecidos. Estas regulaciones de seguridad se han establecido con la intención de evitar, en el caso de una alta viscosidad sanguínea (sea natural o inducida), un empeoramiento por efecto de la hemoconcentración producida por el ejercicio. La introducción del análisis de los indicadores séricos (EPO and sTfR) podría facilitar el escrutinio del abuso de rhEPO con una mayor fiabilidad que la sola utilización de la hemoglobina y el porcentaje de reticulocitos.

4.4.2. Efecto del nivel atlético y el ejercicio de resistencia sobre los biomarcadores séricos (IGF-I y P-III-P) de la detección indirecta del abuso de rhGH

En nuestro estudio, no se observaron diferencias estadísticas para las concentraciones de IGF-I y P-III-P relacionadas con el género de los sujetos estudiados (mayoritariamente adultos), de acuerdo con resultados descritos por otros autores (J. Risteli y cols., 1988; A. Juul y cols., 1994; A. Sartorio y cols., 2004b).

Los rangos de concentración de IGF-I encontrados en nuestros voluntarios, la disminución observada en relación con el incremento de la edad y la no influencia del tiempo de recolección de las muestras son consistentes con los resultados descritos en estudios precedentes para poblaciones de ambos sexos, del mismo rango de edad y actividad física (A. Juul y cols., 1994; C. Skjaerbaek y cols., 2000; E.F. De Palo y cols., 2001; C.J. Strasburger y cols., 2001; C. Ehrnborg y cols., 2003; A. Sartorio y cols., 2004b; M.L. Healy y cols., 2005).

Se han descrito resultados contradictorios en el estudio del efecto del ejercicio prolongado sobre la concentración de IGF-I (L.P. Koziris y cols., 1999; S.E. Borst y cols., 2001; J.O. Marx y cols., 2001; L. Rosendal y cols., 2002). Aunque algunos estudios describen concentraciones más altas en sujetos entrenados comparado con sujetos sedentarios (C.M. Snow y cols., 2000; L. Rosendal y cols., 2002), el ejercicio prolongado no siempre incrementa la concentración sérica de IGF-I, y esos cambios, si los hay, son menos importantes en sujetos altamente entrenados comparados con los no entrenados (L. Rosendal y cols., 2002). Además, en el entrenamiento intenso, cuando el gasto energético sobrepasa la energía ingerida, esta restricción calórica puede causar una disminución de la concentración de IGF-I en circulación (B.C. Nindl y cols., 2003), consiguiendo así una mejor adaptación mediante la inhibición de los efectos hipoglicémicos, antilipolíticos y anabólicos de la IGF-I. En nuestro estudio, los resultados presentados indican que el nivel atlético y el tipo de deporte no afectan sustancialmente a la concentración de IGF-I en suero; y, aunque se observaron variaciones significativas a lo largo de la temporada para alguno de los deportes, estas concentraciones se encontraban dentro de los rangos de normalidad descritos para el mismo rango de edad (A. Juul y cols., 1994; E.F. De Palo y cols., 2001; C. Ehrnborg y cols., 2003; A. Sartorio y cols., 2004b; M.L. Healy y cols., 2005) y no mostraron una tendencia uniforme.

En el estudio del efecto agudo del ejercicio de resistencia (carreras de 10 y 20 km), mientras que no se observaron diferencias en la competición de carrera de 10 km, sí un

incremento significativo de la concentración sérica de IGF-I tras la carrera de 21 km. En la literatura, la variabilidad de los cambios de la IGF-I por efecto del ejercicio agudo se ha atribuido a los distintos protocolos de ejercicio utilizados. El distinto tipo y duración de los protocolos, y la carga de entrenamiento parecen ser determinantes en las respuestas del eje GH/IGF-I. Numerosos estudios describen un aumento agudo de la concentración de IGF-I en suero que ocurre entre 10 y 30 minutos del inicio del ejercicio (J. Cappon y cols., 1994; A.J. Schwarz y cols., 1996; R. Dall y cols., 2001; C. Ehrnborg y cols., 2003), y que parece es dependiente de la intensidad del ejercicio, pero independiente del incremento de GH (J. Cappon y cols., 1994; A.J. Schwarz y cols., 1996). Por otro lado, estudios de ejercicio de resistencia de larga duración han sido incapaces de demostrar ningún cambio en la concentración de IGF-I en suero (G. Jahreis y cols., 1989; H. Koistinen y cols., 1996; B.C. Nindl y cols., 2001) o han observado una disminución dependiente de la duración del ejercicio (A.M. Suikkari y cols., 1989; J.O. Marx y cols., 2001). La disminución habitualmente se relaciona con la adaptación fisiológica al ejercicio prolongado mediante la inhibición de los efectos pro-insulínicos de la IGF-I. En nuestra investigación, el 10% de incremento observado tras 2 horas de carrera puede estar relacionado con la hemoconcentración producida por el ejercicio extremo, incremento incluido dentro del rango de variabilidad descrito en parámetros bioquímicos presentes en plasma (S. Kargotich y cols., 1998).

Para el P-III-P, de acuerdo con otros autores (G. Saggese y cols., 1994), no se observaron diferencias por efecto de la hora de recogida de las muestras. A diferencia de la IGF-I, se observaron concentraciones de P-III-P significativamente superiores en atletas de élite respecto a recreacionales en condiciones basales, siendo la media de edad comparable entre ambos grupos. Teniendo en cuenta los distintos deportes, la gimnasia rítmica presentaba los valores de concentración de P-III-P más altos. Aunque el grupo de gimnasia rítmica fue el más joven estudiado y la edad podría ser el principal responsable de esta diferencia, no se puede excluir que estos valores más altos pueden estar relacionados con el efecto del entrenamiento gimnástico sobre la degradación del colágeno tipo III presente en los tejidos blandos (R. Fleischmajer y cols., 1990). Sin embargo, a lo largo de la temporada, en lugar de observarse incrementos en la concentración de P-III-P, se observó una disminución en todos los deportes (incluyendo la gimnasia rítmica), aunque sólo significativa para la natación sincronizada. Estudios previos, han relacionado el ejercicio con el aumento del volumen plasmático y la subsiguiente disminución de los parámetros bioquímicos (Y.O. Schumacher y cols., 2002a).

En los deportistas recreacionales, se observó la diferencia significativa entre la concentración de P-III-P antes y después de la carrera de 21 km, pero no para la de 10 km. El

aumento observado (30%) parece demasiado grande para ser tan solo el efecto de la hemoconcentración, como podría ser para la IGF-I. Existen pocos estudios que describan cómo afecta el ejercicio a la concentración sérica de P-III-P. No se han observado diferencias tras un ejercicio corto de alta intensidad (P. Virtanen y cols., 1993); contrariamente, se han descrito aumentos de la concentración de P-III-P tras un ejercicio agudo de aproximadamente 30 minutos y su rápida vuelta a valores basales (J.D. Wallance y cols., 2000; C. Ehrnborg y cols., 2003). Por otro lado, para el ejercicio de larga duración, la concentración de P-III-P aumentó tras la finalización de una carrera de 24 horas (120-227 km) (T.E.S. Takala y cols., 1986); pero no tras una prueba de relevos de esquí de montaña, en la cual los participantes realizaron un total de 6 horas de ejercicio durante 8-12 relevos (cada uno de 30-40 minutos) a lo largo de 24 horas (T.E.S. Takala y cols., 1989). Por lo tanto, parece que la intensidad y el tipo de ejercicio determinan la respuesta de P-III-P, y en nuestro caso, sólo tras un ejercicio físico de larga duración como la carrera de 21 km, pudieron observarse aumentos significativos en la concentración de P-III-P.

Las concentraciones de los marcadores estudiados han demostrado ser dependientes del inmunoensayo utilizado (J. Risteli y cols., 1988; V. Quarmbly y cols., 1998; J.D. Wallance y cols., 2000; R. Abellan y cols., 2005). A pesar de ello, la validación de dichos inmunoensayos (R. Abellan y cols., 2005) ha permitido la comparación de los rangos de referencia de deportistas de élite obtenidos en este estudio con los obtenidos en un estudio reciente (A. Sartorio y cols., 2004b), los cuales han demostrado ser muy similares para ambos biomarcadores.

Se han comparado los cambios en las concentraciones séricas de IGF-I y P-III-P tras el ejercicio agudo con los descritos tras la administración de rhGH (J.D. Wallance y cols., 1999 y 2000; S. Longobardi y cols., 2000). El aumento de las concentraciones séricas de ambos biomarcadores tras la administración fueron siempre superiores a los observados tras un ejercicio agudo. La desaparición del mercado del inmunoensayo utilizado previamente por otros autores para IGF-I y el hecho de que el inmunoensayo de P-III-P utilice distinto estándar de calibración, ha imposibilitado el establecimiento de una correlación entre los resultados de estos estudios de administración con los obtenidos en nuestro laboratorio. A pesar de ello, estos últimos parecen no superponerse a los observados tras una administración de rhGH (A.T. Kicman y cols., 1997; E. Ghigo y cols., 1999; S. Longobardi y cols., 2000), incluso tras 96 horas (J.D. Wallance y cols., 1999 y 2000; S. Longobardi y cols., 2000). Por tanto, parece posible la clara distinción entre el abuso de rhGH y las variaciones debidas al ejercicio utilizando estos biomarcadores.

Finalmente, cabe destacar que los resultados presentados en este estudio sólo pueden ser aplicados en el contexto de población atlética caucásica. Aunque en un estudio previo realizado en atletas de élite de distintos orígenes étnicos (caucásicos y negros) no se observaron diferencias para ninguno de los dos biomarcadores de estudio (M.L. Healy y cols., 2005), se necesita más información para determinar para otros grupos étnicos los rangos de normalidad y la sensibilidad al ejercicio y a la administración de rhGH.

En conclusión, los biomarcadores séricos propuestos para la detección indirecta del abuso de rhEPO no se encuentran directamente afectados por el nivel atlético, el ejercicio o la distinta carga de entrenamiento realizada a lo largo de la temporada deportiva. Las variaciones observadas en los modelos matemáticos de detección de la administración de rhEPO se producen fundamentalmente a causa de las fluctuaciones de la concentración de hemoglobina, efecto comúnmente observado en deportistas de élite. Sin embargo, los resultados presentados confirman que la baja variabilidad intra-individual de los biomarcadores estudiados a lo largo de la temporada deportiva no debería afectar a la producción de resultados falsos positivos con la aplicación de los modelos indirectos de segunda-generación ON/OFF para la detección del abuso de rhEPO.

En el caso de los biomarcadores indirectos de rhGH, la edad es el factor que ejerce mayor influencia sobre las concentraciones séricas de IGF-I y P-III-P. Mientras que el nivel atlético, por si mismo, no tuvo ningún efecto sobre las concentraciones de IGF-I en suero, para P-III-P se observaron valores más altos en atletas de élite comparados con los deportistas recreacionales. Además, las diferencias observadas en la concentración sérica de P-III-P entre los atletas de distintos deportes se mantuvieron incluso tras su corrección por la edad. Por tanto, las variaciones debidas a la carga de entrenamiento y la edad deben tenerse en consideración en el caso de establecer rangos de referencia de sus concentraciones para la detección antidopaje.

5. Efecto de la exposición intermitente a hipoxia en cámara hipobárica sobre la concentración de los biomarcadores indirectos del abuso de rhEPO

5.1. Introducción

La estimulación de la eritropoyesis por efecto de la hipoxia, vía síntesis de EPO, ha promovido que muchos deportistas utilicen el entrenamiento en altitud como método ergogénico (R.L. Wilber, 2004). Recientemente, se ha propuesto un nuevo protocolo de exposición intermitente a hipoxia (*intermittent hypoxia exposure*, IHE), basado en la observación de que breves exposiciones a relativamente altos niveles de hipoxia estimulan la liberación de EPO en humanos (K.U. Eckardt y cols., 1989; W. Knaupp y cols., 1992; F.A. Rodríguez y cols., 2000). Este método consiste en la exposición a cortos períodos de hipoxia severa (entre 1.5 y 5 h/día) en condiciones de reposo, combinada con entrenamiento a nivel del mar durante 2-3 semanas (F.A. Rodríguez y cols., 1999; M. Casas y cols., 2000; F.A. Rodríguez, 2002).

Los efectos observados de la administración de rhEPO sobre la activación de la eritropoyesis han demostrado ser superiores a los obtenidos tras el entrenamiento en altitud (M.J. Ashenden y cols., 2001). Sin embargo, la distinta eficacia de los protocolos de entrenamiento en altitud y la variabilidad inter-individual de la respuesta dificultan la predicción de cuáles serán la concentración de EPO y la respuesta hematopoyética alcanzadas (B.D. Levine y J. Stray-Gundersen, 1997; J. Stray-Gundersen, 2001; B. Friedmann y cols., 2005; J.V. Brugniaux y cols., 2006). El efecto de la hipoxia sobre los modelos matemáticos ON/OFF de detección indirecta de la administración de rhEPO (C.J. Gore y cols., 2003) ha sido estudiado utilizando distintos protocolos de altitud real y simulada (M.J. Ashenden y cols., 2003 y 2004a), pero no se ha realizado ningún estudio para la hipoxia severa en cámara hipobárica.

Respecto a los efectos de la altitud sobre el método de detección directa del consumo de rhEPO, basada en las diferencias de glicosilación entre la EPO endógena y la recombinante, alteraciones en el proceso de glicosilación de las proteínas durante su procesamiento post-traducciona l podrían inducir a interpretaciones erróneas. Se ha observado la presencia de diferentes formas glicosiladas en algunos estados patológicos. En pacientes con policitemia vera y en recién nacidos, comparados con adultos, se ha observado la presencia en suero de isoformas de la EPO sérica menos cargadas negativamente (L. Wide y C. Bengtsson, 1990). La tasa de secreción de una proteína en particular puede lógicamente influenciar el resultado de la glicosilación puesto que se pueden dar ciertos puntos limitantes durante su producción (P.M. Rudd y R.A. Dwek, 1997). Es importante destacar que, en anemia aplásica y en altitud, la tasa

de producción de EPO aumenta y, por tanto, el potencial efecto de estas alteraciones patológicas o ambientales sobre la glicosilación de la EPO no debe ser omitido (V. Skibeli y cols., 2001). El hecho de que no se hayan encontrado determinantes genéticos que expliquen la variabilidad individual en la respuesta de la EPO a la altitud (K. Jedlickova y cols., 2003), podría hacer suponer la participación de procesos no genéticamente codificados, como la glicosilación. A nuestro conocimiento, existe una única publicación en la que se ha estudiado el efecto de la hipoxia sobre las características electroforéticas de la EPO (B. Berglund y cols., 2001). En este estudio de exposición intermitente a hipoxia normobárica moderada, no se observaron diferencias en la movilidad electroforética de las isoformas presentes en sangre. Sin embargo, el estudio de un único protocolo de exposición a hipoxia no puede definir el efecto general de la hipoxia sobre la glicosilación de la EPO endógena.

En este capítulo se incluye la descripción del estudio del efecto de la exposición intermitente a hipoxia en cámara hipobárica (HC-IHE) en atletas entrenados sobre el rendimiento deportivo, los parámetros hematológicos y las posibles interacciones en la detección del abuso de rhEPO, tanto por métodos directos, isoelectroenfoque, como por indirectos, modelos matemáticos.

5.2. Material y métodos

5.2.1. Selección de los sujetos

Los voluntarios seleccionados en este estudio fueron dieciséis hombres adultos, atletas de triatlón. Todos ellos dieron su consentimiento informado, recibieron exploración física previa y cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión pertinentes. Ninguno de ellos presentó desórdenes endocrinos, historias clínicas con enfermedades recientes o crónicas, ni admitieron haber recibido una transfusión sanguínea o participado en otros estudios clínicos durante el mes previo al inicio del estudio, ni haber utilizado GH, IGF-I, eritropoyetina o cualquier sustancia conocida con efectos anabólicos o activadoras de la eritropoyesis.

Para cada uno se realizó un *Cuaderno de recogida de muestras* en el que se describía, de forma detallada, la carga de entrenamiento semanal, consumo de tabaco y alcohol, utilización de fármacos, suplementación de hierro o alimenticia.

Para asegurar el adecuado estado de los voluntarios, estos tomaron una suplementación diaria de hierro, ácido fólico, magnesio y antioxidantes (vitaminas C, E). Esta suplementación se

inició una semana antes de empezar las sesiones de cámara y se mantuvo durante el tiempo que duró en protocolo de experimentación.

El protocolo de suplementación fue el siguiente:

Preparado	Principio activo	Posología (desayuno - comida - cena)
Fero-Gradumet , comprimidos	Lactato de hierro 157 mg/día	0-0-1
Redoxón , comp. efervescentes	Ácido ascórbico (vit. C) 1 g/día	0-0-1
Acfol , comprimidos	Acetato de dl- α -tocoferol (vit.E) 400 mg/día	0-0-1
Auxina E 400 mg , cápsulas	Folinato de calcio 2,16 mg/día	1-0-1
Magnesioboi 500 mg , comprimidos	Lactato de magnesio 1,5 g/día	1-1-1

Previamente al inicio del protocolo de exposición, los deportistas fueron divididos en dos grupos de forma aleatoria (grupo hipoxia y grupo control), y se confirmó que entre ellos no existieran diferencias significativas en las características antropométricas. La edad de los deportistas era de 27 ± 6 (media y desviación estándar) años, con un rango de 19 a 37 años; la masa corporal era de 74 ± 4 kg, con un rango de 66 a 84 kg; y una altura de 177 ± 4 cm, con un rango de 172 a 185 cm.

Respecto a las características del entrenamiento, todos los atletas realizaban entrenamiento de forma regular (rango: 7-25 horas a la semana) y competían a nivel nacional, y continuaron entrenando a lo largo del estudio.

5.2.2. Protocolo de exposición intermitente a hipoxia

El grupo hipoxia ($n=8$) combinó el entrenamiento a nivel del mar con la exposición a hipoxia en cámara hipobárica. El programa consistió en exposiciones de 3 horas diarias, 5 días a la semana, durante cuatro semanas (total de 20 sesiones). La altitud simulada incrementó progresivamente durante las primeras cuatro sesiones desde 4.000 hasta 5.500 m (614-504 hPa, respectivamente) para permitir la aclimatación, y se mantuvo a 5.500 m (504 hPa) en las dieciséis sesiones siguientes (Figura 5.1.). Por consiguiente, durante el programa, la tensión de oxígeno (pO_2) en la cámara varió de 129 a 105 hPa.

En las sesiones, los sujetos entraban en la cámara a las 04:00 p.m., ascendían durante 10-15 min. hasta la altura simulada objetivo, permanecían despiertos y en reposo durante 180 min., y entonces descendían hasta la presión a nivel del mar durante 10-15 min. Durante todo

el protocolo, el grupo control (n=8) se mantuvo a nivel del mar en condiciones de normoxia normobárica.

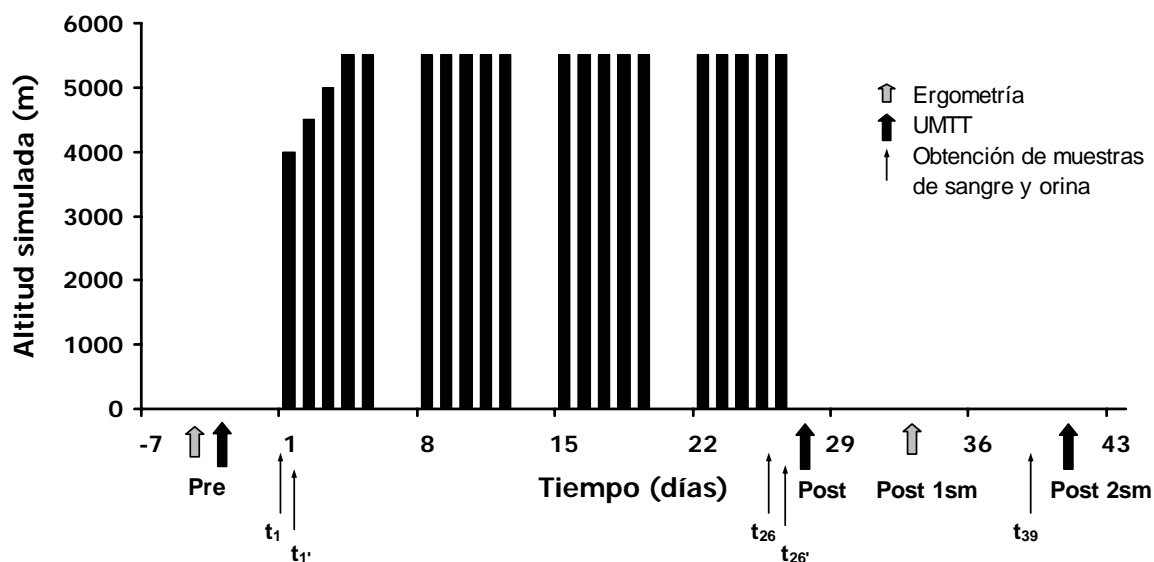


Figura 5.1: Protocolo experimental de la exposición intermitente a hipoxia en cámara hipobárica.

5.2.3. Determinaciones analíticas

Valoración del rendimiento deportivo

- Test de la Universidad de Montreal (Université de Montreal Track Test, UMTT)

Antes, inmediatamente después, y dos semanas después de la intervención (Pre, Post 1, y Post 2 semanas), todos los sujetos realizaron una prueba de carrera graduada en pista sintética de 400 m ($v_0=7 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1}$; $\Delta v=1 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1}$ cada 2 min.) hasta el agotamiento, mediante la cual se determinó la velocidad en condiciones de intercambio máximo de oxígeno (VO_2max), o velocidad máxima aeróbica.

- Prueba de ergometría

Antes y una semana después de la intervención (Pre y Post 1 semana), todos los sujetos realizaron un test de incremento máximo en cinta rodante ($v_0=6 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1} \times 4 \text{ min.}$; $\Delta v=2 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1}$ cada min.; pendiente = 5%) con monitorización continua del intercambio de gases durante la respiración (CPXIID, Medical Graphics, USA).

Valoración de parámetros biológicos

Durante el protocolo, la extracción sanguínea y la recogida de muestras de orina se realizó en cinco ocasiones distintas (Figura 5.1). En el grupo hipoxia, se recogieron muestras en condiciones pre y post-primera exposición a hipoxia (t_1 y $t_{1'}$, respectivamente), pre y post-última exposición (t_{26} y $t_{26'}$, respectivamente) y tras dos semanas desde la última exposición (t_{39}). En el grupo control, sólo en condiciones pre-primera exposición a hipoxia (t_1), y pre-última exposición (t_{26}).

La extracción de sangre de la vena antecubital se realizó en condiciones normoxia y tras 20 min. de reposo absoluto en decúbito supino. La sangre se recogió en tubos con K_3EDTA (sangre total), tubos con litio heparina (plasma), y tubos con gel coactivador de la coagulación (suero). Las muestras de sangre total y plasma se mantuvieron a $4^\circ C$ hasta su evaluación, dentro de las 20 h subsiguientes a la extracción. Las muestras de suero y orina fueron congeladas a $-20^\circ C$ hasta su análisis.

Además de la determinación del contaje celular sanguíneo y de reticulocitos, el autoanализador Sysmex XE-2100 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) determinó el valor medio del histograma de dispersión frontal de la luz (*forward light scatter histograms*) de eritrocitos (RBC-Y) y reticulocitos (RET-Y). La utilidad de estos parámetros se basa en la correlación encontrada entre RET-Y y CHr (concentración de hemoglobina en el reticulocito), y RBC-Y y %Hypo (porcentaje de células rojas hipocrómicas), respectivamente, (Briggs C et al., 2001). Los valores de RBC-Y y RET-Y fueron expresados en las unidades arbitrarias suministradas por el fabricante.

La EPO fue determinada en suero utilizando el ELISA Quantikine IVD Human EPO ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA). El sTfR, haptoglobina, sideremia, la transferrina, y la saturación de la transferrina se determinaron utilizando procedimientos automatizados (Hitachi 911) suministrados por Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). La ferritina sérica se determine con el inmunoensayo automatizado Elecsys 2010 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Protocolo de determinación de los volúmenes sanguíneos

La determinación de los volúmenes de sangre total (volemia), plasma (plasmemia), y glóbulos rojos (citemia) se realizó utilizando el método del tinte Azul de Evans (*Evans Blue dye*, T-1824) (Mollison PL, 1983). Este método se basa en la unión de este tinte con la albúmina después de ser inyectado, y en la subsiguiente lenta disociación de esta combinación.

La solución de Azul de Evans (EB) utilizada fue preparada por el Laboratorio de Farmacia del Hospital de Sant Pau i la Santa Creu (Barcelona). El tinte, distribuido en viales y esterilizado en autoclave, tenía una concentración de 75 mg por 100 ml en una solución de 0,9% de NaCl.

Tres días antes de la determinación de los volúmenes sanguíneos, se realizó una prueba de intradermoreacción al EB, que resultó negativa para todos los voluntarios.

Previamente a la prueba, se preparó una jeringa con aproximadamente 15 mL de EB para cada uno de los voluntarios, y una vez llenas, se pesaron. Estos pesos se anotaron, junto con los datos antropométricos de los voluntarios justo antes de empezar el procedimiento, en una hoja de recogida de datos.

Los voluntarios se encontraron en reposo absoluto en decúbito supino, 20 min. antes de empezar y durante toda la prueba. El protocolo comenzó con la extracción de sangre venosa en tubos seleccionados (tubos de Heparina de 5 y 10 mL, y un tubo de K₃EDTA de 5 mL para la obtención del plasma pre-citemia y el hematocrito, respectivamente), utilizando la palomilla para poder mantener la vía permeable para las posteriores extracciones.

Una vez extraídos, se administraron 15 mL de EB por vía endovenosa en la extremidad superior contraria. Finalizada la administración, se permaneció durante 10 minutos exactos en espera. Trascurrido este tiempo, se practicó la extracción de dos tubos de Heparina de 5 mL por la vía (un primer tubo de deshecho y un segundo tubo para la obtención del plasma post-citemia). Las jeringas con el volumen remanente de tinte se volvieron a pesar y se anotó el peso.

Los tubos de plasma se mantuvieron tapados de la luz y fueron centrifugados a 3.000 rpm durante 15 min. a 20°C. Los sobrenadantes se pasaron a tubos de plástico nuevos rotulados (los dos pre-citemia juntos) y el proceso fue repetido dos veces más. Con los sobrenadantes limpios del plasma pre-citemia, se prepararon los Estándares. En dos tubos de plástico nuevos con 1980 µl de plasma pre-citemia cada uno, se diluyeron de 20 µl de EB del mismo vial del que se había inyectado al voluntario.

Una vez preparados todos los tubos, estos se midieron en el espectrofotómetro. El aparato se ajustó para leer la absorbancia a 620 nm. Para los tubos correspondientes a cada uno de los voluntarios, se inició haciendo un blanco con H₂O desionizada. Después otro blanco con el plasma pre-citemia correspondiente al voluntario. Seguidamente, el *estándar 1*, el *estándar 2* y la muestra *problema* (o plasma post-citemia). Entre tubos de voluntarios, se repitió todo el proceso desde el blanco con H₂O desionizada.

A partir de los resultados obtenidos, se realizó el cálculo de los parámetros de interés utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Volumen inyectado (ml)} = (\text{Peso jeringa pre} - \text{Peso jeringa post}) (\text{g}) \times \frac{5}{5,073}$$

$$\text{Factor} = \frac{\text{Densidad óptica del problema}}{\text{Media densidades ópticas de los estándares}}$$

$$\text{Plasmemia (ml)} = \frac{\text{Volumen inyectado (ml)} \times 100}{\text{Factor}}$$

$$\text{Citemia (ml)} = \frac{\text{Plasmemia (ml)} \times \text{Hematocrito (\%)} \times 0,91}{100 - \text{Hematocrito (\%)} \times 0,91}$$

$$\text{Volemia (ml)} = \text{Plasmemia (ml)} + \text{Citemia (ml)}$$

Los resultados finales fueron expresados en ml/m² de superficie corporal obtenida a partir de los datos antropométricos de cada voluntario y calculada a partir de la fórmula de Dubois & Dubois (1916):

$$S = \frac{P^{0,425} \times A^{0,725} \times 71,84}{1000}$$

donde S es la superficie corporal en m², P es el peso en kg y A la altura en cm.

5.2.4. Aplicación de los modelos matemáticos ON/OFF de detección indirecta del abuso de rhEPO

El efecto de la HC-IHE sobre los modelos de detección indirecta del abuso de la rhEPO descritos por C.J. Gore y colaboradores (2003) se estudió aplicando los valores de concentración de hemoglobina y porcentaje de reticulocitos obtenidos en el análisis del

hemograma en sangre total, y las concentraciones de EPO y sTfR en suero. Las ecuaciones se encuentran descritas en el apartado 1.2.4. Detección del abuso de rhEPO.

Antes de aplicar a los modelos nuestros resultados de EPO y sTfR en suero, al haber sido estos analizados en distintos inmunoensayos a los utilizados en el desarrollo de los modelos matemáticos, estos fueron transformados aplicando las ecuaciones de correlación calculadas en el Capítulo 3. En el caso de la concentración de hemoglobina y el porcentaje de reticulocitos, fue necesario un estudio comparativo entre el autoanalyzer hematológico Sysmex XE-2100 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) y el Advia 120 (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). En este estudio se analizaron 82 muestras de pacientes con anomalías hematológicas del Hospital de Sant Pau para determinar la presencia de sesgo inter-técnica y la necesidad, o no, de realizar la transformación de los resultados previamente a su aplicación en los modelos matemáticos.

Las ecuaciones e intervalos de confianza del 95% (IC 95%) de la concentración de hemoglobina y, número absoluto y porcentaje de reticulocitos obtenidos utilizando la comparación inter-técnica de Passing-Bablok entre los analizadores hematológicos Sysmex XE-2100 y Advia 120 son los siguientes:

Ecuación de Passing-Bablok	IC 95% para la pendiente	IC 95% para la intercepción
Sysmex (Hb) = 1.00 Advia + 0.20	1.00 to 1.01	0.02 to 0.20
Sysmex (ret) = 1.11 Advia - 4.97	0.99 to 1.35	-14.056 to -1.86
Sysmex (ret%) = 1.17 Advia - 0.20	0.99 to 1.33	-0.35 to -0.07

5.2.5. Aplicación de la técnica de isoelectroenfoco de detección directa del abuso de rhEPO

El procedimiento utilizado en el estudio de las isoformas de la EPO se basa en el descrito por F. Lasne y cols. (2002) con algunas modificaciones, entre ellas la utilización de distinto anticuerpo monoclonal anti-hEPO.

Protocolo experimental

El procedimiento de separación y detección de las isoformas de la EPO consta de tres partes:

- Isoelectroenfoque (IEF)

Las distintas muestras de orina fueron previamente concentradas de un volumen de 20 mL hasta un volumen final de 20 μ L en una solución de albúmina sérica bovina 1% en Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) utilizando, de forma consecutiva, los filtros Centricon® Plus-20 (MWCO 30000) y Centricon® YM30.

Los concentrados fueron suplementados con 2,2 μ l de Tween 80 antes del IEF. El IEF se realizó en geles de poliacrilamida de 1 mm de grosor 5 T, 3% C conteniendo urea 7 M, anfolitos 2-4 al 2% y 4-6 al 2%, y sacarosa 5 g/100 mL. Tras el pre-enfoque a 250 V y 8 °C durante 30 min, utilizando anfolitos 6-8 al 2% y H₃PO₄ 0.5 M, las muestras fueron sumergidas en piezas rectangulares de papel de filtro y se aplicaron a 0.5 cm del extremo catódico del gel. La electroforesis se realizó en el sistema Multiphor II Electrophoresis System (Amersham-Pharmacia) a 1 W/cm de la longitud del gel. El ancho de la migración fue de 9 cm y la electroforesis se paró a 3600 Vh.

- Doble immunoblotting

Tras la separación de las diferentes isoformas por IEF, las proteínas fueron transferidas por electroblotting (0,8 mA/cm² gel, 30 min) a una membrana de fluoruro de polivinideno (PVDF) en un aparato de blotting semi-seco utilizando un tampón básico de transferencia (25mM Tris-192 mM glicina). Tras el blotting, las membranas fueron bloqueadas con leche (baja en grasa) al 5% y fueron incubadas con un anticuerpo murino monoclonal específico anti-EPO humana (clon AE7A5, R&D Systems).

El anticuerpo monoclonal fue transferido por electroblotting (0,8 mA/cm² gel, 10 min) a otra membrana de PVDF utilizando un tampón de transferencia ácido (ácido acético al 0.7%). Tras esto, la membrana de PVDF fue bloqueada con tinta Indian al 0.1% durante 1h e incubada con anticuerpos policlonales de cabra anti-ratón unidos a biotina durante 1 h. Finalmente, la membrana se incubó durante 1 h con peroxidasa (horseradish peroxidase) unida a estreptavidina (Biospa SPA).

- Detección quimioluminiscente

El complejo anticuerpo primario/anticuerpo secundario/estreptavidina peroxidasa fue detectado tras la adición del sustrato de la peroxidasa (Covalight™-CovalAB). La luz de quimioluminiscencia producida fue detectada utilizando una cámara analizadora de imagen (FUJIFILM Luminescent image analyzer LAS-1000) y transformada en una imagen computerizada por el programa informático Image Gauger 4.0.

Análisis de resultados

La determinación del área de las bandas de cada una de las muestras se realizó mediante el programa informático de análisis de imágenes Image Gauger 4.0. El efecto de la adaptación a HC-IHE de los atletas del grupo hipoxia sobre:

- Evaluación del abuso de rhEPO

El criterio de identificación descrito en el Documento Técnico de la WADA para la identificación de la epoetina alfa y beta (EPO) y Darbepoetina (NESP) (TD2004EPO) fue el utilizado para la determinación de una muestra sospechosa.

Previamente a la evaluación de las muestras, la imagen obtenida de la membrana se divide en tres áreas de referencia. El área básica y el área ácida se definen por la posición de las bandas de rhEPO y NESP, respectivamente. El área endógena se define como el espacio comprendido entre el área básica y el área ácida.

Según el criterio de identificación descrito en el Documento Técnico de la WADA, para considerar una muestra sospechosa de contener rhEPO, es necesario se cumplan tres condiciones:

- I. En el área básica deben haber al menos tres bandas aceptables y consecutivas asignadas como 1, 2, 3 ó 4 en la correspondiente preparación de referencia (Figura 5.2).
- II. Las dos bandas más intensas deben ser consecutivas y la banda más intensa debía ser la 1, 2, ó 3.
- III. Las dos bandas más intensas del área básica deben ser más intensas que ninguna otra banda en el área endógena.

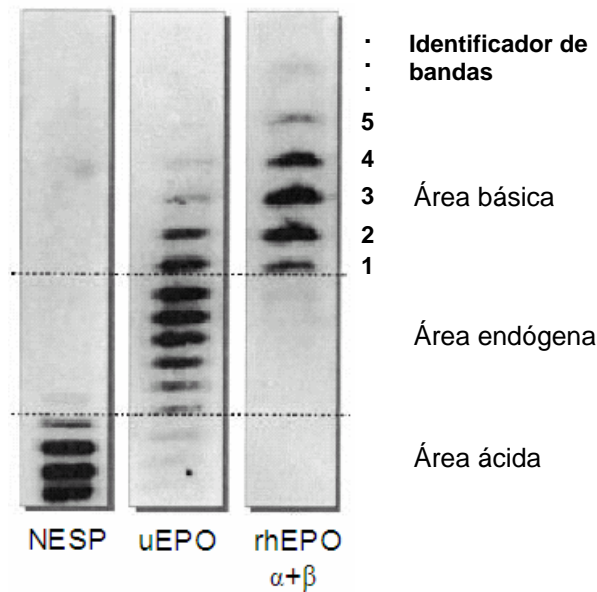


Figura 5.2: Imagen de tres carriles correspondientes al análisis de NESP, EPO urinaria (uEPO) y rhEPO α y β . Las líneas punteadas representan la separación entre las distintas áreas. Las áreas ácida y básica se encuentran definidas por la posición de las bandas de NESP y rhEPO, respectivamente; y, por exclusión, entre ellas se encuentra el área endógena. Las bandas del área básica están identificadas por números.

- Distribución del patrón de bandas de la EPO urinaria

La variabilidad de la distribución del patrón de bandas de la EPO urinaria se determinó mediante el cálculo del porcentaje de isoformas básicas para las distintas condiciones:

$$\% \text{ isoformas básicas} = \frac{\text{suma de las áreas de las isoformas básicas}}{\text{suma de las áreas de todas las isoformas}} \times 100$$

5.2.6. Análisis estadísticos

Tras los test de normalidad y variancia equivalente, el estudio de las diferencias para una misma variable entre grupos en las mismas condiciones experimentales se realizó mediante el análisis de la variancia (ANOVA) para un factor. La diferencia para una misma variable dentro de un mismo grupo de voluntarios en distintas condiciones experimentales se determinó mediante el análisis de la variancia (ANOVA) para medidas repetidas y el test *post-hoc* de Bonferroni. El test t-Student se aplicó para comparar resultados, dentro de un mismo grupo (grupo control), cuando los parámetros de estudio habían sido determinados sólo en dos ocasiones distintas.

Todos los cálculos estadísticos fueron realizados utilizando el paquete estadístico SPSS 2001 para Windows, versión 11.5.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

5.3. Resultados

5.3.1. Effects of intermittent hypobaric hypoxia exposure on aerobic capacity and running performance in triathletes

Ferran A. Rodríguez, Rosario Abellán, Daniel Moreno, José L. Sanz, Angel F. Remacha, José A. Pascual, Rosa Ventura, Jordi Segura. In. Van Praagh E., Coudert J. (eds.), *Proceedings of the 9th Annual Congress of the European Collage of Sport Science*, p. 111-112, 2004. Clermont-Ferrand, France: ECSS, Université Blaise Pascal, Université d'Auvergne.

5.3.2. Hematologic response to four weeks of intermittent hypobaric hypoxia in highly trained male triathlon athletes

Rosario Abellán, Ángel F. Remacha, Rosa Ventura, M. Pilar Sardà, Jordi Segura, Ferran A. Rodríguez. *Haematologica* 2004; 90: 126-127.

5.3.3. Intermittent hypoxia exposure in hypobaric chamber and EPO abuse interpretation

Rosario Abellán, Rosa Ventura, Ángel F. Remacha, Ferran A. Rodríguez, José Antonio Pascual, Jordi Segura. *Journal of Sports Science* 2006, en revisión.

Rodríguez F.A., Abellán R., Moreno D., Sanz J.L., Remacha A., Pascual J.A., Ventura R., Segura J. (2004) Effects of intermittent hypobaric hypoxia exposure on aerobic capacity and running performance in triathletes. In: Van Praagh E., Coudert J. (eds.), Proceedings of the 9th Annual Congress of the European College of Sport Science, p. 111-112. Clermont-Ferrand, France: ECSS, Université Blaise Pascal, Université d'Auvergne.

Effects of intermittent hypobaric hypoxia exposure on aerobic capacity and running performance in triathletes

Rodríguez F.A.¹, Abellán R.², Moreno D.¹, Sanz J.L.¹, Remacha A.³, Pascual J.A.², Ventura R.², Segura J.²

¹ Institut Nacional d'Educació Física de Catalunya, Unitat d'Hipobària INEFC-UB. Universitat de Barcelona, Spain.

² Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Departament de Farmacologia. Barcelona, Spain.

³ Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Departament d'Hematologia. Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.

Introduction

In previous studies, short-term intermittent hypoxia exposure (IHE) during 2-3 weeks combined with training at sea level has shown to improve aerobic capacity in trained subjects (Rodríguez et al. 1999), cycling performance in world-class track cyclists (Rodríguez et al. 2002), and middle-distance performance in trained swimmers (Rodríguez et al. 2003). This study investigated the effect of longer duration IHE (four weeks) combined with sea-level training on aerobic capacity and running performance in well trained triathletes.

Methods

Fourteen well-trained male triathletes participated in a randomised controlled trial. After giving their informed consent and initial testing, subjects were matched and randomly assigned to either hypoxia (HYPO) or normoxia (NORM) groups. The HYPO group combined training at sea level with resting exposure to hypoxia in a hypobaric chamber for 3 h/day, 5 days a week, for four weeks. Simulated altitude progressively increased from 4,000 up to 5,500 m (616-492 hPa, respectively). Before the intervention, immediately afterwards, and two weeks later, all subjects performed a graded running test in a synthetic 400-m track ($v_0=7 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1}$; $\Delta v=1 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1}$ every 2 min), the Université de Montreal Track Test (UMTT) in which velocity at VO_2max (or maximal aerobic speed, MAS) was determined (Léger & Boucher 1980). Before the intervention and one week afterwards, all subjects performed a maximal, incremental test on a running treadmill ($v_0=6 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1}$; $\Delta v=1 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1}$ every min; slope = 5%) with continuous monitoring of gas exchange parameters using a breath-by-breath cart (CPXII, Medical Graphics, USA). Ventilatory thresholds ($\text{AT}_{1\text{vent}}$, $\text{AT}_{2\text{vent}}$) were calculated from breath-by-breath ventilatory parameters. The test results before the intervention (Pre) were used for post-test comparison using MANOVA (general linear model) with main effects of test (Pre, Post, Post 1 week, Post 2 weeks), treatment (HYPO, NORM), and test-treatment interaction.

Results

Twelve subjects completed the study. A summary of the results of both field and laboratory tests are presented in the following table, in which data are mean \pm standard deviation.

	HYPO (n = 5)				NORM (n = 7)			
	Pre	Post	Post 1 wk	Post 2 wk	Pre	Post	Post 1 wk	Post 2 wk
MAS, $\text{km}\cdot\text{h}^{-1}$	16.4 \pm 1.3	16.4 \pm 1.3	–	16.4 \pm 0.9	16.0 \pm 0.8	15.8 \pm 0.5	–	16.0 \pm 0.8
VO_2max , $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	58.8 \pm 4.6	–	61.0 \pm 4.4	–	60.3 \pm 9.5	–	60.9 \pm 5.9	–
VO_2max , $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	4330 \pm 496	–	4399 \pm 483	–	4563 \pm 793	–	4569 \pm 571	–
VCO_2max , $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	5345 \pm 390	–	4882 \pm 359*	–	5465 \pm 804	–	5063 \pm 546	–
$\text{AT}_{1\text{vent}}$, % VO_2max	79.8 \pm 3.9	–	83.3 \pm 3.1	–	80.5 \pm 5.6	–	78.5 \pm 5.7	–
$\text{AT}_{2\text{vent}}$, % VO_2max	89.1 \pm 2.3	–	92.4 \pm 2.0**	–	94.5 \pm 2.7	–	91.6 \pm 2.9	–

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ compared with Pre

Discussion

The triathletes exposed to intermittent hypoxia, as compared with their counterparts in the control group, significantly increased their ventilatory threshold (+3.8%, MANOVA $p<0.001$). The HYPO group also reduced significantly their CO_2 production at maximal effort (–8.6%, $p=0.02$). However, we could not detect a significant difference in the change of VO_2max within or between groups, although a trend was observed in the HYPO group (+3.7%, $p=0.2$). These results are in contrast with previous studies in which VO_2max measured during swimming significantly increased after IHE of shorter duration (Rodríguez et al. 2003). Similarly, in contrast with the previously observed performance enhancement in an maximal 4-min track cycling test (Rodríguez et al. 2002), and 200-m swimming time trial (Rodríguez et al. 2003), this longer protocol of exposure to intermittent hypoxia (3 h/day, 5 days/wk, during 4 wks) did not show to improve running performance measured as maximal aerobic speed in the track. More research is needed to clarify the effect of different protocols of IHE on aerobic capacity and performance.

References

- Léger & Boucher (1980) *Can J Appl Sports Sci* 5: 77-84.
 Rodríguez FA, Casas H, Casas M (1999) *Med Sci Sports Exerc* 31(2): 264-268.
 Rodríguez FA, Cabanes T, Iglesias X (2002) *7th Annual Congress of the ECSS, vol 1:83*.
 Rodríguez FA, Murio J, Ventura JL (2003) *Med Sci Sports Exerc* 35(5):S115.

Acknowledgements

This study was funded by Ministerio de Sanidad y Consumo (FIS grant 01/1328) and INEFC. D. Moreno is a research scholar at INEFC-Barcelona.

Letters to the Editor

Red Cell Disorders

Hematologic response to four weeks of intermittent hypobaric hypoxia in highly trained athletes

We investigated changes induced by four weeks of intermittent hypobaric hypoxia (IHH) at a simulated altitude of 4000-5500 m in highly trained athletes. Serum erythropoietin increased significantly ($p < 0.001$) after the sessions of IHH, but reticulocyte and red cell parameters did not. Our IHH protocol stimulated endogenous erythropoietin secretion without producing the subsequent erythropoietic response.

haematologica 2005; 90:126-127

http://www.haematologica.org/journal/2005/1/126

One of the main features of acclimatization to altitude is an increase in hemoglobin, which is responsible for improving work capacity by increasing the oxygen-carrying capacity of the blood. Short-term intermittent hypobaric hypoxia (IHH) protocols (1.5-3h/day for 2-3 weeks) have been shown to elicit acclimatization and hematologic adaptations in mountaineers and physically active individuals.^{1,2}

Our aim was to test whether medium-term IHH stimulates erythropoiesis in highly trained athletes. In this regard, 16 male triathletes were randomly assigned to either the hypoxia (HYPO, n=8) or the control (n=8) group. The HYPO group combined training at sea level

with exposure to IHH (3 h/day, 5 days a week, for 4 weeks). The simulated altitude increased from 4,000 up to 5,500 m or 614-504 hPa. Three venous blood samples were drawn: t1= before the first exposure to the hypobaric chamber, t2= before the last exposure, t3= 2 weeks after the last exposure. To study the acute effect of hypoxia, samples were also obtained 3 hours after the first (t1') and the last (t2') exposures. Blood cell counts and reticulocyte parameters were analyzed using a Sysmex XE-2100 autoanalyzer, including RBC-Y and RET-Y. Serum erythropoietin (Epo) was measured using an immunoassay (Quantikine, R&D Systems). Total plasma and red-cell volumes,³ serum transferrin receptor, haptoglobin, and iron parameters were also evaluated.

In the HYPO group, a significant increase in serum Epo was observed after chamber exposure (100 and 440%, at t1' and t2', respectively). No changes were observed in the control group. However, no significant differences were found in any of the other parameters. During the IHH, the basal Epo level only decreased as compared with the initial situation in the HYPO group. Reticulocyte parameters, RBC-Y and RET-Y showed significant differences, but these differences occurred in both groups. Moreover, IHH significantly increased lymphocyte and monocyte counts (Table 1 and Figure 1).

The most relevant result was that IHH stimulated Epo secretion without an effective erythropoietic response. The Epo increase after a single exposure to hypoxia has been previously demonstrated.^{2,4} This study adds two new observations: a) a brief (180 min) exposure to hypoxia increases Epo secretion; b) this response is not blunted over a four-week period, even if the baseline Epo level decreases. The use of IHH is based on the assump-

Table 1. Hematologic characteristics before (Pre) and after (Post 1, 2) four weeks of exposure to intermittent hypobaric hypoxia (3 h/d, 5 d/wk, 4000 - 5500 m) in the HYPO and control groups. Time of sampling is indicated: t: before the first chamber exposure, t': 3 hours after the first exposure. t: before the last exposure, t': 3 hours after the last exposure. t: 2 weeks after the last exposure.

	CON t ₁	Pre HYPO t ₁	HYPO t ₁ '	CON t ₂	Post 1 HYPO t ₂	HYPO t ₂ '	Post 2 HYPO t ₂
Epo (U/L)	10.7±3.1	8.3±3.2	16.6±4.7*	10.8±2.8	4.6±1.4+	24.8±9.3*+	9.2±3.2+
Hemoglobin (g/L)	150±13	146±3	143±8	143±11+	139±4+	143±7*	135±5+
Reticulocytes (×10 ⁹ /L)	40.8±10.9	37.9±9.5	41.0±12.7	45.8±12.9	34.1±11.4	35.6±12.1	33.8±7.7
IRF (%)	9.1±3.0	9.7±3.3	10.7±4.3	2.9±1.4+	1.5±0.9+	2.1±1.1+	3.0±1.5+
RBC-Y (units)	162.8±3.4	163.2±3.0	162.9±2.7	171.2±3.0+	172.1±3.0+	171.3±3.8+	-
RET-Y (units)	1740±36	1750±35	1742±35	1803±44+	1833±36+	1818±35*	-
Plasma volume (mL/m ²)	2108±228	1993±261	-	2393±395	2191±749	-	2106±452
Red cell volume (mL/m ²)	1399±157	1285±173	-	1515±192	1290±379	-	1186±214
sTfR (mg/L)	3.5±0.3	3.5±0.4	3.3±0.3*	3.3±0.4	3.1±0.3	3.2±0.4*+	2.9±0.3+
Platelets (×10 ⁹ /L)	230.5±19.7	207.3±28.9	211.4±29.0	223.8±24.1	217.0±33.5	227.5±38.3	204.5±25.5
Leukocytes (×10 ⁹ /L)	7.5±1.9	7.7±2.3	8.2±1.2	6.5±1.5	7.1±1.1	8.6±1.2*	6.9±1.0
Lymphocytes (×10 ⁹ /L)	2.5±0.5	2.1±0.4	3.2±0.7*	2.1±0.4	2.0±0.3	2.7±0.5*	2.0±0.4
Monocytes (×10 ⁹ /L)	0.6±0.2	0.5±0.1	0.7±0.1*	0.5±0.2	0.5±0.1	0.7±0.2*	0.5±0.1

Values are means ± SD. IRF: immature reticulocyte fraction. RBC-Y and RET-Y are expressed on arbitrary units provided by the Sysmex XE-2100. Erythropoietin (Epo), soluble transferrin receptor (sTfR), +p < 0.05 different from the initial sea level value (t1 vs t2) (Student's post-hoc test); *p < 0.05 different from the respective pre-chamber exposure value (Student's post-hoc test).

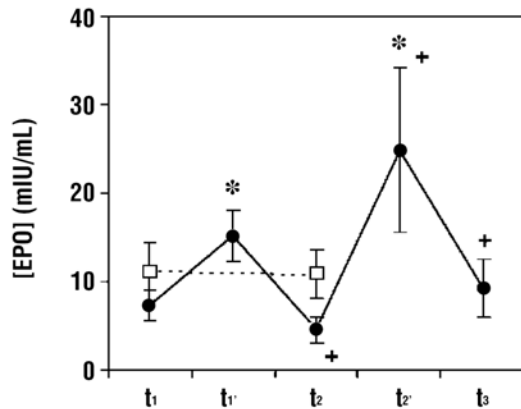


Figure 1. Changes in serum erythropoietin concentration of male triathlon athletes resting at a simulated altitude of 4000 and 5500 m for 3 hours, and along four weeks of exposure to intermittent hypobaric hypoxia. Filled circles represent the values of serum Epo in the HYPO group and open squares those of the control group at sea level. t₁: before the first chamber exposure, t_{1'}: 3 hours after the first exposure, t₂: before the last exposure, t_{2'}: 3 hours after the last exposure, t₃: 2 weeks after the last exposure. Values are mean \pm SD. †p<0.05 different from the initial sea level value (Student's t post hoc test); *p<0.05 different from the pre-chamber exposure value (Student's t post-hoc test).

tion that when the rise in Epo secretion is maintained, erythropoiesis will be further stimulated and this will lead to an increase in hemoglobin and red cell mass. However, previous studies both support and refute this hypothesis. Repeated exposure to IHH significantly elevated Epo,^{2,4} hemoglobin, and reticulocytes in some studies.^{1,2} In contrast, in competitive athletes, neither training nor being passively exposed to normobaric hypoxia increased Epo levels,⁵ or induced erythropoietic adaptation.⁶

Our study indicates that triggering Epo production does not always activate erythropoiesis.⁶ When high-altitude natives or sojourners return to sea level, there is suppression of Epo production, a reduction of erythroid precursors, and a decrease in red cell survival. This phenomenon has been termed *neocytolysis*, and may be the consequence of rapid destruction of hypoxia-inducible factor 1 α .⁷ Neocytolysis may compromise the ability of short duration IHH to induce an increase in red cell mass.⁷

The anti-apoptotic effect of Epo is necessary for the differentiation of erythroid precursors into mature red cells.⁸ The response to the increase in Epo seemed to be different in our athletes, in whom red cell and plasma volumes were increased,⁹ from that in climbers and active subjects.^{1,2} The lack of an erythropoietic effect may also suggest that the threshold of Epo could depend on the previous red cell mass. Furthermore, the duration of the hypoxia/normoxia cycle, the magnitude of adaptation to training, and neocytolysis may play integrated roles in the increase of the erythroid mass after IHH. Our IHH scheme was not able to increase the erythroid mass despite triggering Epo secretion. Our results also raise the question of whether this Epo stimulation could interfere

with indirect Epo-abuse detection.¹⁰ Direct distinction of Epo isoforms in urine (current anti-doping detection method) will probably not be affected. Ongoing research will clarify these aspects.

In summary, IHH (4000-5500 m, 3 h/day, 5 days/week over 4 weeks) stimulates endogenous Epo secretion without producing the subsequent erythropoietic response in highly trained athletes, in contrast to its effects in climbers and in active, healthy individuals.

Rosario Abellán,*^o Angel F. Remacha,* Rosa Ventura,*^o M. Pilar Sardà,* Jordi Segura,*^o Ferran A. Rodríguez*

*Unitat de Recerca en Farmacologia, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, C/ Doctor Aiguader 80, 08003 Barcelona; ^oDepartament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, C/ Doctor Aiguader 80, 08003 Barcelona; *Departament d'Hematologia, Hospital de Sant Pau, C/ Sant Antoni M^a Claret 167, 08025 Barcelona; ^oUnitat d'Hipobària INEFC-UB, Institut Nacional d'Educació Física de Catalunya, Universitat de Barcelona, Av. de l'Estadi s/n (Anella Olímpica de Montjuïc), 08038 Barcelona, Spain

Acknowledgments: we acknowledge the collaboration of Daniel Moreno, José Luis Sanz, Arnau Florit, Núria Guitart, and Núria Fort in recruiting subjects and collecting data for the study. The authors are also indebted to the triathletes, who served as experimental subjects.

Funding: this study was supported by: Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo de España (FIS01/1328).

Key words: erythropoietin, intermittent hypoxia, reticulocytes, training, soluble transferrin receptor.

Correspondence: Dr. Angel F. Remacha, Departament, Hematologia, Hospital de Sant Pau, C/ Sant Antoni M^a Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. Phone: international +34.93.2919000. Fax: international +34.93.2919192. E-mail: aremacha@hsp.santpau.es

References

- Rodríguez FA. Intermittent hypoxia: an alternative to acclimatization to high altitude and enhancement of athletic performance? *Am J Med Sports* 2002;4:385-91.
- Rodríguez FA, Ventura JL, Casas M, Casas H, Pages T, Rama R, et al. Erythropoietin acute reaction and haematological adaptations to short, intermittent hypobaric hypoxia. *Eur J Appl Physiol* 2000;82:170-7.
- Mollison PL. *Transfusion in clinical medicine*. Blackwell Sci Pub Oxford; 1983. p. 121-4.
- Eckardt KU, Boutellier U, Kurtz A, Schopen M, Koller EA, Bauer C. Rate of erythropoietin formation in humans in response to acute hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol* 1989; 66:1785-8.
- Vallier J M, Chateau P, Guezennec CY. Effects of physical training in a hypobaric chamber in the physical performance of competitive triathletes. *Eur J Appl Physiol* 1996;73:471-8.
- Julian CG, Gore CJ, Wilber RL, Daniels JT, Fredericson M, Stray-Gundersen J, et al. Intermittent normobaric hypoxia does not alter performance or erythropoietic markers in highly trained distance runners. *J Appl Physiol* 2004;96:1800-7.
- Rice L, Ruiz W, Driscoll T, Whitley CE, Tapia R, Hachey DL, et al. Neocytolysis on descent from altitude: a newly recognized mechanism for the control of red cell mass. *Ann Intern Med* 2001;134:652-6.
- Cazzola M, Mercuriali F, Brugnara C. Use of recombinant human erythropoietin outside the setting of uremia. *Blood* 1997;89:4248-67.
- Remacha AF, Ordoñez J, Barceló MJ, García-Die F, Arza B, Estruch A. Evaluation of erythropoietin in endurance runners. *Haematologica* 1994;79:50-2.
- Parisotto R, Wu M, Ashenden MJ, Emslie KR, Gore CJ, Howe C, et al. Detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes utilizing markers of altered erythropoiesis. *Haematologica* 2001;86:128-37.

Original article

Intermittent hypoxia exposure in hypobaric chamber and EPO abuse interpretation

Rosario Abellan^{1,2}, Rosa Ventura^{1,2}, Angel F. Remacha³, Ferran A. Rodríguez⁴, Jose A. Pascual^{1,2}, Jordi Segura^{1,2*}.

¹ Pharmacology Research Unit, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, IMIM. Doctor Aiguader 80. 08003-Barcelona, Spain; ² Department of Experimental and Health Sciences, University Pompeu Fabra, UPF. Doctor Aiguader 80. 08003 Barcelona, Spain; ³ Department of Haematology, Hospital de Sant Pau. Sant Antoni M^a Claret, 167. 08025-Barcelona, Spain; ⁴ Hypobaric Unit, Institut Nacional d'Educació Física de Catalunya- University of Barcelona, INEF-CUB. Av. de l'Estadi s/n. 08038-Barcelona, Spain.

* Corresponding author: Jordi Segura, PhD

Telephone no. +34-93-2211009, fax +34-93-2213237, e-mail: jsegura@imim.es.

Running title: Doping aspects of intermittent hypoxia exposure.

Keywords: Doping detection; erythropoietin; simulated altitude; isoelectric focusing.

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the effect of intermittent hypoxic exposure (IHE) using a hypobaric chamber on direct and indirect methods used to evaluate recombinant human EPO (rhEPO) misuse.

Sixteen male triathletes were randomly assigned to either the IHE group (H) or the control normoxic group (C). The H group was exposed to simulated altitude (from 4,000 up to 5,500 m; 3 h/day, 5 days/week, for 4 weeks). Blood and urine samples were collected before and after the first and the last exposures, and two weeks after the last exposure.

While serum EPO significantly increased after hypoxic exposures (from 8.3 ± 3.2 to 16.6 ± 4.7 and from 4.6 ± 1.4 to 24.8 ± 9.3 at the first and the last exposures, respectively); haemoglobin, percentage of reticulocytes and soluble transferrin receptor were not elevated. Second-generation ON/OFF models (indirect rhEPO misuse detection) were insensitive to IHE. The distribution of the urinary EPO isoelectric profiles (direct rhEPO misuse detection) was altered after IHE with a slight shift towards more basic isoforms. However, those shifts never produced misinterpretation of results.

The IHE protocol studied did not produce any false positive result for indirect or direct detection of rhEPO misuse in spite of the changes in EPO serum concentrations and urinary EPO isoelectric profiles, respectively.

INTRODUCTION

The administration of recombinant human erythropoietin (rhEPO) or its analogues (i.e. darbepoetin, NESP) is used to artificially stimulate the erythropoietic system, increasing the red blood cell mass and providing a performance enhancement (Ashenden et al., 2001; Varlet-Marie et al., 2003). Their use is banned by the World Anti-Doping Agency (WADA) as well as major sports authorities and detection of such administration leads to sanctions. In order to get advantage of EPO stimulation but without the prohibited administration of rhEPO, different altitude training modalities have proliferated. Most of them try to enable athletes to optimize the stimuli necessary to improve oxygen delivery while avoiding the detraining effects associated with chronic hypoxia (Ashenden et al., 2000; Stray-Gundersen et al., 2001; Katayama et al., 2003; Julian et al., 2004; Savourey et al., 2004; Lundby et al., 2005). To which extent those different protocols might trigger an adverse analytical finding for erroneous suspicion of rhEPO abuse is an important matter.

One approach aimed to detect rhEPO abuse is focused on the effect of rhEPO treatments on physiological parameters and is known as “indirect method”. It is based on mathematical models using combinations of haematological parameters (markers) sensitive to variations in erythropoiesis. The indirect method attempts to indicate current (ON-model) or recently discontinued (OFF-model) rhEPO administration (Gore et al., 2003). The effect of hypoxia on indirect models of rhEPO abuse has been previously investigated following different real and simulated altitude protocols (Ashenden et al., 2003, 2004a); however, the effects of short severe hypoxia exposures using hypobaric chambers has not been studied before.

Another approach to detect rhEPO administration, known as the “direct method”, is addressed to evidence the presence of rhEPO by differentiating it from the natural EPO (Wide et al., 1995; Lasne, 2001; Lasne et al., 2002; Breidbach et al., 2003). The method currently applied according to the World Antidoping Agency (WADA) is performed on urine samples and is based on the differences of the isoelectric focusing (IEF) profile between the exogenous rhEPO and endogenous EPO (WADA TD2004EPO, 2005). Those differences are supposed to mainly reflect charge differences linked to glycosylation.

Little is known on the potential physiological or environmental causes that may affect glycosylation of proteins, but abnormal physiological states or diseases may have an impact (Iourin et al., 1996; Jorgensen et al., 1998; Saez-Valero et al., 2000). In a previous study, the presence of less negatively charged forms of serum EPO was suggested in patients with polycythaemia vera and healthy newborn infants compared to healthy adult subjects (Wide and

Bengtsson, 1990). Similarly, it has been described a small shift in the IEF profiles of urinary EPO towards more basic isoforms in post-exercise conditions compared to those in rest conditions (Nelson et al., 2004). Besides, the rate of secretion of a particular protein may influence its final glycosylation outcome since rate limiting steps may occur (Rudd and Dwek, 1997). This fact has been suggested for example in aplastic anaemia where the production of EPO is increased dramatically (Skibeli et al., 2001). It is important to note that the rate of EPO production at high altitude is also increased and therefore a potential effect of hypoxia on EPO glycosylation cannot be excluded. The fact that no genetic determinants have been found to explain the variable EPO response of different individuals to high altitude (Jedlickova et al., 2003) might further support some role for non-genetically encoded processes, such as glycosylation, to explain subjects' variability.

Altitude training has been a popular ergogenic method among athletes in the last decades (Wilber, 2004). A promising technique for administering short term hypoxia combined with sea-level training has been proposed as a method to stimulate red blood cell production and aerobic performance (Savoirey et al., 1994, 1996; Rodríguez et al., 1999; Casas et al., 2000). This method, termed "intermittent hypoxia exposure" (IHE), applies severe hypoxia at rest for 1.5 to 5 h per day, for 2-3 weeks by using a hypobaric chamber. The rationale of IHE is partly based on the observation that brief exposures to relatively high levels of hypoxia stimulate the release of EPO in humans (Eckardt et al., 1989; Knaupp et al., 1992; Savoirey et al., 1994, 1996; Rodríguez et al., 2002). A preliminary approach to study the potential effect of hypoxia on the charge distribution profile of natural serum EPO has been studied under normobaric hypoxic conditions (Berglund et al., 2003). Although results did not suggest a clear effect of the protocols of overnight normobaric moderate hypoxia exposure on the charge heterogeneity of EPO, the effect of daily brief exposures to severe hypoxia using a hypobaric chamber on the endogenous EPO glycoforms requires further attention.

In order to prevent any potential misinterpretation of analytical results of athletes being submitted to such IHE protocols as presumptive rhEPO users, some further investigations appear necessary. The aim of the present work was to study how changes associated with adaptation to IHE among highly trained athletes could affect the parameters involved in the interpretation of those (direct and indirect) methods currently used to evaluate potential rhEPO misuse.

METHODS

Subjects

Sixteen healthy, highly trained male triathletes (age 27 ± 6 (mean \pm SD) years old, range 19-37 years; body mass 74 ± 4 kg, range 66-84 kg; body height 177 ± 4 cm, range 172-185 cm) participated in a randomized, controlled trial. After giving their informed consent, they were randomly assigned to the hypobaric chamber intermittent hypoxic exposure group (H, $n=8$) or the control normoxic group (C, $n=8$). All subjects had been in regular training (range: 7-25 h·week⁻¹) and competition at national level and continued to train throughout the study.

To prevent iron deficiency and oxidative stress, all subjects were given oral iron and antioxidant vitamins supplementation to ensure an adequate iron, mineral, and antioxidant vitamin status throughout the study. The standard supplements were: iron lactate (157 mg/day in one daily dose; calcium folinate, 2.16 mg/day in two daily doses; ascorbic acid (vitamin C), 1 g/day in one daily dose; dl- α -tocopherol acetate (vitamin E), 400 mg/day in one daily dose; and magnesium lactate, 1.5 g/day in three daily doses.

The protocol of the study was approved by the Local Ethics Committee of Clinical Research and it was in accordance with the Helsinki Declaration.

Experimental design

The H group combined training at sea level with resting exposure to hypoxia in a hypobaric chamber for 3 h/day, 5 days a week, for four weeks (Figure 1). In the first four sessions simulated altitude was progressively increased from 4000 m (barometric pressure 614 hPa), to 4500 m (575 hPa), to 5000 m (540 hPa), and to 5500 m (504 hPa); and kept at 5500 m in the sixteen subsequent sessions. Accordingly, chamber oxygen tension (PO_2) ranged from 129 to 105 hPa along the program. During the sessions, subjects entered the chamber at 04:00 pm, ascended during 10-15 min to the target simulated altitude, stayed there awake and at rest for 3 h, and then descended back to sea-level pressure during 10-15 min. The C group followed the same training-resting protocol but remained all the time in ambient normobaric normoxic conditions.

In normoxia and after 20-min horizontal rest, three venous blood samples were drawn in three different occasions: t_1 = immediately before the first chamber exposure, t_{26} = immediately before the last exposure, t_{39} = 2 weeks after the last exposure. To study the acute effect of severe hypobaric hypoxia, samples were obtained in the H group 3 hours after finishing the first (t_1) and the last (t_{26}) exposures. Blood was taken from the antecubital vein and all samples were

obtained without stasis using plastic vacuum syringes, and immediately placed at 4°C in K₃EDTA (for cell counts) or in serum gel tubes. At the same occasions, urine samples were collected.

All blood and urine samples collected were codified in order to assure their blind analysis.

Analytical methods

Whole blood samples were maintained at 4°C until analysis. Blood cell counts and reticulocyte parameters were analyzed within 20 h of blood collection using a Sysmex XE-2100 autoanalyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Apart from conventional haemoglobin concentration (Hb), haematocrit and reticulocyte parameters, fluorescence subpopulations of reticulocytes were measured to determine immature reticulocyte fractions (IRF).

For biochemical analysis, blood samples collected in active-coating gel tubes were centrifuged and sera were stored at -20°C until all variables were assessed (up to 4 months). Serum EPO and soluble transferrin receptor (sTfR) concentrations were measured using immunoassays, the Quantikine IVD Human EPO ELISA (R& D Systems, Minneapolis, USA), and the Tina-quant sTfR immunoturbidimetric assay (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) using the automated analyser Hitachi 911, respectively.

Mathematical models for indirect rhEPO detection

Second-generation mathematical models (ON he, ON hes, OFF hr and OFF hre) developed by Gore et al. (2003) were applied. These models had been described for detecting rhEPO misuse during treatment (ON models) or recent discontinued administration (OFF models), using concentrations of Hb, EPO, sTfR, as well as percentage of reticulocytes.

$$\text{ON he} = \text{Hb} + 9.74 \ln[\text{EPO}] \quad \text{ON hes} = \text{Hb} + 6.62 \ln[\text{EPO}] + 19.4 \ln[\text{sTfR}]$$

$$\text{OFF hr} = \text{Hb} - 60\sqrt{\%ret} \quad \text{OFF hre} = \text{Hb} - 50\sqrt{\%ret} - 7 \ln[\text{EPO}]$$

As Hb and reticulocytes were measured using a haematological autoanalyser Sysmex XE-2100 (Roche Diagnostics) and not the Advia 120 (Bayer), used in the development of those models (Gore et al., 2003), an experiment was carried out to evaluate the inter-instrument bias using 82 human blood samples from haematological patients. A constant bias was detected using the Passing and Bablok method (1983). The least square linear regressions obtained were: $\text{Hb}_{\text{Advia}} = 1.01 \text{Hb}_{\text{Sysmex}} + 0.02$ ($r^2 = 1.00$, $\text{SEE} = 0.13$) and $\%ret_{\text{Advia}} = 1.09 \%ret_{\text{Sysmex}} - 0.06$ ($r^2 = 0.84$,

SEE=18.7). Results obtained with Sysmex XE-2100 were corrected according to these equations before applying the mathematical models.

Similarly, the immunoassays used to measure serum EPO and sTfR were also different from those used in the development of the mathematical models (Gore et al., 2003); therefore, EPO and sTfR values were transformed using the inter-technique correlation equations described elsewhere (Abellan et al., 2004a,b).

Isoelectric focusing (IEF) for direct rhEPO detection

The urinary EPO test was based on that described by Lasne and coworkers (Lasne, 2001; Lasne et al., 2002). In brief, 20 mL of urine were subjected to ultrafiltration, and the retentate (ca. 20 μ L) containing EPO was applied in an IEF gel (pH 2-6). The blotted isoforms were incubated with specific monoclonal antibody, subsequently blotted and visualized by chemiluminescence. The emitted light was captured with an image analyzer chamber (FUJIFILM Luminescent image analyzer LAS-1000) and transformed in a computerised image through out a software program (Image Reader LAS-1000 Pro, ver. 2.1).

After quantifying bands intensity, the criteria described in the WADA Technical Document for the identification of Epoetin alfa and beta (rEPO) and Darbeoetin alfa (NESP) were used (WADA TD2004EPO, 2005). In summary, the final isoelectric gel image is divided in three areas: basic and acidic areas are defined by the position of the bands corresponding to rhEPO and NESP, respectively, and by exclusion, the endogenous area is defined in between. The identification of the presence of the recombinant substances is essentially based on the position of the most intense bands being localized in basic or acid areas.

Moreover, isoelectric profiles were visually evaluated in order to study the possible effect of the IHE protocol on the urinary EPO isoelectric profile. The percentage of basic isoforms (sum of the intensity of the bands in the basic area with respect to all bands) was also determined as a rough descriptor of the distribution of bands in the overall profile.

Statistics

The time effect on serial biochemical or haematological determinations was analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures and post-hoc Bonferroni test, following normality and equal variance tests. The Student t-test was used to compare results, inside the same group (control group), due to those parameters were only measured in two different conditions. All statistical calculations were performed using the statistical package SPSS 2001 for

Windows, version 11.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Exact P-values are generally given and P-values < 0.05 were considered to be significant. Unless otherwise indicated, values are expressed as mean \pm standard deviation.

RESULTS

From the initial sixteen triathlon athletes, fourteen (H n=6 and C n=8) successfully completed the protocol while the other two voluntarily dropped out from the study after 4 and 6 IHE sessions, respectively. Haematological variables and erythropoietic serum markers are listed in Table 1. Before the chamber sessions, no differences were found between the two groups (C t_1 vs H t_1). In the H group, a significant increase in the level of serum EPO was observed after chamber sessions ($t_{1'}$ vs t_1 and $t_{26'}$ vs t_{26} , $P < 0.012$ and $P = 0.027$, respectively). After chamber sessions ($t_{1'}$ vs t_1 and $t_{26'}$ vs t_{26}), no differences were observed for any of the other haematological parameters studied (Table 1). No differences were observed for serum EPO levels before exposure between first and last chamber sessions (t_1 vs t_{26}) in neither the H group nor the C group. Only IRF showed significant differences between first and last chamber sessions (t_1 vs t_{26}), but these differences occurred in both groups.

Regarding ON/OFF models, individual scores of triathlon athletes for each model are shown in Figure 2. Before the first chamber sessions (t_1), no differences were found between the two groups (C vs H) in any of the models studied. Between first and last chamber sessions before exposure (t_{26} vs t_1), ON he model scores showed a significant decrease in both groups. Moreover, the decrease was observed in the score of both ON models two weeks after the last exposure (H group, t_{39} vs t_{26} , $P < 0.03$). In the H group, a significant increase was observed in the score of ON he model after the last chamber session ($t_{26'}$ vs t_{26} , $P = 0.010$), due to EPO increase. For the OFF models, no significant differences were observed in any occasion.

While all athletes' scores were below the threshold corresponding to 1:1000 (random chance for one false positive in one thousand cases) for OFF models, one athlete obtained an individual score above the threshold of 1:100 for ON models (Gore et al., 2003). Also for ON models, only two volunteers, one from the C and one from the H group, obtained individual scores located above the 1:10 (1 in 10 false-positive rate for worst-case male endurance athletes at sea level) threshold. The C volunteer showed the highest Hb concentration values (17.5 and 16.7 g/dL in t_1 and t_{26} , respectively); and the H volunteer showed, at $t_{26'}$, a high value of Hb concentration (15.6 g/dL) and the highest EPO concentration observed after chamber exposure (52.0 IU/L). For OFF models, similarly, only two volunteers, the same previously mentioned from the C group and another one from the H group, obtained individual scores located above the 1:10

threshold. The H volunteer showed, at t_1 , a relatively high value of Hb concentration (14.8 g/dL) and a low value of percentage of reticulocytes (0.5%).

From two of the urinary samples (volunteers nº 2 and 5 at t_{26}) we obtained bands with a very low intensity that were below the limit of detection of the method (Table 2). For the rest of the urinary samples studied, the analysis of the urinary EPO isoelectric profiles showed that none of them could have been evaluated as containing rhEPO or NESP. Considering the values of the percentage of basic isoforms (Table 2), an increase was found as a result of the hypoxia exposure only in the sample taken after four weeks of repeated treatment (t_{26}). Conversely, no noticeable differences were found between the samples taken before and after the first chamber session (t_1 vs $t_{1'}$) nor among all samples taken before exposure or two weeks after the last exposure (t_1 , t_{26} and t_{39}). The IEF analysis of the samples corresponding to volunteer nº 1 from the H group is shown as a representative example in Figure 3.

DISCUSION

Exposure to hypobaric hypoxia has been related to an increase in circulating serum EPO, usually followed by an increase in red blood cell mass (Savourey et al., 1994, 1996, 2004; Stray-Gundersen et al., 2001; Heinicke et al., 2003). However, our IHE study in highly trained athletes suggests that those effects may depend on the protocol followed. The main change observed after IHE was an increase in serum EPO (range of 70 to 205% after the first IHE and 331 to 933% after the last IHE). Nevertheless, markers of accelerated erythropoiesis, such as percentage of reticulocytes and serum transferrin receptor concentrations, showed no indication of an increase, despite the high serum EPO concentration increase, indicating a non-effective erythropoietic response. In a previous study, using intermittent normobaric hypoxia exposure, similar findings have been shown (Ashenden et al., 2000). After one night of exposure to a simulated altitude of 2,650 m, and an increase of 57% in serum EPO levels, no erythropoietic response was observed. In contrast, increases of serum EPO of 62-770% produced an increase in Hb, red cell mass and/or reticulocytes levels during exposure to actual and simulated altitudes of 2,500-8,500 m (Savourey et al., 1994, 1996, 2004; Stray-Gundersen et al., 2001; Heinicke et al., 2003). The restoration of EPO baseline concentrations observed in pre-hypoxic exposure conditions between first and last chamber sessions indicates that the post-exposure EPO increments observed were transient. Those results coincided with previous studies of IHE where EPO concentrations remained unchanged between chamber sessions (Katayama et al., 2003; Lundby et al., 2005). Therefore, the lack of an erythropoietic effect suggests that not only the increase of EPO concentrations, but also the duration of the hypoxia/normoxia cycle and the

magnitude of adaptation to training, play an important role in the subsequent response (Rusko et al., 2003).

Before applying mathematical ON and OFF models for indirect detection of rhEPO misuse (Gore et al., 2003), results obtained for the selected biomarkers were transformed to correct for instrument bias (Abellan et al., 2004a,b). Although the lack of standardization of reticulocytes analysis makes its use as a biomarker difficult, it is of particular interest since it has already been adopted by some sport federations (FIFA, IAAF, ISU, and UCI). A previous study suggested an approach to quantify instrument bias (Ashenden et al., 2004b). However, this approach had its main difficulty in obtaining blood samples from at least 54 male endurance athletes, at one location at sea level, on the same day. This limitation led us to carry out an inter-instrument validation using blood samples chosen from patients with haematological pathologies in order to have reticulocyte values throughout the calibration ranges. As in a previous study (Ashenden et al., 2004b), a constant bias was observed between Sysmex XT 2100 and Advia 120 instruments with slightly higher values for the latter.

Regarding indirect detection of rhEPO misuse, the increase in serum EPO concentrations observed after IHE, not followed by an erythropoietic response, seemed not to be strong enough to modify the final score when mathematical ON and OFF models were applied. In both groups (H and C), a decrease in ON model scores was observed at t_{26} compared to t_1 (Figure 2), which were mainly the consequence of the decrease in Hb concentrations (Table 1). Moreover, in the H group, this effect was maintained two weeks after finishing the exposure protocol (t_{39}). Contradictory data on the effect of altitude hypoxia on blood model scores have been published (Ashenden et al., 2003, 2004a). In addition to gender and sport differences between cohorts, differences in altitude protocols and sample collection times make the comparison between them difficult. In two groups of male cyclists a significant increase in ON and OFF model scores was observed after actual altitude exposure (Ashenden et al., 2003). However, in female rowers under actual altitude exposure (Ashenden et al., 2004a) and in three groups of male athletes exposed to simulated altitude in normobaric conditions (Ashenden et al., 2003) no differences were found. Different individual responses to hypoxia (Jedlickova et al., 2003) and different hypoxic protocols followed seem to be the reason for the disparity of the results (Ashenden et al., 2003, 2004a). In some studies, and similarly to our results, the lack of an appropriate erythropoietic stimulation, on which second-generation ON/OFF models are based, appears as the main reason why those second-generation ON/OFF models were not modified.

Regarding to the score thresholds, only one triathlete from the C group in our study exceeded the 1 in 100 threshold, whilst it has been shown that 50-80% of athletes exceed this level during

treatment with various doses of rhEPO (Gore et al., 2003). Regardless the exposure or not to IHE, high natural Hb concentrations in some individuals appear as the reason to approach the threshold values of model scores. To assure that the high Hb observed was not produced by an exogenous administration, the direct method for detection of rhEPO and NESP was performed, and the absence of artificial haematopoietic activators in urine was confirmed. Although indirect models could be subjected to misinterpretation due to the effect of pathological or environmental variables (Ashenden et al., 2003; Parisotto et al., 2003), their quick and relatively cheap procedure makes them useful as screening method. Nowadays, some international federations (e.g., UCI, IAAF, ISU) are using the haemoglobin concentration and percentage of reticulocytes, together with the OFF he indirect model, in their blood tests for medical safety control. Moreover, the Australian National Anti-Doping Organization is carrying out a longitudinal study of athletes' haematological variables and indirect models score with the aim to detect athletes with non-physiologic increases in their red cell production.

In regards to the direct method for detection of rhEPO abuse, changes in protein glycosylation patterns may occur when the transit time through the glycosylation pathway is altered (Rudd and Dwek, 1997). Thus, modifications in the structure of glycans in endogenous EPO could potentially result from the increased production rate of EPO caused by hypoxia. Of particular relevance would be a reduction of the number of sialic acids attached to the structure resulting in a modified profile that could become closer to the one assigned to rhEPO. Few studies can be found in the literature about changes in EPO isoforms distribution. Differences in molecular charge of serum EPO have been observed in healthy newborn infants and patients with polycythaemia vera compared to healthy adults (Wide and Bengtsson, 1990). In both cases, serum EPO isoelectric profile was less negatively charged. To our knowledge, only one study has been published on EPO electrophoretic mobility and was after a normobaric hypoxic stimulation protocol (Berglund et al., 2003). In that study, although serum EPO levels increased, no effect was observed in the electrophoretic mobility of serum EPO isoforms. Under our IHE protocol and after four weeks of repeated hypoxic exposures, the stimulus produced a shift of the IEF profiles towards more basic isoforms, consistent among volunteers. Although the number of volunteers does not allow to extract broader conclusions, the concentration of EPO also seemed to increase more (percentually) at that time of the protocol. The effect, though, seemed not to be cumulative since EPO concentrations (and IEF profiles) returned to pre-exposure values in the time between chamber sessions (values at t_1 , t_{26} and t_{39}). It seems that under appropriate hypoxic stimuli, changes of the isoelectric profiles could be produced, although it is important to highlight that in no case those shifted profiles could have been misinterpreted as consistent with the presence of rhEPO.

CONCLUSIONS

In summary, the main findings of the IHE protocol herein investigated (4 wks, 5 d/wk, 3h/d at 4,000-5,500 m) were an increase in EPO serum concentrations not followed by an elevation of erythroid parameters. Also an increase of the percentage of basic isoforms of EPO was detected as a consequence of the hypoxic exposure after four weeks of repeated stimuli. Nevertheless, this increase did not produce any false positive result for rhEPO misuse either using the indirect method based in second-generation ON/OFF models in blood or attending to the direct method based on the IEF profile of EPO in urine.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to Belen Cano and Dr. M. Pilar Sarda for their technical help, to the team of Dr. Ferran A. Rodríguez (Núria Guitart, Núria Fort, and Daniel Moreno) for their help in sample collection, and to the athletes participating in the study. This work has been supported by the Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Sanidad y Consumo de España (Research project n.01/1328).

REFERENCES

- Abellan, R., Ventura, R., Pichini, S., Sarda, M.P., Remacha, A.F., Pascual, J.A., Pacifici, R., Di Giovannandrea, R., Zuccaro, P. and Segura, J. (2004a). Evaluation of immunoassays for the measurement of erythropoietin (EPO) as an indirect biomarker of recombinant human EPO misuse. *Journal of Pharmacological and Biomedical Analysis*, **35**, 1169-1177.
- Abellan, R., Ventura, R., Pichini, S., Sarda, M.P., Remacha, A.F., Pascual, J.A., Palmi, I., Bacosi, A., Pacifici, R., Zuccaro, P. and Segura, J. (2004b). Evaluation of immunoassays for the measurement of soluble transferrin receptor (sTfR) as an indirect biomarker of recombinant human erythropoietin misuse. *Journal of Immunological Methods*, **295**, 89-99.
- Ashenden, M., Gore, C.J., Dobson, G.P., Boston, T.T., Parisotto, R., Emslie, K.R., Trout, G.J. and Hahn, A.G. (2000). Simulated moderate altitude elevates serum erythropoietin but does not increase reticulocyte production in well-trained runners. *European Journal of Applied Physiology*, **81**, 428-435.
- Ashenden, M.J., Hanh, A.G., Martin, D.T., Logan, P., Parisotto, R. and Gore, C.J. (2001). A comparison of the physiological response to simulated altitude exposure and r-HuEpo administration. *Journal of Sports Science*, **19**, 831-837.

Ashenden, M.J., Gore, C.J., Parisotto, R., Sharpe, K., Hopkins, W. and Hahn, A.G. (2003). Effect of altitude on second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica*, **88**, 1053-1062.

Ashenden, M.J., Sharpe, K., Schoch, C. and Schumacher, Y.O. (2004a). Effect of pre-competition and altitude training on blood models used to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica*, **89**, 1019-1020.

Ashenden, M.J., Sharpe, K., Damsgaard, R. and Jarvis, L. (2004b). Standardization of reticulocyte values in an antidoping context. *American Journal of Clinical Pathology*, **121**, 816-825.

Berglund, B., Pielh-Aulin, K. and Wide, L. (2003). Effect of short-term and intermittent normobaric hypoxia on endogenous erythropoietin isoforms. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, **13**, 124-127.

Breidbach, A., Catlin, D.H., Green, G.A., Tregub, I., Truong, H. and Gorzek, J. (2003). Detection of recombinant human erythropoietin in urine by isoelectric focusing. *Clinical Chemistry*, **49**, 901-907.

Casas, M., Casas, H., Pagés, T., Rama, R., Ricart, A., Ventura, J.L., Ibanez, J., Rodríguez, F.A. and Viscor, G. (2000). Intermittent hypobaric hypoxia induces altitude acclimation and improves the lactate threshold. *Aviation, Space, and Environmental Medicine*, **71**, 125-30.

Eckardt, K.U., Boutillier, U., Kurtz, A., Schopen, M., Koller, E.A. and Bauer, C. (1989). Rate of erythropoietin formation in humans in response to acute hypobaric hypoxia. *Journal of Applied Physiology*, **66**, 1785-1788.

Gore, C.J., Parisotto, R., Ashenden, M.J., Stray-Gundersen, J., Sharpe, K., Hopkins, W., Emslie, K.R., Howe, C., Trout, G.J., Kazlauskas, R. and Hahn, A.G. (2003). Second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica*, **88**, 333-344.

Heinicke, K., Prommer, N., Cajigal, J., Viola, T., Behn, C. and Schmidt, W. (2003). Long-term exposure to intermittent hypoxia results in increased hemoglobin mass, reduced plasma volume, and elevated erythropoietin plasma levels in man. *European Journal of Applied Physiology*, **88**, 535-543.

Iourin, O., Mattu, T.S., Mian, N., Keir, G., Winchester, B., Dwek, R.A. and Rudd, P.M. (1996). The identification of abnormal glycoforms of serum transferrin in carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type I by capillary zone electrophoresis. *Glycoconjugate Journal*, **13**, 1031-1042.

Jedlickova, K., Stockton, D.W., Chen, H., Stray-Gundersen, J., Witkowski, S., Ri-Li, G., Jelinek, J., Levine, B.D. and Prchal, J.T. (2003). Search for genetic determinants of individual variability of the erythropoietin response to high altitude. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, **31**, 175-182.

Jorgensen, H.G., Elliott, M.A., Priest, R. and Smith, K.D. (1998). Modulation of sialyl Lewis X binding to E-selectin by glycoforms of alpha-1-acid glycoprotein expressed in rheumatoid arthritis. *Biomedical Chromatography*, **12**, 343-349.

Julian, C.G., Gore, C.J., Wilber, R.L., Daniels, J.T., Fredericson, M., Stray-Gundersen, J., Hahn, A.G., Parisotto, R. and Levine, B.D. (2004). Intermittent normobaric hypoxia does not alter performance or erythropoietic markers in highly trained distance runners. *Journal of Applied Physiology*, **96**, 1800-1807.

Katayama, K., Matsuo, H., Ishida, K., Mori, S. and Miyamura, M. (2003). Intermittent hypoxia improves endurance performance and submaximal exercise efficiency. *High Altitude Medicine & Biology*, **4**, 291-304.

Knaupp, W., Khilnani, S., Sherwood, J., Scharf, S. and Steinberg, H. (1992). Erythropoietin response to acute normobaric hypoxia in humans. *Journal of Applied Physiology*, **73**, 837-840.

Lasne, F. (2001). Double-blotting: a solution to the problem of non-specific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures. *Journal of Immunological Methods*, **253**, 125-131.

Lasne, F., Martin, L., Crepin, N. and de Ceaurriz, J. (2002). Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Analytical Biochemistry*, **311**, 119-126.

Lundby, C., Nielsen, T.K., Dela, F. and Damsgaard, R. (2005). The influence of intermittent altitude exposure to 4100 m on exercise capacity and blood variables. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, **15**, 182-187.

Nelson, K., Trout, G., Howe, C. and Kazlauskas, R. (2004). The effects of exercise on urinary erythropoietin levels and isoform distribution. In *Recent Advances in Doping Analysis (12). Proceedings of the Manfred Donike Workshop, 22nd Cologne Workshop on Dope Analysis* (edited by W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann and U. Mareck), pp. 309-316. Cologne: Sport & Buch Strauss.

Parisotto, R., Ashenden, M.J., Gore, C.J., Sharpe, K., Hopkins, W., Hahn, A.G. (2003). The effect of common hematologic abnormalities on the ability of blood models to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica*, **88**, 931-940

Passing, H. and Bablok, W. (1983). A new biomedical method procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, **21**, 709-720.

Rodríguez, F.A. (2002). Intermittent hypoxia: an alternative to acclimatization to high altitude and enhancement of athletic performance? *American Journal of Medicine and Sports*, **4**, 385-391.

Rodríguez, F.A., Casas, H., Casas, M., Pagés, T., Rama, R., Ricart, A., Ventura, J.L., Ibanez, J. and Viscor, G. (1999). Intermittent hypobaric hypoxia stimulates erythropoiesis and improves aerobic capacity. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, **31**, 264-268.

Rudd, P.M. and Dwek, R.A. (1997). Glycosylation: heterogeneity and the 3D structure of proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **32**, 1-100.

Rusko, H.K., Tikkanen, H.O. and Peltonen, J.E. (2003). Oxygen manipulation as an ergogenic aid. *Current Sports Medicine Reports*, **2**, 233-238.

Saez-Valero, J., Mok, S.S. and Small, D.H. (2000). An unusually glycosylated form of acetylcholinesterase is a CSF biomarker for Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica, Supplementum*, **176**, 49-52.

Savourey, G., Garcia, N., Besnard, Y., Hanniquet, A.M., Fine, M.O. and Bittel, J. (1994). Physiological changes induced by pre-adaptation to high altitude. *European Journal of Applied Physiology*, **69**, 221-227.

Savourey, G., Garcia, N., Besnard, Y., Guinet, A., Hanniquet, A.M. and Bittel, J. (1996). Pre-adaptation, adaptation and de-adaptation to high altitude in humans: cardioventilatory and haematological changes. *European Journal of Applied Physiology*, **73**, 529-535.

Savourey, G., Launay, J.-C., Besnard, Y., Guinet, A., Bourrilhon, C., Cabane, D., Martin, S., Caravel, J.P., Pequignot, J.M. and Cottet-Emard, J.M. (2004). Control of erythropoiesis after high altitude acclimatization. *European Journal of Applied Physiology*, **93**, 47-56.

Skibeli, V., Nissen-Lie, G. and Torjesen, P. (2001). Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood*, **98**, 3626-3634.

Stray-Gundersen, J., Chapman, R.F. and Levine, B.D. (2001). "Living high-training low" altitude training improves sea level performance in male and female elite runners. *Journal of Applied Physiology*, **91**, 1113-1120.

Varlet-Marie, E., Gaudard, A., Audran, M. and Bressolle, F. (2003). Pharmacokinetics/pharmacodynamics of recombinant human erythropoietins in doping control. *Sports Medicine*, **33**, 301-315.

Wide, L. and Bengtsson, C. (1990). Molecular charge heterogeneity of human serum erythropoietin. *British Journal of Haematology*, **76**, 121-127.

Wide, L., Bengtsson, C., Berglund, B. and Ekblom, B. (1995). Detection in blood and urine of recombinant erythropoietin to healthy men. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, **27**, 1569-1576.

Wilber, R. L. (2004). *Altitude training and athletic performance*. Champaign, Illinois: Human Kinetics.

WADA Technical Document - TD2004EPO (version 1.0) (2005). Harmonization of the method for the identification of epoetin alfa and beta (EPO) and darbepoetin alfa (NESP) by IEF-double blotting and chemiluminescent detection. World Anti-doping Agency, Montreal, Canada.

Table 1: Haematological variables and erythropoietic serum markers in 16 triathlon athletes during the experimental protocol of hypobaric chamber intermittent hypoxic exposure. Values are expressed as mean±s.

		C t₁ (n=8)	H t₁ (n=8)	H t_{1'} (n=8)	C t₂₆ (n=8)	H t₂₆ (n=6)	H t_{26'} (n=6)	H t₃₉ (n=6)
Hb	(g/dL)	15.2±1.3	14.8±0.3	14.5±0.9	14.5±1.1 [‡]	14.1±0.4	14.5±0.7	13.7±0.6
Hct	(%)	44.1±2.9	44.5±2.9	42.8±2.0	42.7±3.0	41.0±1.5	42.0±2.2	39.6±1.7
ret	(x10 ⁹ /L)	44.4±11.0	41.5±9.6	44.6±12.9	49.5±13.0	37.6±11.6	39.1±12.3	37.3±7.8
%ret	(%)	0.8±0.2	0.8±0.2	0.9±0.3	1.0±0.3 [‡]	0.8±0.3	0.8±0.2	0.8±0.2
IRF	(%)	9.1±3.0	9.7±3.3	10.7±4.3	2.9±1.4 [‡]	1.5±0.9 [‡]	2.1±1.1 [‡]	3.0±1.5 [‡]
sTfR	(mg/L)	3.5±0.3	3.5±0.4	3.3±0.3	3.3±0.4	3.1±0.3	3.2±0.4	2.9±0.3
EPO	(IU/L)	10.7±3.1	8.3±3.2	16.6±4.7*	10.8±2.8	4.6±1.4	24.8±9.3 ^{‡*}	9.2±3.2

C, group under normoxic conditions; H, group under hypobaric chamber intermittent hypoxic exposure. Sample collection times: t₁, immediately before the first chamber exposure; t_{1'}, 3 hours after the first exposure; t₂₆, immediately before the last exposure; t_{26'}, 3 hours after the last exposure; t₃₉, 2 weeks after the last exposure. [‡]P < 0.05 different from the initial value for each group (t₁); *P < 0.05 different from the respective pre-chamber exposure value (t₁, t₂₆). Hb, haemoglobin concentration; Hct, haematocrit; ret, reticulocytes; %ret, percentage of reticulocytes; IRF, immature reticulocyte fractions; sTfR, soluble transferrin receptor concentration; EPO, erythropoietin concentration.

Table 2: Percentage of basic isoforms obtained after IEF EPO analysis for 8 triathlon athletes exposed to hypobaric chamber intermittent hypobaric hypoxia along the experimental protocol.

Volunteer	H t ₁	H t _{1'}	H t ₂₆	H t _{26'}	H t ₃₉
1	36.8%	35.8%	36.0%	58.7%	34.4%
2	19.9%	38.8%	ND	24.4%	19.9%
3	42.4%	47.1%	40.8%	59.3%	NS
4	12.4%	23.1%	21.8%	37.1%	18.6%
5	29.8%	21.3%	ND	61.6%	15.5%
6	26.0%	21.6%	28.3%	50.1%	47.9%
7	29.7%	39.4%	NS	NS	NS
8	29.8%	25.8%	NS	NS	NS

H, group under hypobaric chamber intermittent hypoxic exposure. Sample collection times: t₁, immediately before the first chamber exposure; t_{1'}, 3 hours after the first exposure; t₂₆, immediately before the last exposure; t_{26'}, 3 hours after the last exposure; t₃₉, 2 weeks after the last exposure. ND, below the limit of detection; NS, no sample available.

Figure legends

Figure 1: Experimental protocol of hypobaric chamber intermittent hypoxia exposure.

Sample collection times: t_1 , immediately before the first chamber exposure; $t_{1'}$, 3 hours after the first exposure; t_{26} , immediately before the last exposure; $t_{26'}$, 3 hours after the last exposure; t_{39} , 2 weeks after the last exposure.

Figure 2: Plot of individual scores for the two ON and two OFF models versus time.

Horizontal lines represent the threshold values corresponding to selected false-positive rates for worst-case male endurance athletes at sea level (1 in 10 for the ON/OFF models (dashed lines); 1 in 100 for the ON models and 1 in 1000 for the OFF models (solid lines)) defined by Gore et al. (2003). Empty squares represent the control (C) group individual scores; full circles represent the hypobaric chamber intermittent hypoxia exposure (H) group individual scores. Sample collection times: t_1 , immediately before the first chamber exposure; $t_{1'}$, 3 hours after the first exposure; t_{26} , immediately before the last exposure; $t_{26'}$, 3 hours after the last exposure; t_{39} , 2 weeks after the last exposure.

Figure 3: IEF gel corresponding to the analysis of the samples of volunteer 1 (submitted to hypobaric chamber intermittent hypoxia exposure, H).

The dashed line indicates the position of the more acidic isoform of the corresponding rhEPO standard. Stds, rhEPO and NESP standards; t_1 , immediately before the first chamber exposure; $t_{1'}$, 3 hours after the first exposure; t_{26} , immediately before the last exposure; $t_{26'}$, 3 hours after the last exposure; t_{39} , 2 weeks after the last exposure.

Figure 1

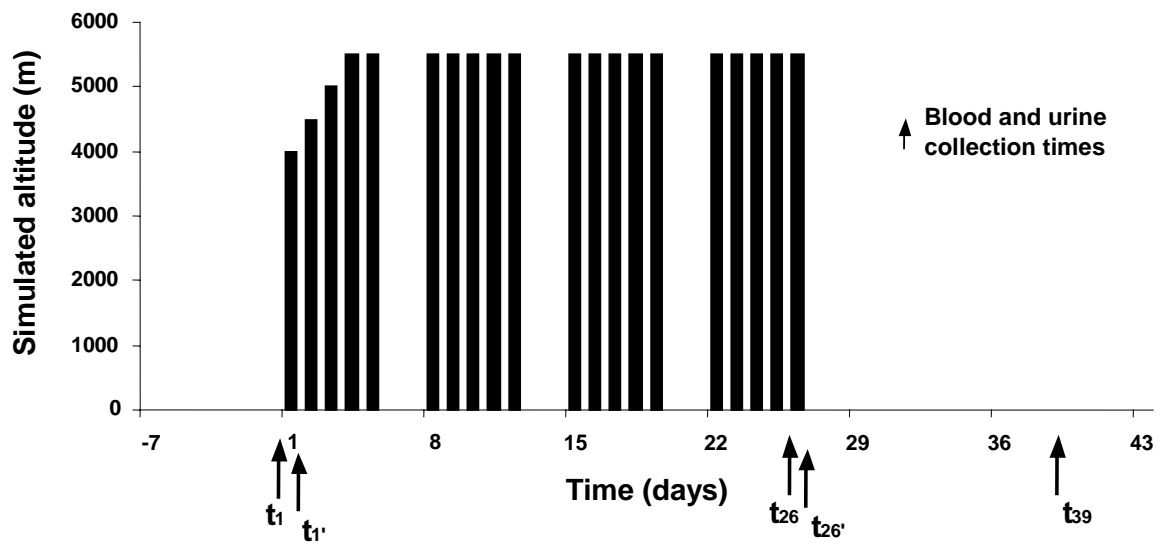


Figure 2

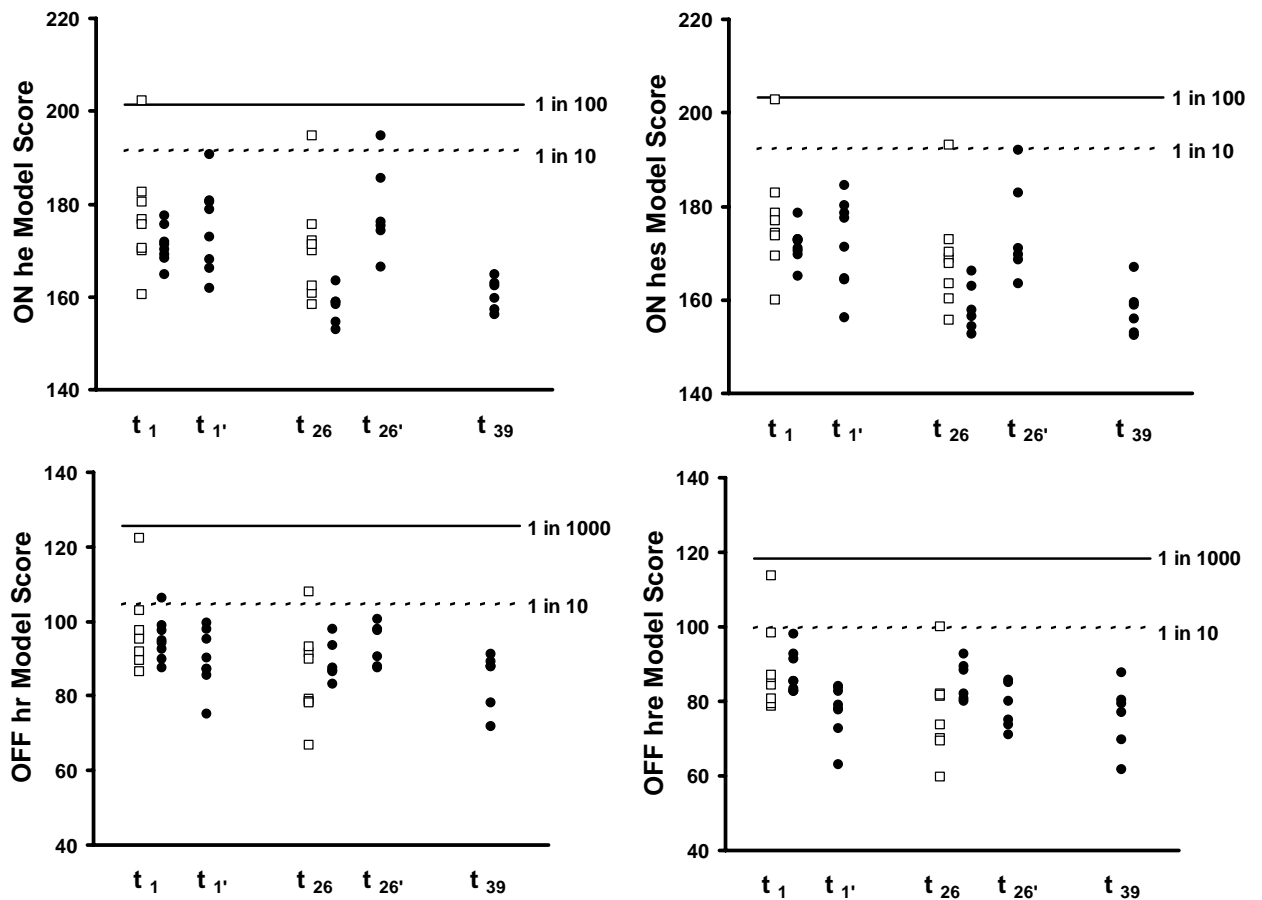
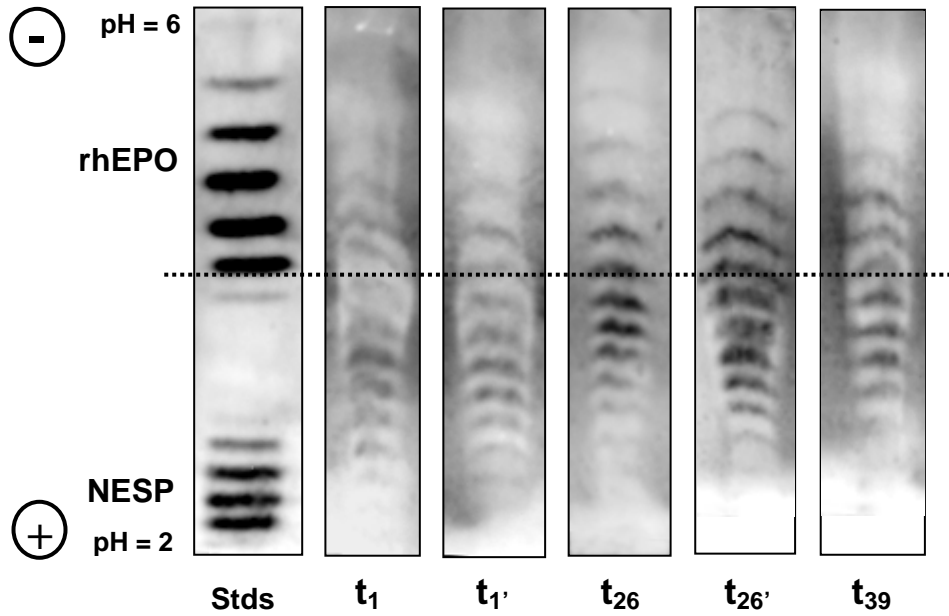


Figure 3



5.4. Discusión

5.4.1. Efecto de la HC-IHE sobre los parámetros fisiológicos

En deportistas altamente entrenados, el principal cambio observado durante la realización del protocolo HC-IHE fue el incremento agudo de la concentración de EPO en suero por efecto de la exposición breve a hipoxia severa. La exposición breve (180 min.) a hipoxia severa, altitud simulada 4.000 m, fue capaz de incrementar la concentración de EPO entre un 70-205%, y esta respuesta se mantuvo hasta incrementos en la concentración de EPO entre 331-933% tras cuatro semanas de exposición a altitud simulada (5.500 m), pese a que la concentración pre-cámara de EPO era inferior (-45%) a la de pre-cámara del inicio del protocolo.

Aunque el incremento de la concentración de EPO tras una única exposición a hipoxia ya había sido observado previamente (K.-U. Eckardt y cols., 1989; F.A. Rodríguez y cols., 2000), este estudio ha demostrado que el mecanismo de sensibilidad al oxígeno desencadena, hasta con mayor intensidad, la secreción de EPO cuando los voluntarios eran expuestos repetidamente a este tipo de estímulo hipóxico. El retorno a los niveles basales de la concentración de EPO observado en condiciones pre-cámara tras 4 semanas de exposición intermitente parece ser el efecto inhibitorio sobre la síntesis de EPO producido por el retorno a normoxia entre exposiciones de cámara hipobárica.

Aunque el efecto de la exposición a hipoxia hipobárica ha sido relacionado con el aumento en la masa eritrocitaria vía la síntesis de EPO (F.A. Rodríguez y cols., 2000; J. Stray-Gundersen y cols., 2001; K. Heinicke y cols., 2003; G. Savourey y cols., 2004), en nuestro estudio de HC-IHE, el incremento de la concentración sérica de EPO parece no haber causado una respuesta eritropoyética efectiva. Los valores de los marcadores de la activación eritropoyética (hematocrito, hemoglobina, porcentaje de reticulocitos y sus subpoblaciones, sTfR y volúmenes sanguíneos) observados se mantuvieron similares a los obtenidos para el grupo control a lo largo de todo el protocolo de exposición.

La falta de respuesta a hipoxia obtenida en estos deportistas altamente entrenados, en los cuales los niveles de masa eritroide y volumen plasmático se encontraban inicialmente elevados como consecuencia del entrenamiento (A.F. Remacha y cols., 1992 y 1994; W. Schmidt y cols., 2002), no concuerda con los resultados previamente observados en alpinistas y voluntarios

sanos (F.A. Rodríguez y cols., 1999 y 2000). En estos estudios de HC-IHE (3-5 h/día durante 9 días consecutivos a 4.000-5.500 m, y 1,5 h/día, 3 días por semana durante 3 semanas a 4.000-5.500 m, respectivamente), se observaron la elevación significativa de la concentración de hemoglobina y el número de reticulocitos (F.A. Rodríguez y cols., 1999), y el incremento de la concentración de EPO un 15% junto con el de los indicadores de masa eritrocitaria sin el incremento de la viscosidad sanguínea (F.A. Rodríguez y cols., 2000). Por otro lado, y de forma similar a los resultados de nuestro estudio, en un estudio previo de exposición a hipoxia normobárica intermitente en un grupo de triatletas de competición (8-11 h/día a 2.650 m durante 4 semanas) (M.J. Ashenden y cols., 2000), el incremento del 57% en la concentración de EPO fue incapaz de estimular la producción de reticulocitos. El incremento de la EPO sin efecto eritropoyético indicaría que el umbral de la EPO capaz de inducir respuesta eritroide podría depender de la masa eritroide previa, alta en deportistas de competición; de forma que a mayor masa eritroide, se requieren concentraciones de EPO más elevadas para provocar un efecto eritropoyético.

La vuelta a condiciones normóxicas, además de producir la inhibición de la transcripción del gen de EPO por efecto de la degradación del factor de transcripción HIF-1 α (G.L. Semenza, 1994; G.L. Semenza y cols., 1994 y 1997), produce una reducción de la producción de eritrocitos en la médula ósea (R.L. Huff y cols., 1951; C. Reynafarje y cols., 1964), y la disminución de su supervivencia en circulación (C. Reynafarje y cols., 1964). Este incremento de la destrucción celular de eritrocitos con la supresión de la secreción de EPO se ha denominado "neocitólisis" y se ha observado bajo condiciones de oxigenación elevadas (L. Rice y cols., 2001). La incapacidad de inducir incrementos sustanciales en la masa eritrocitaria por efecto de las exposiciones hipóxicas agudas e intermitentes podría ser efecto de la inhibición de la síntesis de EPO y la neocitólisis. Además, otros autores han puesto énfasis en que la exposición a hipoxia sub-aguda (1-2 semanas) podría incrementar el porcentaje de reticulocitos mediante la liberación de eritrocitos inmaduros de la médula ósea, sin una verdadera aceleración de la eritropoyesis (M. Cazzola y cols., 1997).

Teniendo en cuenta todas estas explicaciones, la duración del estímulo hipóxico, el grado del incremento de la concentración de EPO, la magnitud de la adaptación al entrenamiento y la neocitólisis tras la estimulación efectiva de la diferenciación celular, podrían jugar papeles integrados en el incremento de la masa eritroide tras la exposición a hipoxia intermitente. Por todo ello, el protocolo de exposición intermitente a hipoxia hipobárica (4 semanas, 3 h/día, 5 días/semana a 4.000-5.500 m) estimuló claramente la secreción de EPO pero fue incapaz de incrementar de forma efectiva la masa eritroide en deportistas altamente entrenados.

Además del estudio de los parámetros eritropoyéticos, se observó un incremento en el número de células linfocitarias y monocitos. Esta variación fue mínima, pero consistente y observada tras la exposición a cámara hipobárica. La única explicación satisfactoria que podemos dar a estos cambios es el estrés inducido por la exposición a la cámara (M.S. Sothmann y cols., 1991).

5.4.2. Efecto de la HC-IHE sobre el rendimiento deportivo

Los resultados observados para el rendimiento atlético fueron consecuentes con la falta de respuesta del sistema eritropoyético. A pesar de un aumento de la capacidad ventilatoria y de la disminución de la producción de CO₂ en condiciones de máximo esfuerzo, no se observaron diferencias significativas en el intercambio máximo de oxígeno (VO₂max), ni para un mismo grupo ni entre ellos (hipoxia *versus* control). De la misma forma, el rendimiento máximo en pista sintética de 400 m, determinado como la velocidad máxima aeróbica, no se vio alterado. A diferencia de estudios previos de exposición a hipoxia intermitente (F.A. Rodríguez y cols., 1999 y 2003), este protocolo de exposición más largo (4 semanas, 3 h/día, 5 días/semana a 4.000-5.500 m) no consiguió mejorar el rendimiento de los atletas altamente entrenados.

5.4.3. Efecto de la HC-IHE sobre la detección indirecta del abuso de rhEPO

Antes de la aplicación de los modelos de detección indirecta del abuso de rhEPO (ON y OFF) (C.J. Gore y cols., 2003), los resultados obtenidos para los marcadores seleccionados fueron transformados para corregir el sesgo debido al instrumento (Apartado 5.2.4). A pesar de que la falta de estandarización del análisis de los reticulocitos complica su utilización como biomarcador, hay que destacar que este parámetro ya ha sido adoptado por muchas federaciones deportivas internacionales (entre otras, la *Union Cycliste Internationale*, UCI, o la *International Association of Athletics Federations*, IAAF). M.J. Ashenden y colaboradores (2004b) han sugerido la utilización de una aproximación para la cuantificación del sesgo entre instrumentos. Sin embargo, esta aproximación tiene su principal dificultad en la obtención (en un mismo día) de muestras de sangre de, al menos, 54 atletas de resistencia situados a nivel del mar. Esta limitación nos llevó a la realización de una validación inter-instrumento utilizando muestras de pacientes con patologías hematológicas con la intención de tener valores de

reticulocitos a lo largo de todo el rango de calibración. Al igual que en el estudio anterior (M.J. Ashenden y cols., 2004b), observamos un sesgo constante entre el analizador hematológico Sysmex XT 2100 y el Advia 120, con valores ligeramente superiores para este último. Cabe destacar que, para aquellas federaciones que necesitan de análisis hematológicos *in situ*, el sistema Sysmex es el autoanalizador habitualmente seleccionado debido a la existencia de equipos Sysmex portátiles.

Respecto a la detección indirecta del abuso de rhEPO, el incremento de EPO observado tras la HC-IHE, no seguido de respuesta eritropoyética, parece no haber sido suficientemente importante como para modificar el valor final obtenido al aplicar los modelos matemáticos ON y OFF. En ambos grupos (hipoxia y control), se observó una disminución de los valores del modelo On he tras un mes de protocolo, principalmente a consecuencia de la disminución de la concentración de hemoglobina. Además, en el grupo hipoxia, este efecto se mantuvo durante dos semanas tras acabado el protocolo de exposición.

Los resultados obtenidos en estudios previos sobre efecto de la hipoxia de altitud sobre los modelos indirectos refuerzan la idea de que se debe tener precaución en la interpretación de resultados de sangre o suero de deportistas que han estado recientemente expuestos a altitud real o simulada (M.J. Ashenden y cols., 2003 y 2004a). Además de las diferencias de género y deporte existentes entre los estudios, los distintos protocolos de altitud y los tiempos de recolección de muestras dificultan su comparación. En dos grupos de ciclistas masculinos se observó un incremento significativo de los marcadores de los modelos ON y OFF tras la exposición a altitud real (M.J. Ashenden y cols., 2003). Sin embargo, en atletas femeninas de remo tras exposición a altitud real (M.J. Ashenden y cols., 2004a), y en tres grupos de deportistas masculinos expuestos a altitud simulada en condiciones normobáricas (M.J. Ashenden y cols., 2003) no se observaron diferencias. La variabilidad de las respuestas individuales a hipoxia (K. Jedlickova y cols., 2003) y el distinto protocolo de hipoxia seguido parecen ser las principales razones de esta disparidad de resultados (M.J. Ashenden y cols., 2003 y 2004a). En estudios previos (M.J. Ashenden y cols., 2000, 2003 y 2004a; C.G. Julian y cols., 2004), y de igual forma que para nuestros resultados, la falta de la apropiada respuesta eritropoyética, en la cual se basan los modelos ON y OFF, es la principal razón por la cual estos modelos no se ven modificados.

Respecto a los umbrales descritos para los modelos ON/OFF, tan solo uno de los triatletas del grupo control sobrepasó el umbral definido para el modelo ON he; umbral por debajo del cual existe la probabilidad de encontrar un falso positivo entre cien casos, y capaz de distinguir

el 50-80% de los deportistas administrados con varias dosis de rhEPO (C.J. Gore y cols., 2003). Independientemente de la exposición o no a HC-IHE, la observación de altas concentraciones naturales de hemoglobina presentes en algunos individuos parece ser la principal razón por la cual los valores de los modelos se aproximan al umbral. Mediante el método directo de detección de la rhEPO y NESP, se determinó la ausencia de activadores hematopoyéticos en orina, confirmándose que la alta concentración de hemoglobina no era efecto de una administración exógena.

A pesar de que los modelos indirectos pueden estar sujetos a interpretaciones erróneas por efecto de estados patológicos o variables ambientales (Ashenden et al., 2003; Parisotto et al., 2003), su rapidez y la utilización de procedimientos relativamente baratos los hacen útiles como método de cribado. Esto último ha llevado a que diversas federaciones deportivas (IAAF, UCI, etc.) utilicen, entre otros parámetros hematológicos, el modelo indirecto OFF he en sus análisis de sangre como controles médicos de seguridad. Además, la monitorización longitudinal de las variables hematológicas y de los resultados de los modelos indirectos de los deportistas parece ser una herramienta muy útil en la detección atletas con incrementos no fisiológicos en la producción de eritrocitos (K. Sarpe y cols., 2006).

5.4.4. Efecto de la HC-IHE sobre la detección directa del abuso de rhEPO

En el caso de la detección directa, basada en las diferencias de glicosilación entre la EPO endógena y la recombinante, alteraciones en el proceso de glicosilación de las proteínas durante su procesamiento post-traducciona l podría inducir a errores en su detección (P.M. Rudd y R.A. Dwek, 1997). La alteración del tiempo de tránsito a través de la vía de glicosilación, como es el aumento de la tasa de producción de EPO en condiciones de hipoxia, podría potencialmente resultar en modificaciones de la estructura de las cadenas de azúcares de la EPO endógena. La reducción de los ácidos siálicos unidos a la estructura podría alterar su patrón isoeléctrico y hacerlo más semejante al de la rhEPO.

Existen pocos estudios en los cuales se describan cambios en la distribución de isoformas de la EPO. Diferencias en la carga molecular de la EPO han sido observadas en pacientes con policitemia vera y en recién nacidos comparadas con adultos (L. Wide y C. Bengtsson, 1990). En ambos casos, el patrón isoeléctrico de la EPO sérica estaba menos cargado negativamente. A nuestro conocimiento, existe un único estudio publicado sobre el efecto de la hipoxia sobre la

movilidad electroforética de la EPO, y en el cual se utilizó un protocolo de hipoxia normobárica (B. Berglund y cols., 2003). En este estudio, aunque se describió un incremento de la concentración de EPO, no se observaron diferencias en la movilidad electroforética de las isoformas de la EPO sérica.

Bajo el efecto de nuestro protocolo de HC-IHE y tras cuatro semanas de exposiciones hipóxicas, el estímulo produjo en todos los voluntarios un desplazamiento de los patrones de IEF hacia bandas más básicas. Aunque el número de voluntarios no permite la obtención de conclusiones más amplias, la concentración de EPO también aumentó (porcentualmente) en este punto del protocolo. Sin embargo, parece que el efecto no es acumulativo ya que las concentraciones de EPO (y sus patrones de IEF) vuelven a los valores pre-exposición entre sesiones de cámara. Por tanto, parece que, bajo el estímulo apropiado, es posible producir cambios en el patrón isoeléctrico; aunque hay que destacar que en ninguno de los casos el desplazamiento de los patrones pudo ser mal interpretado como resultado de la presencia de rhEPO.

En conclusión, el principal resultado del protocolo de HC-IHE (4 semanas, 3 h/día, 5 días/semana a 4.000-5.500 m) estudiado en deportistas altamente entrenados fue el incremento de la concentración de EPO en suero, no seguido de respuesta eritropoyética o de mejora del rendimiento. Además, se observó un ligero incremento del porcentaje de isoformas básicas de la EPO como consecuencia de la exposición a hipoxia tras cuatro semanas de repetición del estímulo. No obstante, este incremento no produjo ningún falso positivo del abuso de la rhEPO ni utilizando el método indirecto basado en los modelos de segunda-generación ON/OFF en sangre, ni en la aplicación del método directo basado en el patrón isoeléctrico de la EPO en orina.

6. Conclusiones

1. Validación de inmunoensayos de los biomarcadores indirectos: EPO, sTfR, IGF-I y P-III-P

- 1.1. Los resultados de precisión y exactitud intra e inter-día de los inmunoensayos estudiados fueron aceptados, y se observó una buena correlación inter-laboratorio. Sin embargo, existe una alta dependencia de los resultados de concentración de los biomarcadores de interés según el inmunoensayo utilizado. En general, el pre-tratamiento de la muestra en el caso de la IGF-I, la distinta naturaleza de los estándares de calibración para el sTfR y el P-III-P, y la distinta especificidad de los anticuerpos utilizados en cada uno de los inmunoensayos son las principales causas de las discrepancias inter-técnica observadas. La comparación de resultados obtenidos mediante distintos inmunoensayos debe realizarse tras la cuidadosa transformación de los mismos.
- 1.2. Los biomarcadores EPO, sTfR, IGF-I y P-III-P demostraron una buena estabilidad tras ciclos de congelación/descongelación y tras las condiciones de transporte estudiadas, tanto para muestras de control como para muestras reales.
- 1.3. Los resultados demuestran la necesidad de una validación exhaustiva de los inmunoensayos utilizados para la determinación en suero de los biomarcadores indirectos antes de su utilización en el campo del control antidopaje. La utilización de un inmunoensayo específico debe tener en consideración, no sólo los resultados de la validación intra-laboratorio, sino inter-laboratorio e inter-técnica.

2. Efecto de la intensidad de entrenamiento en deportistas de elite y deportistas recreacionales sobre la concentración de los marcadores indirectos del consumo de rhEPO y rhGH

- 2.1. Los biomarcadores séricos propuestos para la detección indirecta del abuso de rhEPO no se encuentran directamente afectados por el nivel atlético, el ejercicio o la distinta carga de entrenamiento realizada a lo largo de la temporada deportiva. Las variaciones observadas en los modelos matemáticos existentes para la detección de la administración de rhEPO se producen fundamentalmente a causa de las fluctuaciones de la concentración de hemoglobina, efecto comúnmente observado en deportistas de élite. La baja variabilidad intra-individual de los biomarcadores estudiados a lo largo de la temporada

deportiva confirma la estabilidad de los modelos indirectos de segunda-generación ON/OFF para la detección del abuso de rhEPO.

- 2.2. En el caso de los biomarcadores propuestos para la detección indirecta del abuso de rhGH, la edad es el factor que ejerce mayor influencia sobre las concentraciones séricas de IGF-I y P-III-P. Mientras que el nivel atlético, por sí mismo, no tuvo ningún efecto sobre las concentraciones de IGF-I en suero, para P-III-P se observaron valores más altos en atletas de élite comparados con los deportistas recreacionales. Las diferencias observadas en la concentración sérica de P-III-P entre los atletas de élite de distintos deportes se mantuvieron tras su corrección por la edad. El establecimiento de rangos de referencia de las concentraciones de los biomarcadores indirectos para la detección del abuso de la rhGH debe, por tanto, tener en cuenta las variaciones debidas a la edad y la carga de entrenamiento.

3. Efecto de la exposición intermitente a hipoxia en cámara hipobárica sobre la concentración de los biomarcadores indirectos del abuso de rhEPO

- 3.1. El principal resultado del protocolo utilizado de exposición intermitente a hipoxia en cámara hipobárica (4 semanas, 3 h/día, 5 días/semana a 4.000-5.500 m) estudiado en deportistas altamente entrenados fue el incremento de la concentración de EPO en suero, durante cada sesión y esta respuesta se observó tanto inicialmente como tras un periodo de cuatro semanas. Sin embargo, este protocolo, pese a estimular la EPO, fue incapaz de producir una respuesta eritropoyética efectiva o una mejora del nivel atlético.
- 3.2. Se observó un ligero incremento del porcentaje de isoformas básicas de la EPO como consecuencia de la exposición a hipoxia tras cuatro semanas de repetición del estímulo. No obstante, este incremento no produjo ningún resultado falso positivo del abuso de la rhEPO ni utilizando el método indirecto basado en los modelos de segunda-generación ON/OFF en sangre, ni en la aplicación del método directo basado en el patrón isoelectrico de la EPO en orina.

7. Bibliografía

Direcciones electrónicas

- Base de datos de la U.S National Library of Medicine, del National Centre for Biotechnology Information, NCBI. PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?db=PubMed>
- Dynepo[®], TKT Products: <http://www.tkt.com/patient/dynepo.pdf> (European Public Assessment Report)
- Protein Data Bank, PDB: <http://www.rcsb.org/pdb/>
- World Antidoping Agency (WADA),
International Standard for Laboratories (2004):
http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/lab_aug_04.pdf
Prohibited list (2006): http://wada-ama.org/rtecontent/document/list_2006.pdf
World Anti-Doping Code (2003): http://wada-ama.org/rtecontent/document/code_v3.pdf

Bibliografía

A

- Abellan R, Ventura R, Pichini S, Pascual JA, Pacifici R, Di Carlo S, Bacosi A, Segura J, Zuccaro P. (2005) Evaluation of immunoassays for the measurement of insulin-like growth factor-I and procollagen type III peptide, indirect biomarkers of recombinant human growth hormone misuse in sport. *Clin Chem Lab Med* 43, 75-85.
- Akesson A, Bjellerup P, Vahter M. (1999) Evaluation of kits for measurement of the soluble transferrin receptor. *Scand J Clin Lab Invest* 59, 77-82.
- Allen J, Backstrom KR, Cooper JA, Cooper MC, Detwiler TC, Essex DW, Fritz RP, Means RT, Meier PB, Pearlman SR, Roitman-Johnson B, Seligman PA. (1998) Measurement of soluble transferrin receptor in serum of healthy adults. *Clin Chem* 44, 35-39.
- Altman DG, Bland JM. (1983) Measurement in medicine: The analysis of method comparison studies. *Statistician* 32, 307-317.

- Annable L, Cotes PM, Mussett MV. (1972) The second international reference preparation of erythropoietin, human, urinary, for bioassay. *Bull World Health Organ* 47, 99-112.
- Anttila R, Cook JD, Siimes MA. Body iron stores decrease in boys during pubertal development: The transferrin receptor-ferritin ratio as an indicator of iron status. *Pediatr Res* 41, 224-228.
- Aron DC, Rosenzweig JL, Abboud HE. (1989) Synthesis and binding of insulin-like growth factor I by human glomerular mesangial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 68, 585-591.
- Ashenden MJ, Gore CJ, Dobson GP, Boston TT, Parisotto R, Emslie KR, Trout GJ, Hahn AG. (2000) Simulated moderate altitude elevates serum erythropoietin but does not increase reticulocyte production in well-trained runners. *Eur J Appl Physiol* 81, 428-435.
- Ashenden MJ, Hahn AG, Martin DT, Logan P, Parisotto R, Gore CJ. (2001) A comparison of the physiological response to simulated altitude exposure and r-huEPO administration. *J Sports Sci* 19, 831-837.
- Ashenden MJ. (2002) A strategy to detect blood doping in sport. *Haematologica* 87, 225-234.
- Ashenden MJ, Gore CJ, Parisotto R, Sharpe K, Hopkins WG, Hahn AG. (2003) Effect of altitude on second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica* 88, 1053-1062.
- Ashenden MJ, Sharpe K, Schoch C, Schumacher YO. (2004a) Effect of pre-competition and altitude on blood models used to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica* 89, 1018-1020.
- Ashenden MJ, Sharpe K, Damsgaard R, Jarvis L. (2004b) Standardization of reticulocyte values in an antidoping context. *Am J Clin Pathol* 121, 816-825.
- Ashenden MJ, Lacoste A, Orhant E, Sharpe K. (2004c) Longitudinal variation of haemoglobin and reticulocytes in elite rowers. *Haematologica* 89, 1403-1404.
- Audran M, Gareau R, Matecki S, Durand F, Chenard C, Sicart MT, Marion B, Bresolle F. (1999) Effects of erythropoietin administration in training athletes and possible indirect detection in doping control. *Med Sci Sports Exerc* 31, 639-645.

B

- Badia R, de la Torre R, Segura J. (1992) Erythropoietic: potential abuse in sport and possible methods for its detection. *Biol Clin Hematol* 14, 177-184.

- Baillie FJ, Morrison AE, Fergus I. (2003) Soluble transferrin receptor : a discriminating assay for iron deficiency. *Clin Lab Haem* 25, 353-357.
- Bala RM, Beck JC. (1971) Human growth hormone in urine. *J Clin Endocrinol Metab* 33, 799-806.
- Ballard FJ, Knowles SE, Walton PE, Edson K, Owens PC, Mohler MA, Ferraiolo BL. (1991) Plasma clearance and tissue distribution of labelled insulin-like growth factor-I, IGF-II and des(1-3)IGF-I in rats. *J Endocrinol* 128, 197-204.
- Banfi G, Dolci A. (2003) Preanalytical phase of sport biochemistry and haematology. *J Sports Med Phys Fitness* 43, 223-230.
- Bang P, Brandt J, Degerblad M, Enberg G, Kaijser L, Thoren M, Hall K. (1990) Exercise-induced changes in insulin-like growth factor and their low molecular weight binding protein in healthy subjects and patients with growth hormone deficiency. *Eur J Clin Invest* 20, 285-292.
- Bang P, Baxter RC, Blum WF, Breier BH, Clemmons DR, Hall K, Hintz RL, Holly JMP, Rosenfeld RG, Zapf J. (1994) Consensus statement. Valid measurements of total IGF concentrations in biological fluids. Recommendations from the 3rd International Symposium on Insulin-like Growth Factors. *J Endocrinol* 143, C1-C2.
- Baumann G, Abramson EC. (1983) Urinary growth hormone in man: evidence for multiple molecular forms. *J Clin Endocrinol Metab* 56, 305-311.
- Baumann G. (1991) Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. *Endocrinol Rev* 12, 424-449.
- Baumann G. (1999) Growth hormone heterogeneity in human pituitary and plasma. *Horm Res* 51, 2-6.
- Baumann G. (2001) Growth hormone binding protein 2001. *J Pediatr Endocrinol Metab* 14, 355-375.
- Baxter RC. (1994) Insulin-like growth factor binding proteins in the human circulation: a review. *Horm Res* 42, 140-144.
- Bechensteen AG, Lappin TRJ, Marsden J, Muggleston D, Cotes PM. (1993) Unreliability in immunoassays of erythropoietin: anomalous estimates with an assay kit. *Br J Haematol* 83, 663-664.

- Beguín Y, Clemons GK, Pootrakul P, Fillet G. (1993) Quantitative assessment of erythropoiesis and functional classification of anemia based on measurement of serum transferrin receptor and erythropoietin. *Blood* 81, 1067-1076.
- Beguín Y. (2003) Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta* 329, 9-22.
- Benson EW, Hardy R, Chaffin C, Robinson CA, Konrad RJ. (2000) New automated chemiluminescent assay for erythropoietin. *J Clin Lab Anal* 14, 271-273.
- Berg U, Bang P. (2004) Exercise and circulating insulin-like growth factor. *Horm Res* 62; 50-58.
- Berggren A, Ehrnborg C, Rosen T, Ellegård L, Bengtsson B-A, Caidahl K. (2005) Short-term administration of supraphysiologic rhGH does not increase maximum endurance exercise capacity in healthy, active young men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 3268-3273.
- Berglund B, Birgegård G, Hemmingsson P. (1988) Serum erythropoietin in cross-country skiers. *Med Sci Sports Exerc* 20, 208-209.
- Berglund B, Genneser M, Ornhaugen H, Ostberg C, Wide L. (2002) Erythropoietin concentrations during 10 days of normobaric hypoxia under controlled environmental circumstances. *Acta Physiol Scand* 174, 225-229.
- Berglund B, Pielh-Aulin K, Wide L. (2003) Effect of short-term and intermittent normobaric hypoxia on endogenous erythropoietin isoforms. *Scand J Med Sci Sports* 13, 124-127.
- Bernstein A, Safirstein J, Rosen JE. (2003) Athletic ergogenic aids. *Bull Hosp Jt Dis* 61, 164-171.
- Blum WF, Breier BH. (1994) Radioimmunoassays for IGFs and IGF-BPs. *Growth Regul* 4 (Suppl 1), 11-19.
- Bidlingmaier M, Wu Z, Strasburger CJ. (2000) Test method: GH. *Bailliere Clin Endocrinol Metab* 14, 99-109.
- Bidlingmaier M, Wu Z, Strasburger CJ. (2001) Doping with growth hormone. *J Pediatr Endocrinol Metab* 14, 1077-1084.
- Bidlingmaier M, Wu Z, Strasburger CJ. (2003) Problems with GH doping in sports. *J Endocrinol Invest* 26, 924-931.
- Binoux M. (1995) The IGF system in metabolism regulation. *Diabetes Metab* 21, 330-337.

- Birkeland KI, Stray-Gundersen J, Hemersbach P, Hallen J, Haug E, Barh R. (2000) Effect of rhEPO administration on serum levels of sTfR and cycling performance. *Med Sci Sports Exerc* 32, 1238-1243.
- Boffa MJ, Smith A, Chalmers RJ, Mitchell DM, Rowan B, Warnes TW, Shomaf M, Haboubi NY. (1996) Serum type III procollagen aminopeptide for assessing liver damage in methotrexate-treated psoriatic patients. *Br J Dermatol* 135, 538-544.
- Boisclair YR, Rhoads RP, Ueki I, Wang J, Ooi GT. (2001) The acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex: an important but forgotten component of the circulating IGF system. *J Endocrinol* 170, 63-70.
- Bollerslev J, Moller J, Thomas S, Djoseand O, Christiansen JS. (1996) Dose dependent effects of recombinant human growth hormone on biochemical markers of bone and collagen metabolism in adult growth hormone deficiency. *Eur J Endocrinol* 135, 666-671.
- Bonfichi M, Balduini A, Arcaini L, Marseglia C, Malcovati L, Bernardi L, Passino C, Spadacini G, Feil P, Keyl C, Schneider A, Boiardi A, Bandinelli G, Greene RE, Bernasconi C. (2000) Haematological modifications after acute exposure to high altitude: Possible implications for detection of recombinant erythropoietin misuse. *Br J Haematol* 109, 895-896.
- Borst SE, De Hoyos DV, Garzerella L, Vincent K, Pollock BH, Lowenthal DT, Pollock ML. (2001) Effects of resistance training on insulin-like growth factor-I and IGF binding proteins. *Med Sci Sports Exerc* 33, 648-653.
- Bowsher RR, Lee WH, Apathy JM, O'Brien PJ, Ferguson AL, Henry DP. (1991) Measurement of insulin-like growth factor-II in physiological fluids and tissues. I. An improved extraction procedure and radioimmunoassay for human and rat fluids. *Endocrinology* 128, 805-814.
- Brabant G. (2003) Insulin-like growth factor-I: marker for diagnosis of acromegaly and monitoring the efficacy of treatment. *Eur J Endocrinol* 148, S15-S20.
- Breidbach A, Catlin DH, Green GA, Tregub I, Truong H, Gorzek J. (2003) Detection of recombinant human erythropoietin in urine by isoelectric focusing. *Clin Chem* 49, 901-907.
- Breier B, Gallaher B, Gluckman P. (1991) Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I: solutions to some potential problems and pitfalls. *J Endocrinol* 128, 347-357.
- Bren A, Kandus A, Varl J, Buturovic J, Ponikvar R, Kveder R, Primožic S, Ivanovic P. (2002) A comparison between epoetin omega and epoetin alfa in the correction of anemia hemodialysis patients: a prospective, controlled crossover study. *Artif Organs* 26, 91-97.

- Bressolle F, Audran M, Guidicelli C, Gareau R, Baynes RD, Comeni R. (1997) Population pharmacodynamics for monitoring epoetin in athletes. *Clin Drug Invest* 14, 233-242.
- Briggs C, Rogers R, Thompson B, Machin SJ. (2001) New red cell parameters on the Sysmex XE-2100 as potential markers of functional iron deficiency. *Sysmex J Int* 11, 63-68.
- Bruckner P, Bächinger HP, Timpl R, Engel J. (1978) Three conformationally distinct domains in the amino-terminal segment of type III procollagen and its rapid triple helix leads to and comes from coil transition. *Eur J Biochem* 90, 595-603.
- Brugniaux JV, Schmitt L, Robach P, Nicolet G, Fouillot J-P, Montereau S, Lasne F, Pialoux V, Saas P, Chorvot M-C, Cornolo J, Olsen NV, Richalet J-P. (2006) Eighteen days of "living high, training low" stimulate erythropoiesis and enhance aerobic performance in elite middle-distance runners. *J Appl Physiol* 100, 203-211.
- Buell G, Schulz M-F, Selzer G, Chollet A, Movva NR, Demon D, Escanez S, Kawashima E. (1985) Optimizing the expression in *E. coli* of a synthetic gene encoding somatomedin-C (IGF-I). *Nucleic Acids Res* 13, 1923-1938.
- Burman P, Johansson AG, Siegbahn A, Vessby B, Karlsson FA. (1997) Growth hormone (GH)-deficient men are more responsive to GH replacement therapy than women. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 550-555.

C

- Cappon J, Brasel JA, Mohan S, Cooper DM. (1994) Effect of brief exercise on circulating insulin-like growth factor I. *J Appl Physiol* 76, 2490-2496.
- Casas M, Casas H, Pagés T, Rama R, Ricart A, Ventura JL, Ibáñez J, Rodríguez FA, Viscor G. (2000) Intermittent hypobaric hypoxia induces altitude acclimation and improves the lactate threshold. *Aviat Space Environ Med* 71, 125-130.
- Casoni I, Ricci G, Ballarin E, Borsetto C, Grazi G, Guglielmini C, Manfredini F, Mazzoni G, Patracchini M, De Paoli Vitali E et al. (1993) Hematological indices of erythropoietin administration in athletes. *Int J Sports Med* 14, 307-311.
- Catlin DH, Hatton CK, Starcevic SH. (1997) Issues in detecting abuse of xenobiotic anabolic steroids and testosterone by analysis of athletes' urine. *Clin Chem* 43, 1280-8.
- Cazzola M, Mercuriali F, Brugnara C. (1997) Use of recombinant human erythropoietin outside the setting of uremia. *Blood* 89, 4248-67.

- Cazzola M. (2000) A global strategy for prevention and detection of blood doping with erythropoietin and related drugs. *Haematologica* 85, 561-563.
- Cittadini A, Cuocolo A, Merola B, Fazio S, Sabatini D, Nicolai E, Colao A, Longobardi S, Longobardi G, Sacca L. (1994) Impaired cardiac performance in GH-deficient adults and its improvement in GH replacement. *Am J Physiol* 267, E219-E225.
- Chestnut RE, Quarmby V. (2002) Evaluation of total IGF-I assay methods using samples from Type I and Type II diabetic patients. *J Immunol Meth* 259, 11-24.
- Chin E, Bondy C. (1992) Insulin-like growth factor system gene expression in the human kidney. *J Clin Endocrinol Metab* 75, 962-968.
- Clayton KL, Holly JMP, Carlsson LMS, Jones J, Cheetham TD, Taylor AM, Dunger DB. (1994) Loss of the normal relationships between growth hormone, growth hormone-binding protein and insulin-like growth factor-I in adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Endocrinol* 41, 517-524.
- Clemmons DR, Smith-Banks A, Underwood LE. (1992) Reversal of diet-induced catabolism by infusion of recombinant insulin-like growth factor-I (IGF-I) in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 75, 234-238.
- Clemmons DR. (1997) Insulin-like growth factor bindings proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 45-62.
- Connes P, Perrey S, Varray A, Prefaut C, Caillaud C. (2003) Faster oxygen uptake kinetics at the onset of submaximal cycling exercise following 4 weeks recombinant human erythropoietin (r-HuEPO) treatment. *Eur J Appl Physiol* 447, 231-238.
- Connes P, Caillaud C, Simar D, Villard S, Sicart M-T, Audran M. (2004) Strengths and weaknesses of established indirect models to detect recombinant human erythropoietin abuse on blood samples collected 48-hr post dministration. *Haematologica* 89, 891-892.
- Cook JD. (1999) The measurement of serum transferrin receptor. *Am J Med Sci* 318, 269-276.
- Cooper MJ, Zlotkin SH. (1996) Day-to-day variation of transferrin receptor and ferritin in healthy subjects with subclinical iron deficits. *Blood* 92, 2934-2939.
- Corpas E, Harman SM, Blackman MR. (1993) Human growth hormone and human aging. *Endocr Rev* 14, 20-39.
- Corrigan B. (2002) Beyond EPO. *Clin J Sport Med* 12, 242-244.

- Cotes PM. (1994) Anomalies in circulating erythropoietin levels. *Ann NY Acad Sci* 718, 103-109.
- Cotton F, Thiry P, Boeynaems J-M. (2000) Measurement of the soluble transferrin receptor by immunoturbidimetry and immunonephelometry. *Clin Biochem* 33, 263-267.
- Crist DM, Peake GT, Egan PA, Waters DL. (1988) Body composition response to exogenous GH during training in highly conditioned adults. *J Appl Physiol* 65, 579-584.
- Christ ER, Cummings MH, Westwood NB, Sawyer BM, Pearson TC, Sonksen PH, Russell-Jones DL. (1997) The importance of growth hormone in the regulation of erythropoiesis, red cell mass and plasma volume in adults with growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 2985-2990.
- Cuneo RC, Salomon F, Wilmshurst P, Byme C, Wiles CM, Hesp R, Sonksen PH. (1991) Cardiovascular effects of growth hormone treatment in growth-hormone-deficient adults: stimulation of the rennin-aldosterone system. *Clin Sci (Colch)* 81, 587-592.
- Cuneo RC, Wallace J, Sonksen P. (1998) Growth hormone abuse in elite athletes. In: Karch SB, ed. *Drug Abuse Handbook*. Boca Raton, USA: CRC Press, págs. 690-710.

D

- Dall R, Longobardi S, Ehrnborg C, Keay N, Rosen T, Jorgensen JOL, Cuneo RC, Boroujerdi MA, Cittadini A, Napoli R, Christiansen JS, Bengtsson BA, Sacca L, Baxter RC, Basset EE, Sonksen PH. (2000) The effect of four week of supraphysiological growth hormone administration on the insulin-like growth factor axis in women and men. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 4193-4200.
- Dall R, Lange KHW, Kjaer M, Jorgensen JOL, Christiansen JS, Orskov H, Flyvbjerg A. (2001) No evidence of insulin-like growth factor-binding protein 3 proteolysis during maximal exercise test in elite athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 669-674.
- Daughaday WH, Mariz IK, Blethen SL. (1980) Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: A comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol-extracted serum. *J Clin Endocrinol Metab* 51, 781-788.
- Daughaday WH, Kapadia M, Mariz IK. (1987) Serum somatomedin binding proteins: physiologic significance and interference in radioligand assay. *J Lab Clin Med* 109, 355-363.
- Deicher R, Horl WH. (2004) Differentiating factors between erythropoiesis-stimulating agents: a guide to selection for anemia of chronic kidney disease. *Drugs* 64, 499-509.

- Delorme E, Lorenzini T, Giffin J, Martin F, Jacobsen F, Boone T, Elliot S. (1992) Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin. *Biochemistry* 31, 9871-9876.
- De Palo EF, Gatti R, Lancerin F, Cappellin E, Spinella P. (2001) Correlations of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor I (IGF-I): effects of exercise and abuse by athletes. *Clin Chim Acta* 305, 1-17.
- De Palo EF, Gatti R, Lancerin F, Cappellin E, Sartorio A, Spinella P. (2002a) The measurement of insulin-like growth factor I (IGF-I) concentration in random urine samples. *Clin Chem Lab Med* 40, 574-578.
- De Palo EF, Gatti R, Lancerin F, Cappellin E, Soldà G, De Palo CB, Spinella P. (2002b) Urinary insulin-like growth factor I in athletes, before and after physical exercise, and in sedentary subjects. *Clin Chim Acta* 322, 51-57.
- De Palo EF, Gatti R, Lancerin F, Cappellin E, De Palo CB, Spinella P. (2005) Urinary insulin-like growth factor-I measurement in an actual sport competition, an additional approach in laboratory antidoping test. *Clin Chim Acta* 351, 73-78.
- De Paoli Vitali E, Guglielmini C, Casoni I, Vedovato M, Gilli P, Farinelli A, Salvatorelli G, Conconi F. (1988) Serum erythropoietin in cross country skiers. *Int J Sports Med* 9, 99-101.
- Deruisseau KC, Roberts LM, Kushnick MR, Evans AM, Austin K, Haymes EM. (2004) Iron status of young males and females performing weight-training exercise. *Med Sci Sports Exerc* 36, 241-248.
- Deyssing R, Frisch H, Blum WF, Waldhor T. (1993) Effect of growth hormone treatment on hormonal parameters, body composition and strength in athletes. *Acta Endocrinol (Copenh)* 128, 313-318.
- Doessing S, Kjaer M. (2005) Growth hormone and connective tissue in exercise. *Scand J Med Sci Sports* 15, 202-210.

E

- Eagleton HJ, Littlewood TJ. (2003) Update on the clinical use and misuse of erythropoietin. *Curr Haematol Rep* 2, 109-115.
- Eckardt KU, Boutillier U, Kurtz A, Schopen M, Koller EA, Bauer C. (1989) Rate of erythropoietin formation in humans in response to acute hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol* 66, 1785-1788.

- Eichner E. (1992) Sports anemia, iron supplementation, and blood doping. *J Lab Clin Med* 120, 359-360.
- Ehrnborg C, Bengtsson BA, Rosen T. (2000) Growth hormone abuse. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 14, 71-77.
- Ehrnborg C, Lange KHW, Dall R, Christiansen JS, Lundberg P-A, Baxter RC, Boroujerdi MA, Bengtsson B-A, Healy M-L, Pentecost C, Longobardi S, Napoli R, Rosen T. (2003) The growth hormone/insulin-like growth factor-I axis hormones and bone markers in elite athletes in response to a maximum exercise test. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 394-401.
- Ekblom B. (1998) Erythropoietin. In: Karch SB, ed. *Drug Abuse Handbook*. Boca Raton, USA: CRC Press, págs. 710-720.
- Ekblom B, Berglund B. (1991a) Effect of erythropoietin administration on maximal aerobic power. *Scand J Med Sci Sports* 1, 88-93.
- Ekblom B, Berglund B. (1991b) Effect of recombinant human erythropoietin administration on blood pressure and some haematological parameters in healthy males. *J Int Med* 229, 125-130.
- Eliakim A, Brasel JA, Mohan S, Barstow TJ, Berman N, Cooper DM. (1996) Physical fitness, endurance training, and the growth hormone-insulin-like growth factor I system in adolescent females. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 3986-3992.
- Eliakim A, Brasel JA, Mohan S, Wong WLT, Cooper DM. (1998) Increased physical activity and the growth hormone-IGF-I axis in adolescent males. *Am J Physiol* 275, R308-R314.
- EAEMP, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. ICH Topic Q2B. Validation of Analytical Procedures: Methodology. (CPMP/ICH/281/95) Step 4. Consensus Guideline. November 1996.
- EAEMP, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. VICH Topic GL2. Validation: Methodology. (EMEA/CVMP/591/98) Step 7. Consensus Guideline. (1998)
- ENAC, Entidad Nacional de Acreditación. Guía para los laboratorios que realizan validaciones de métodos de análisis químicos. G-CSQ-02. (1996)
- Erslev AJ. (1974) In vitro production of erythropoietin by kidneys perfused with a serum free solution. *Blood* 44, 77-85.
- Everts V, van der Zee E, Creemers L, Beertsen W. (1996) Phagocytosis and intracellular digestion of collagen, its role in turnover and remodelling. *Histochem J* 28, 229-245.

F

- FDA/CDER, Food and Drug Administration / Center for Drug Evaluation and Research. GI/BMV, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services. May 2001
- Feelders RA, Kuiper-Kramer EPA, Van Eijk HG. (1999) Structure, function and clinical significance of transferrin receptors. *Clin Chem Lab Med* 37, 1-10.
- Felsing NE, Brasel JA, Cooper DM. (1992) Effect of low and high intensity exercise on circulating growth hormone in men. *J Clin Endocrinol Metab* 75, 157-162.
- Filaire E, Jouanel P, Colombier M, Begue RJ, Lac G. (2003) Effects of 16 weeks of training prior to a major competition on hormonal and biochemical parameters in young elite gymnasts. *J Pediatr Endocrinol Metab* 16, 741-750.
- Fisher JW, Birdwell BJ. (1961) Erythropoietin production by the in situ perfused kidney. *Acta Haematol* 26, 224-232.
- Flanagan DE, Taylor MC, Parfitt V, Mardell R, Wood PJ, Leatherdale BA. (1997) Urinary growth hormone following exercise to assess growth hormone production in adults. *Clin Endocrinol (Oxf)* 46, 425-429.
- Fleischmajer R, Perlish JS, Burgeson RE, Shaikh-Bahai F, Timpl R. (1990) Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis. *Ann NY Acad Sci* 580, 161-175.
- Fleiss JL. (1999) *The design and analysis of clinical experiments*. Chichester, UK: Wiley Classics Library.
- Flowers CH, Skikne BS, Covell AM, Cook JD. (1989) The clinical measurement of serum transferrin receptor. *J Lab Clin Med* 114, 368-377.
- Fried W. (1972) The liver as the source of extrarenal erythropoietin production. *Blood* 40, 671-677.
- Fried W. (1995) Erythropoietin. *Annu Rev Nutr* 15, 353-377.
- Frisch H. (1999) Growth hormone and body composition in athletes. *J Endocrinol Invest* 22, 106-109.
- Fukuda NM, Sasaki H, Lopez L, Fukuda M. (1989) Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: The role of carbohydrates. *Blood* 73, 84-89.

G

- Gareau R, Gagnon MG, Thellend C, Chenard C, Audran M, Chanal JL, Ayotte C, Brisson GR. (1994) Transferrin soluble receptor : a possible probe for detection of erythropoietin abuse by athletes. *Horm Metab Res* 26, 311-312.
- Gareau R, Audran M, Baynes RD, Borsetto C, Grazi G, Guglielmini C, Manfredini F, Mazzoni G, Patracchini M, De Paoli Vitali E, et al. (1996) Erythropoietin abuse in athletes. *Nature* 380, 113.
- Ge R-L, Witkowski S, Zhang Y, Alfrey C, Sivieri M, Karlsen T, Resaland GK, Harber M, Stray-Gundersen J, Levine BD. (2002) Determinants of erythropoietic release in response to short-term hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol* 92, 2361-2367.
- Ghigo E, Aimaretti G, Maccario M, Fanciulli G, Arvat E, Minuto F, Giordano G, Delitala G, Camanni F. (1999) Dose-response study of GH effects on circulating IGF-I and IGFBP-3 levels in healthy young men and women. *Am J Physiol* 276, E1009-1013.
- Gore CJ, Parisotto R, Ashenden MJ, Stray-Gundersen J, Sharpe K, Hopkins W, Emslie KR, Howe C, Trout GJ, Kazlauskas R, Hahn AG. (2003) Second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica* 88, 333-344.
- Gregory CJ, Eaves AC. (1974) Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses. *Blood* 49, 855-864.
- Gregory CJ, Eaves AC. (1978) Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by number of physical and biologic properties. *Blood* 51, 527-537.
- Guler HP, Zapf J, Schmid C, Froesch ER. (1989) Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates. *Acta Endocrinol (Copenhagen)* 121, 753-758.
- Gunga H-C, Kirsch K, Rocker L, Schobersberger W. (1994) Time course of erythropoietin, triiodothyronine, thyroxine, and thyroid-stimulating hormone at 2,315 m. *J Appl Physiol* 76, 1068-1072.
- Gunga H-C, Wittels P, Gunther T, Kanduth B, Vormann J, Rocker L, Kirsch K. (1996) Erythropoietin in 29 men during and after prolonged physical stress combined with food and fluid deprivation. *Eur J Appl Physiol* 73, 11-16.

H

- Halila R, Peltonen L. (1984) Neutral protease cleaving the N-terminal propeptide of type III procollagen: partial purification and characterization of the enzyme from smooth muscle cells of bovine aorta. *Biochemistry* 23, 1251-1256.
- Hanssen KF. (1972) Immunoreactive growth hormone in human urine. *Acta Endocrinol (Copenh)* 71, 665-676.
- Harrela M, Koistinen H, Kaprio J, Lehtovirta M, Tuomilehto J, Eriksson J, Toivanen L, Koskenvuo M, Leinonen P, Koistinen R, Seppala M. (1996) Genetic and environmental components of interindividual variation in circulating levels of IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, and IGFBP-3. *J Clin Invest* 98, 2612-2615.
- Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, McDowall RD. (1998) Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J Pharm Anal* 17, 193-218.
- Healy ML, Gibney J, Russell-Jones DL, Pentecost C, Croos P, Sonksen PH, Umpleby AM. (2003) High dose growth hormone exerts an anabolic effect at rest and during exercise in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 5221-5226.
- Healy ML, Dall R, Gibney J, Basset E, Ehrnborg C, Pentecost C, Rosen T, Cittadini A, Baxter RC, Sonksen PH. (2005) Towards the development of a test for growth hormone abuse. Study of extreme physiological ranges of growth hormone dependent markers in 813 elite athletes in the post-competition setting. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 641-649.
- Heinicke K, Prommer N, Cajigal J, Viola T, Behn C, Schmidt W. (2003) Long-term exposure to intermittent hypoxia results in increased haemoglobin mass, reduced plasma volume, and elevated erythropoietin plasma levels. *Eur J Appl Physiol* 88, 535-543.
- Hellebostad M, Haga P, Cotes PM. (1988) Serum immunoreactive erythropoietin in healthy normal children. *Br J Haematol* 70, 247-50.
- Hesse V, Jahreis G, Schambach H, Vogel H, Vilser C, Seewald HJ, Borner A, Deichl A. (1994) Insulin-like growth factor I correlations to changes of the hormonal status in puberty and age. *Exp Clin Endocrinol* 102, 289-298.
- Hikawa A, Nomata Y, Suzuki T, Ozasa H, Yamada O. (1996) Soluble transferrin receptor-transferrin complex in serum: Measurement by latex agglutination nephelometric immunoassay. *Clin Chim Acta* 254, 159-172.

- Hildebrand RL, Wanninger R, Bowers LD. (2003) An update on regulatory issues in antidoping programs in sport. *Curr Sports Med Rep* 2, 226-232.
- Hintz RL, Liu F. (1977) Demonstration of specific plasma protein binding sites for somatomedin. *J Clin Endocrinol Metab* 45, 988-995.
- Ho KY, Evans WS, Blizzard RM, Veldhuis JD, Merriam GR, Samojlik E, Furlanetto R, Rogol AD, Kaiser DL, Thorner MO. (1987) Effects of sex and age on the 24-hour profile of growth hormone secretion in man: importance of endogenous estradiol concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 64, 51-58.
- Ho KY, Weissberger AJ, Stuart MC, Day RO, Lazarus L. (1989) The pharmacokinetics, safety and endocrine effects of authentic biosynthetic human growth hormone in normal subjects. *Clin Endocrinol* 30, 335-345.
- Holl RW, Schwarz U, Schauwecker P, Benz R, Veldhuis JD, Heinze E. (1993) Diurnal variation in the elimination rate human growth hormone (GH): the half life of serum GH is prolonged in the evening, and affected by the source of the hormone, as well as by the body size and serum estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 77, 216-220.
- Holman SR, Baxter RC. (1996) Insulin-like growth factor binding protein-3: factors affecting binary and ternary complex formation. *Growth Regul* 6, 42-47.
- Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. (2002) Ghrelin and the regulation of food intake and energy balance. *Mol Interv* 2, 494-503.
- Huebers HA, Beguin Y, Pootrakul P, Einspahr D, Finch CA. (1990) Intact transferrin receptors in human plasma and their relation to erythropoiesis. *Blood* 75, 102-107.
- Huff RL, Lawrence JH, Siri WE, Wasserman LR, Hennessy TG. (1951) Effects of changes in altitude on hematopoietic activity. *Medicine* 30, 197-217.
- Hussain MA, Schmitz O, Mengel A, Glatz Y, Christiansen JS. (1994) Comparison of the effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on substrate oxidation and on insulin sensitivity in growth hormone-deficient humans. *J Clin Invest* 94, 1126-1133.
- Hymer WC, Kraemer WJ, Nindl BC, Marx JO, Benson DE, Welsch JR, Mazzetti SA, Volek JS, Deaver DR. (2001) Characteristics of circulating growth hormone in women after heavy acute resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281, E878-E887.

I

Iourin O, Mattu TS, Mian N, Keir G, Winchester B, Dwek RA, Rudd PM. (1996) The identification of abnormal glycoforms of serum transferrin in carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type I by capillary zone electrophoresis. *Glycoconj J* 13, 1031-1042.

ISO, The International Standard Organization. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO/IEC 17025 (1999).

J

Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, Plzak L. (1957) Role of the kidney in the erythropoiesis. *Nature* 179, 633.

Jahreis G, Hesse V, Schmidt HE, Scheibe J. (1989) Effect of endurance exercise on somatomedin-C/insulin-like growth factor I concentration in male and female runners. *Exp Clin Endocrinol* 94, 89-96.

Jahreis G, Kauf E, Frohmer G, Schmidt HE. (1991) Influence of intensive exercise on insulin-like growth factor I, thyroid and steroid hormones in female gymnasts. *Growth Regul* 1, 95-99.

Jelkmann W. (2000) Use of recombinant human erythropoietin as an antianemic and performance enhancing drug. *Curr Pharm Biotech* 1, 11-31.

Jiménez C, Ventura R, Segura J, de la Torre R. (2004) Protocols for stability and homogeneity studies of drugs for its application to doping control. *Anal Chim Acta* 515, 323-31.

Johnson V, Mack T. (1977) Renal extraction, filtration, absorption, and catabolism of growth hormone. *Am J Physiol* 233, F185-196.

Jorgensen JO, Pedersen SA, Thuesen L, Jorgensen J, Ingemman-Hansen T, Skakkebaek NE, Christiansen JS. (1989) Beneficial effects of growth hormone in GH-deficient adults. *Lancet* I (8649), 1221-1225.

Jorgensen JOL. (1991) Human growth hormone replacement therapy: pharmacological and clinical aspects. *Endo Rev* 12, 189-207.

Jorgensen JO, Moller J, Alberti KG, Schmitz O, Christiansen JS, Orskov H, Moller N. (1993) Marked effects of sustained low growth hormone (GH) levels on the day-to-day fuel metabolism: studies in GH-deficient patients and healthy untreated subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 77, 1589-1596.

- Jorgensen JOL, Vahl N, Hansen TB, Skjaerbaek C, Fisker S, Orskov H, Hagen C, Chirstiansen JS. (1998) Determinants of serum insulin-like growth factor I in growth hormone deficient adults as compared to healthy subjects. *Clin Endocrinol* 48, 479-486.
- Jorgensen HG, Elliott MA, Priest R, Smith KD. (1998) Modulation of sialyl Lewis X binding to E-selectin by glycoforms of alpha-1-acid glycoprotein expressed in rheumatoid arthritis. *Biomed Chromatogr* 12, 343-349.
- Julian CG, Gore CJ, Wilber RL, Daniels JT, Fredericson M, Stray-Gundersen J, Hahn AG, Parisotto R, Levine BD. (2004) Intermittent normobaric hypoxia does not alter performance or erythropoietic markers in highly trained distance runners. *J Appl Physiol* 96, 1800-1807.
- Juul A, Bang P, Hertel NT, Main K, Dalgaard P, Jorgensen K, Muller J, Hall K, Skakkebaek NE. (1994a) Serum insulin-like growth factor-I in 1030 healthy children, adolescents, and adults: Relation to age, sex, stage of puberty, testicular size, and body mass index. *J Clin Endocrinol Metab* 78, 744-752.
- Juul A, Main K, Blum WF, Lindholm J, Ranke MB, Skakkebaek NE. (1994b) The ratio between serum levels of insulin growth factor (IGF)-I and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2 and 3) decreases with age in healthy adults and is increased in acromegalic patients. *Clin Endocrinol* 41, 85-93.
- Juul A, Scheike T, Pedersen AT, Main KM, Andersson A-M, Pedersen LM, Skakkebaek NE. (1997) Changes in serum concentrations of growth hormone, insulin, insulin-like growth factor and insulin-like growth factor-binding proteins 1 and 3 and urinary growth hormone excretion during the menstrual cycle. *Hum Reprod* 12, 2123-2128.

K

- Kanaley JA, Weatherup-Dentes MM, Jaynes EB, Hartman ML. (1999) Obesity attenuates the growth hormone response to exercise. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 3156-3161.
- Kargotich S, Goodman C, Keast D, Morton D. (1998) The influence of exercise-induced plasma volume changes on the interpretation of biochemical parameters used for monitoring exercise, training and sport. *Sports Med* 26, 101-17.
- Kaupilla S. (1998) Type I and type III collagen synthesis and maturation in malignant tumours. *Acta Univ Oul D* 451, 1-64.

- Kelly PA, Edery M, Finidori J, Postel-Vinay MC, Gougou L, Ali S, Dinerstein H, Sotiropoulos A, Lochman H, Ferrag F, et al. (1994) Receptor domains involved in signal transduction of prolactin and growth hormone. *Proc Soc Exp Biol Med* 206, 280-283.
- Ketelslegers J-M, Maiter D, Maes M, Underwood LE, Thissen J-P. (1995) Nutritional regulation of insulin-like growth factor-I. *Metabolism* 44, 50-57.
- Kicman AT, Miell JP, Teale JD, Powrie J, Wood PJ, Laidler P, Milligan PJ, Cowan DA. (1997) Serum IGF-I and IGF binding proteins 2 and 3 as potential markers of doping with human GH. *Clin Endocrinol* 47, 43-50.
- Khumalo H, Gomo ZAR, Moyo VM, Gordeuk VR, Saungweme T, Rouault TA, Gangaidzo IT. (1998) Serum transferrin receptors are decreased in the presence of iron overload. *Clin Chem* 44, 40-44.
- Klausen T, Dela F, Hippe E, Galbo H. (1993) Diurnal variations of serum erythropoietin in trained and untrained subjects. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 67, 545-548.
- Klausen T, Poulsen TD, Fogh-Andersen N, Richalet J-P, Nielsen OJ, Olsen NV. (1996) Diurnal variations of serum of erythropoietin at sea level and altitude. *Eur J Appl Physiol* 72, 297-302.
- Knaupp W, Khilnani S, Sherwood J, Scharf S, Steinberg H. (1992) Erythropoietin response to acute normobaric hypoxia in humans. *J Appl Physiol* 73, 837-840.
- Kohgo Y, Nishisato T, Kondo H, Tsushima N, Niitsu Y, Urushizaki I. (1986) Circulating transferrin receptor in human serum. *Br J Haematol* 64, 277-281.
- Kohgo Y, Niitsu Y, Kondo H, Kato J, Tsushima N, Sasaki K, Hirayama M, Numata T, Nishisato T, Urushizaki I. (1987) Serum transferrin receptor as a new index of erythropoiesis. *Blood* 70, 1955-1958.
- Koistinen H, Koistinen R, Selenius L, Ylikorkala O, Seppala M. (1996) Effect of marathon run on serum IGF-I and IGF-binding protein 1 and 3 levels. *J Appl Physiol* 80, 760-764.
- Koury MJ, Bondurant MC. (1992) The molecular mechanism of erythropoietin action. *Eur J Biochem* 210, 649-663.
- Koziris LP, Hickson RC, Chatterton RT, Groseth RT, Christie JM, Goldflies DG, Unterman TG. (1999) Serum levels of total and free IGF-I and IGFBP-3 are increased and maintained in long-term training. *J Appl Physiol* 86, 1436-1442.

- Kraemer WJ, Gordon SE, Fleck SJ, Marchitelli LJ, Mello R, Dziados JE, Friedl K, Harman E, Maresh C, Fry AC. (1991) Endogenous anabolic hormonal and growth factor responses to heavy resistance exercise in males and females. *Int J Sports Med* 12, 228-235.
- Kraemer WJ, Hakkinen K, Newton RU, Nindl BC, Volek JS, McCormick M, Gotshalk LA, Gordon SE, Fleck SJ, Campbell WW, Putukian M, Evans WJ. (1999) Effects of heavy-resistance training on hormonal response patterns in young vs. older men. *J Appl Physiol* 87, 982-992.
- Kratzsch J, Selisko T, Birkenmeier G. (1995) Identification of transformed alpha 2-macroglobulin as a growth hormone-binding protein in human blood. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 585-590.
- Kuiper-Kramer EPA, Huisman CMS, van Raan J, van Eijk HG. (1996) Analytical and clinical implications of soluble transferrin receptors in serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 34, 645-649.
- Kuiper-Kramer EPA, van Raan J, van Eijk HG. (1997) A new assay for soluble transferrin receptors in serum: Time for standarization. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 35, 793.
- Kupfer SR, Underwood LE, Baxter RC, Clemmons DR. (1993) Enhancement of the anabolic effects of growth hormone and insulin-like growth factor I by use of both agents simultaneously. *J Clin Invest* 91, 391-396.
- Kuratowska Z, Lewartowski B, Michalski E. (1961) Studies of the production of erythropoietin by isolated perfused organs. *Blood* 18, 527-534.
- Kurtz A, Eckardt K-U, Tannahill L, Bauer C. (1988) Regulation of erythropoietin production. *Contrib Nephrol* 66, 1-15.
- Kuvibidila S, Warriar RP, Ode D, Yu L. (1996) Serum transferrin receptor concentration in women with mild malnutrition. *Am J Nutr* 63, 596-601.

L

- Lasne F, de Ceaurriz J. (2000) Recombinant erythropoietin in urine. *Nature* 405, 635.
- Lasne F. (2001) Double-blotting: a solution to the problem of non-specific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures. *J Immunol Methods* 253, 125-131.

- Lasne F, Martin L, Crepin N, de Ceaurriz J. (2002) Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal Biochem* 311, 119-126.
- Laurie P. (1997) Epidemiologic approach of doping in sport. A review. *J Sport Med Phys Fitness* 37, 218-224.
- Lawrence CM, Ray S, Babyonyshezh M, Galluser R, Borhani D, Harrison S. (1999) Crystal structure of the ectodomain of human transferrin receptor. *Science* 286, 779-782.
- Lee WL, Chen JW, Ting CT, Ishiwata T, Lin SJ, Korc M, Wang PH. (1999a) Insulin-like growth factor I improves cardiovascular function and suppresses apoptosis of cardiomyocytes in dilated cardiomyopathy. *Endocrinology* 140, 4831-4840.
- Lee WL, Chen JW, Ting CT, Lin SJ, Wang PH. (1999b) Changes of the insulin-like growth factor I system during acute myocardial infarction: implications of left ventricular remodelling. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 1575-1581.
- Leger J, Reverchon C, Porquet D, Noel M, Czernichow P. (1995) The wide variation in urinary excretion of human growth hormone in normal growing and growth hormone-deficient children limits its clinical usefulness. *Horm Res* 44, 425-429.
- Le Roith D. (1996) Insulin-like growth factor receptors and bindings proteins. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 10, 49-73.
- Le Roith D, Scavo L, Butler A. (2001) What is the role of circulating IGF-I? *Trends Endocrinol Metab* 12, 48-52.
- Levine BD, Stray-Gundersen J. (1997) "Living high-training low": effect of moderate-altitude acclimatization with low-altitude training on performance. *J Appl Physiol* 83, 102-112.
- Levine BD. (2002) Intermittent hypoxic training: fact and fancy. *High Alt Med Biol* 3, 177-193.
- Lindholm C, Hirschberg AL, Carlstrom K, von Schoultz B. (1993) Hormone anabolic/catabolic balance in female endurance athletes. *Gynecol Obstet Invest* 36, 176-180.
- Lindstedt G, Lundberg P-A. (1998) Are current methods of measurement of erythropoietin (EPO) in human plasma or serum adequate for the diagnosis of polycythaemia vera and the assessment of EPO deficiency? *Scand J Clin Lab Invest* 58, 441-458.

- Linsley KB, Chan SY, Chan S, Reinhold BB, Lisi PJ, Reinhold VN. (1994) Applications of electrospray mass spectrometry to erythropoietin N- and O-linked glycans. *Anal Biochem* 219, 207-217.
- Lippi G, Guidi G. (2000) Laboratory screening for erythropoietin abuse in sport: An emerging challenge. *Clin Chem Lab Med* 38, 13-19.
- Llop E, Gutiérrez Gallego R, Belalcázar V, Gerwig GJ, Kamerling JP, Segura J, Pascual JA. (2004) Structural features of EPO and analogues: Glycosylation profiles. In: Schanzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck U, eds. *Recent Advances in Doping Analysis (12)*. Proceedings of the Manfred Donike Workshop. 22nd Cologne Workshop on Dope Analysis. Cologne, Germany: Verlag Sport & Buch Strauß, págs. 297-307.
- Lofqvist K, Andersson E, Gelander L, Rosberg S, Blum WF, Wikland KA. (2001) Reference values for IGF-I throughout childhood and adolescence: A model that accounts simultaneously for the effect of gender, age, and puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 68, 5870-5876.
- Longobardi S, Keay N, Ehrnborg C, Cittadini A, Rosen T, Dall R, Boroujerdi MA, Bassett EE, Healy ML, Pentecost C, Wallace JD, Powrie J, Jorgensen JO, Sacca L. (2000) Growth hormone (GH) effects on the bone and collagen turnover in healthy adults and its potential as a marker of GH abuse in sports: A double blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 1505-1512.

M

- Ma DDF, Wei A-Q, Downton LA, Lau KS, Wu Z-H. (1992) Assessment of an EIA for measuring human serum erythropoietin as compared with RIA and an in-vitro bioassay. *Br J Haematol* 80, 431-436.
- MacDougall IC, Roberts DE, Coles GA, Williams JD. (1991) Clinical pharmacokinetics of epoetin (recombinant human erythropoietin). *Clin Pharmacokinet* 20: 99-113.
- MacDougall IC, Gray SJ, Elston O, Breen C, Jenkins B, Browne J, Egrie J. (1999) Pharmacokinetics of novel erythropoiesis protein compared with epoetin- α in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 10, 2392-2395.
- Maes M, Bosmans E, Scharpe S, Hendriks D, Cooremans W, Neels H, De Meyer F, D'Hondt P, Peeters D. (1997) Components of biological variation in serum soluble transferrin receptor:

- Relationships to serum iron, transferrin, ferritin concentrations, and immune and haematological variables. *Scand J Clin Lab Invest* 57, 31-41.
- Malcovati L, Pascutto C, Cazzola M. (2003) Hematologic passport for athletes competing in endurance sports: feasibility study. *Haematologica* 88, 570-581.
- Malczewska J, Blach W, Stupnicki R. (2000) The effects of physical exercise on the concentrations of ferritin and transferrin receptor in plasma of female judoist. *Int J Sports Med* 21, 175-179.
- Malczewska J, Stupnicki R, Blach W, Turek-Lepa E. (2004) The effects of physical exercise on the concentrations of ferritin and transferrin receptor in plasma of male judoist. *Int J Sports Med* 25, 516-521.
- Manetta J, Brun JF, Fedou C, Maimoun L, Prefaut C, Mercier J. (2003) Serum levels of insulin-like growth factor-I, and IGF-binding proteins-1 and 3 in middle-aged and young athletes versus sedentary men : Relationship with glucose disposal. *Metabolism* 52, 821-826.
- Marsden JT, Sherwood RA, Peters TJ. (1999) Evaluation of six erythropoietin kits. *Ann Clin Biochem* 36, 380-387.
- Marx JO, Ratamess NA, Nindl BC, Gotshalk LA, Volek JS, Dohi K, Bush JA, Gomez AL, Mazzetti SA, Fleck SJ, Hakkinen K, Newton RU, Kraemer WJ. (2001) Low-volume circuit versus high-volume periodized resistance training in women. *Med Sci Sports Exerc* 33, 635-643.
- Melmed S, Ho K, Klibanski A, Reichlin S, Thorner M. (1995) Clinical Review 75: Recent advances in pathogenesis, diagnosis, and management of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 3395-3402.
- Meng H, Burleigh BD, Kelly GM. (1988) Reduction studies on bacterial recombinant somatomedin C/insulin-like growth factor-I. *J Chromatogr* 443, 183-192.
- Miller NJ, Miller JC. (2002) *Estadística y quimiometría para química analítica*. Madrid, España: Pearson Educación.
- Minuto F, Barreca A, Melioli G. (2003) Indirect evidence of hormona abuse. Proof of doping? *J Endocrinol Invest* 26, 919-923.
- Moller N, Jorgensen JO, Moller J, Orskov L, Ovesen P, Schmitz O, Christiansen JS, Orskov H. (1995) Metabolic effects of growth hormone in humans. *Metabolism* 44, 33-36.
- Mollison PL. (1983) *Transfusion in clinical medicine*. Blackwell Sci Pub Oxford; págs. 121-4.

Moore LG, Mylek ME. (1993) A novel method for the extraction of sheep insulin-like growth factors-I and -II from plasma prior to radioimmunoassay. *J Endocrinol* 137, 239-245.

Moss MS, Cowan DA. (1986) Drug abuse in sport. In: Moffat AC. *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*. London, GB: The Pharmaceutical Press, págs. 87-100.

Musey VC, Goldstein S, Farmer PK, Moore PB, Phillips LS. (1993) Differential regulation of IGF-I and IGF-binding protein-1 by dietary composition in humans. *Am J Med Sci* 305, 131-138.

N

Navarro JD. (1987) Acromegaly. *Clin Endocrinol Oxf* 26, 481-512.

Niemela O, Risteli L, Sotaniemi EA, Risteli J. (1982) Heterogeneity of the antigens related to the aminoterminal propeptide of type III procollagen in human serum. *Clin Chim Acta* 124, 39-44.

Niemela O. (1985) Radioimmunoassays for type III procollagen amino-terminal peptides in humans. *Clin Chem* 31, 1310-1314.

Niemela O, Risteli L, Parkkinen J, Risteli J. (1985) Purification and characterization of the N-terminal propeptide of human type III procollagen. *Biochem J* 232, 145-150.

Niemela O. (1994) Collagen breakdown products as markers of fibrosis and cirrhosis. *Alcohol Alcohol Suppl* 2, 354-352.

Nikolaidis MG, Michailidis Y, Mougios V. (2003) Variation of soluble transferrin receptor and ferritin concentrations in human serum during recovery from exercise. *Eur J Appl Physiol* 89, 500-502.

Nindl BC, Kraemer WJ, Marx JO, Arciero PJ, Dohi K, Kellogg MD, Loomis GA. (2001) Overnight responses of the circulating IGF-I system after acute, heavy-resistance exercise. *J Appl Physiol* 90, 1319-1326.

Nindl BC, Castellani JW, Young AJ, Patton JF, Khosravi MJ, Diamandi A, Montain SJ. (2003a) Differential responses of IGF-I molecular complexes to military operational field training. *J Appl Physiol* 95, 1083-1089.

Nindl BC, Kraemer WJ, Marx JO, Tuckow AP, Hymer WC. (2003b) Growth hormone molecular heterogeneity and exercise. *Exerc Sport Sci Rev* 31, 161-166.

Nissen-Lie G, Birkeland K, Hemmersbach P, Skibeli V. (2004) Serum sTfR levels may indicate charge profiling of urinary r-hEPO in doping control. *Med Sci Sports Exerc* 36, 588-593.

Nguyen UN, Mougin F, Simon-Rigaud ML, Rouillon JD, Marguet P, Regnard J. (1998) Influence of exercise duration on serum insulin-like growth factor and its binding proteins in athletes. *Eur J Appl Physiol* 78, 533-537.

O

Olney RC. (2003) Regulation of bone mass by growth hormone. *Med Pediatr Oncol* 41, 228-234.

Overbay DK, Manley HJ. (2002) Darbepoetin- α : A review of the literature. *Pharmacotherapy* 22, 889-897.

Owen WE, Roberts WL. (2004) Performance characteristics of the Immunlite 2000 erythropoietin assay. *Clin Chim Acta* 340, 213-217.

P

Paritpokee N, Bhokaisawan N, Wiwanitkit V, Boonchalermvichian C. (2001) Methodology evaluation of a new immunoturbidimetric method for measuring serum soluble transferrin receptor. *Asian Pac J Allergy Immunol* 19, 207-211.

Parisotto R, Gore CJ, Ashenden MJ, Olds TS, Martin DT, Pyne DB, Gawthorn K, Hahn AG. (2000) Reticulocyte parameters as potential discriminators of recombinant human erythropoietin abuse in elite athletes. *Int J Sports Med* 21, 471-479.

Parisotto R, Gore CJ, Emslie KR, Ashenden MJ, Brugnara C, Howe C, Martin DT, Trout GJ, Hahn AG. (2000) A novel method utilizing markers of altered erythropoiesis for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica* 85, 564-572.

Parisotto R, Wu M, Ashenden MJ, Emslie KR, Gore CJ, Howe C, Kazlauskas R, Sharpe K, Trout GJ, Xie M, Hahn AG. (2001) Detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes utilizing markers of altered erythropoiesis. *Haematologica* 86, 128-137.

Parisotto R, Ashenden MJ, Gore CJ, Sharpe K, Hopkins W, Hahn AG. (2003) The effect of common hematologic abnormalities on the ability of blood models to detect erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica* 88, 931-940.

Pascual JA, Lasne F, Howe C, Saugy M, Hemmersbach P, Belalcazar V, Martin L, Grainger J, Pfister Y, Mangin P, Nissen-Lie G, Skibeli V. (2002) Project for inter-laboratory comparison of the method for the detection of rhEPO in human urine. Results, conclusions and current

status. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck-Engelke U, eds. *Recent Advances in Doping Analysis* (10). Klön, Germany: Sport und Buch Straub, págs. 135-144.

Pasqualetti P, Casale R. (1996) Circadian rhythm of serum erythropoietin in healthy subjects. *Riv Eur Sci Med Farmacol* 18, 91-93.

Pasqualetti P, Casale R. (1996) No influence of aging on the circadian rhythm of erythropoietin in healthy subjects. *Gerontology* 43, 206-209.

Passing H, Bablok W. (1983) A new biomedical method procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. *J Clin Chem Clin Biochem* 21, 709-720.

Pearson D, Shaw S. (1982) *Life Extension: A Practical Scientific Approach*. New York: Warner Books.

Penalva A, Baldelli R, Camina JP, Cerro AL, Micic D, Tamburrano G, Dieguez C, Casanueva FF. (2001) Physiology and possible pathology of growth hormone secretagogues. *J Pediatr Endocrinol Metab* 14, 1207-1212.

Pierard D, Nusgens BV, Lapiere CM. (1984) Radioimmunoassay for the amino-terminal sequences of type III procollagen in human body fluids measuring fragmented precursor sequences. *Anal Biochem* 141, 127-136.

Popii V, Baumann G. (2004) Laboratory measurement of growth hormone. *Clin Chim Acta* 350, 1-16.

Poortmans CJ. (1984) Exercise and renal function. *Sports Med* 1, 125-153.

Q

Quarmby V, Quan C, Ling V, Compton P, Canova-Davis E. (1998) How much insulin-like growth factor I (IGF-I) circulates? Impact of standardization on IGF-I assay accuracy. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 1211-1216.

R

Raben MS. (1962) Clinical use of human growth hormone. *New Engl J Med* 266, 82-86.

Rahbeck-Nielsen H, Roepstoff P, Reischl H, Wozny M, Koll H, Haselbeck A. (1997) Glycopeptide profiling of human urinary erythropoietin by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrometry* 32, 948-958.

- Raya G, Henry J, Steinmetz J, Herbeth B, Siest G. (2001) Soluble transferrin receptor (sTfR): Biological variations and reference limits. *Clin Chem Lab Med* 39, 1162-1168.
- Remacha AF. (1992) Cambios en la serie eritroide inducidos por el ejercicio. *Biol Clin Hematol* 14, 169-174.
- Remacha AF, Ordoñez J, Barcelo MJ, Garcia-Die F, Arza B, Estruch A. (1994) Evaluation of erythropoietin in endurance runners. *Haematologica* 79, 350-352.
- Remacha A, Sarda M, Parellada M, Ubeda J, Manteiga R. (1998) The role of serum transferrin receptor in the diagnosis of iron deficiency. *Haematologica* 83, 963-966.
- Rennie MJ. (2003) Claims for the anabolic effects of growth hormone: a case of the Emperor's new clothes? *Br J Sports Med* 37, 100-105.
- Reynafarje C, Ramos J, Faura J, Villavicencio D. (1964) Humoral control of erythropoietin activity in man during and after altitude exposure. *Proc Soc Exp Biol Med* 116, 649-650.
- Rice L, Ruiz W, Driscoll T, Whitley CE, Tapia R, Hachey DL, Gonzalez GF, Alfrey CP. (2001) Neocytolysis on descent from altitude: a newly recognized mechanism for the control of red cell mass. *Ann Intern Med* 134, 652-656.
- Richalet J-P, Souberbielle J-C, Antezana A-M, Dechaux M, Le Trong J-L, Bienvenu A, Daniel F, Blanchot C, Zittoun J. (1994) Control of erythropoietin in humans during prolonged exposure to the altitude of 6,542 m. *Am J Appl Physiol* 266, R756-R764.
- Rickert VI, Pawlak-Morello C, Sheppard V, Jay MS. (1992) Human growth hormone: a new substance of abuse among adolescents? *Clin Pediatr* 31, 723-726.
- Ristelli J, Niemi S, Trivedi P, Mäentausta O, Mowat AP, Risteli L. (1988) Rapid equilibrium radioimmunoassay for the amino-terminal propeptide of human type III procollagen. *Clin Chem* 34, 715-718.
- Risteli J, Risteli L. (1999) Products of bone collagen metabolism. Dynamics of bone and cartilage metabolism. In: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP (eds) Academic Press, San Diego: 275-287.
- Risteli L, Risteli J. (2002) Extracellular matrix metabolites in body fluids. Connective tissue and its heritable disorders, molecular, genetic and medical aspects. In: Royce PM, Steinman B (ed) John Wiley & Sons, New Yor: 1141-1160.
- Rivier L, Saugy M. (1999) Peptide hormones abuse in sport: State of the art in the detection of growth hormone and erythropoietin. *J Toxicol. Toxin Reviews* 18, 145-176.

- Roberts D, Smith DJ. (1996) Erythropoietin does not demonstrate circadian rhythm in healthy men. *J Appl Physiol* 80, 847-851.
- Robinson N, Saugy M, Mangin P. (2003) Effects of exercise on the secondary blood markers commonly used to suspect erythropoietin doping. *Clin Lab* 49, 57-62.
- Rocker L, Hinz K, Holland K, Gunga HC, Vogelgesang J, Kiesewetter H. (2002) Influence of endurance exercise (triathlon) on circulating transferrin receptors and other indicators of iron status in female athletes. *Clin Lab* 48, 307-312.
- Rodríguez FA, Casas H, Casas M, Pagés T, Rama R, Ricart A, Ventura JL, Ibañez J, Viscor G. (1999) Intermittent hypobaric hypoxia stimulates erythropoiesis and improves aerobic capacity. *Med Sci Sports Exerc* 31, 264-268.
- Rodríguez FA, Ventura JL, Casas M, Casas H, Pagés T, Rama R, Ricart A, Palacios L, Viscor G. (2000) Erythropoietin acute reaction and haematological adaptations to short, intermittent hypobaric hypoxia. *Eur J Appl Physiol* 82, 170-177.
- Rodríguez FA. (2002) Intermittent hypoxia: an alternative to acclimatization to high altitude and enhancement of athletic performance? *Am J Med Sports* 4, 385-391.
- Rodríguez FA, Murio J, Ventura JL. (2003) Effects of intermittent hypobaric hypoxia and altitude training on physiological and performance parameters in swimmers. *Med Sci Sports Exer* 35, S115.
- Roelen CA, de Vries WR, Koppeschaar HP, Vervoorn C, Thijssen JH, Blankenstein MA. (1997) Plasma insulin-like growth factor-I and high affinity growth hormone-binding protein levels increase after two weeks of strenuous physical training. *Int J Sports Med* 18, 238-241.
- Rohde H, Vargas L, Hahn E, Kalbfleisch H, Bruguera M, Timpl R. (1979) Radioimmunoassay for type III procollagen peptide and its application to human liver disease. *Eur J Clin Invest* 9, 451-459.
- Rohde H, Langer I, Krieg T, Timpl R. (1983) Serum and urine analysis of the aminoterminal procollagen peptide type III by radioimmunoassay with antibody Fab fragments. *Coll Relat Res* 3, 371-379.
- Root AW, Root MJ. (2002) Clinical pharmacology of human growth hormone and its secretagogues. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2, 27-52.

- Rosendal L, Langberg H, Flyvbjerg A, Frystyk J, Orskov H, Kjaer M. (2002) Physical capacity influences the response of insulin-like growth factor and its binding proteins to training. *J Appl Physiol* 93, 1669-1675.
- Rotwein P, Bichell DP, Kikuchi K. (1993) Multifactorial regulation of IGF-I gene expression. *Mol Reprod Dev* 35, 358-363.
- Rudd PM, Dwek RA. (1997) Glycosilation: heterogeneity and the 3D structure of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 32, 1-100.
- Rusko HK, Penttinen JTT, Koistinen PO, Vähäsöyrinki PI, Leppäluoto JO. (1995) A new solution to simulate altitude and stimulate erythropoiesis at sea level in athletes. In: Viitasalo J, Kujala U, eds. *The Way to Win*. Helsinki: The Finnish Society for Research in Sport and Physical Education, 287-289.
- Russell G, Gore CJ, Ashenden MJ, Parisotto R, Hahn AG. (2002) Effects of prolonged low doses of recombinant human erythropoietin during submaximal and maximal exercise. *Eur J Appl Physiol* 86, 442-449.

S

- Saez-Valero J, Mok SS, Small DH. (2000) An unusually glycosilated form of acetylcholinesterase is a CSF biomarker for Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 176, 49-52.
- Saggese G, Baroncelli I, Bertelloni S, Cinquanta L, Dinero G. (1994) Twenty-four-hour osteocalcin, carboxyterminal propeptide of type I procollagen, and aminoterminal propeptide of type III procollagen rhythms in normal and growth-retarded children. *Pediatr Res* 35, 409-15.
- Saggese G, Baroncelli I, Federico G, Bertelloni S. (1995) Effects of growth hormone on phosphocalcium homeostasis and bone metabolism. *Horm Res* 44, 55-63.
- Salomon F, Cuneo R, Hesp R, Sonksen PH. (1989) The effects of treatment with recombinant human growth hormone on body composition and metabolism in adults with growth hormone deficiency. *New England J Med* 321, 1797-1803.
- Sartorio A, Agosti F, Marazzi N, Maffiuletti NA, Cella SG, Rigamonti AE, Guidetti L, Di Luigi L, Muller EE. (2004a) Combined evaluation of resting IGF-I, N-terminal propeptide of tpe III procollagen (PIIINP) and C-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen (ICTP) levels

- might be useful for detecting inappropriate GH administration in athletes: a preliminary report. *Clin Endocrinol* 61, 487-493.
- Sartorio A, Marazzi N, Agosti F, Faglia G, Corradini C, De Palo E, Cella SG, Rigamonti AE, Muller EE. (2004b) Elite volunteer athletes of different sport disciplines may have elevated baseline GH levels divorced from unaltered levels of both IGF-I and GH-dependent bone and collagen markers: A study on-the-field. *J Endocrinol Invest* 27, 410-415.
- Satta J, Juvonen T, Haukipuro K, Juvonen M, Kairaluoma MI. (1995) Increased turnover of collagen in abdominal aortic aneurysms, demonstrated by measuring the concentration of the aminoterminal propeptide of type III procollagen in peripheral and aortal blood samples. *J Vasc Surg* 22, 155-160.
- Saugy M, Cardis C, Rivier L, Brisson G, Ayotte C, Hemmersback P, Haug E, Segura J. (1995) Urinary human growth hormone (U-HGH): II. Measurements in competition tests: more the expression of the renal function than the endocrinological status. In: Donike M, Geyer H, Gotzmann A, Mareck-Engelke U, eds. *Recent Advances in Doping Analysis (2)*. Cologne, Germany: Sport & Buch Strauß, págs. 223-233.
- Saugy M, Cardis C, Schweizer C, Veuthey JL, Rivier L. (1996) Detection of human growth hormone doping in urine: out of competition test are necessary. *J Chromatogr B Biomed Appl* 687, 201-211.
- Savourey G, Launay J-C, Besnard Y, Guinet A, Bourrilhon C, Cabane D, Martin S, Caravel J-P, Pequignot J-M, Cottet-Emard J-M. (2004) Control of erythropoiesis after high altitude acclimatization. *Eur J Appl Physiol* 93, 47-56.
- Sawada K, Krantz SB, Dai C-H, Koury ST, Horn ST, Glick AD, Civin CI. (1990) Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptor. *J Cell Physiol* 142, 219-230.
- Sawyer ST, Koury MJ. (1987) Erythropoietin requirement during terminal erythroid differentiation: the role of surface receptors for erythropoietin (Abs). *J Cell Biol* 105, 1077.
- Schmidt W, Eckardt KU, Hilgendorf A, Strauch S, Bauer C. (1991) Effect of maximal and submaximal exercise under normoxic and hypoxic conditions on serum erythropoietin level. *Int J Sports Med* 12, 457-461.
- Schmidt W, Biermann B, Winchenbach P, Lison S, Boning D. (2000) How valid is the determination of hematocrit values to detect blood manipulations? *Int J Sports Med* 21, 133-138.

- Schmidt W, Heinecke K, Rojas J, Manuel Gomez J, Serrato M, Mora M, Wolfarth B, Schmid A, Keul J. (2002) Blood volume and haemoglobin mass in endurance athletes from moderate altitude. *Med Sci Sports Med* 34, 1934-1940.
- Schumacher YO, Grathwohl D, Barturen M, Wollenweber M, Heinrich L, Schmid A, Huber G, Keul J. (2000) Haemoglobin, haematocrit and red blood cell indices in elite cyclists. Are the control values for blood testing valid? *Int J Sports Med* 21, 380-385.
- Schumacher YO, Jankovits R, Bultermann D, Schmid A, Berg A. (2002a) Hematological indices in elite cyclists. *Scand J Med Sci Sports* 12, 301-308.
- Schumacher YO, Schmid A, Grathwohl D, Bultermann D, Berg A. (2002b) Hematological indices and iron status in athletes of various sports and performances. *Med Sci Sports Exerc* 34, 869-875.
- Schumacher YO, Schmid A, D Konig, Berg A. (2002c) Effects of exercise on soluble transferrin receptor and other variables of the iron status. *Br J Sports Med* 36, 195-200.
- Schumacher YO, Temme J, Bultermann D, Schmid A, Berg A. (2003) The influence of exercise on serum markers of altered erythropoiesis and the indirect detection models of recombinant human erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica* 88, 712-714.
- Schwandt HJ, Heyduck B, Gunga HC, Rocker L. (1991) Influence of prolonged physical exercise on the erythropoietin concentration in blood. *Eur J Appl Physiol* 63, 463-466.
- Schwarz AJ, Brasel JA, Hintz RL, Mohan S, Cooper DM. (1996) Acute effect of brief low- and high-intensity exercise on circulating insulin-like growth factor (IGF) I, II, and IGF-binding protein-3 and its proteolysis in young healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 3492-3497.
- Segura J. (1996) Doping control in sports medicine. *Ther Drug Monit* 18, 471-476.
- Segura J, Ventura R, Gonzalez M, Jimenez C. (2000) Doping substances in human and animal sport. In: Bogusz MJ, ed. *Handbook of Analytical Separations. Vol. 2: Forensic Science*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B.V., págs. 531-566.
- Semenza GL. (1994) Regulation of erythropoietin production. New insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis. *Hematol Oncol Clin North Am* 8, 863-884.
- Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. (1994) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 269, 23757-23763.

- Semenza GL, Agani F, Booth G, Forsythe J, Iyer N, Jiang BH, Leung S, Roe R, Wiener C, Yu A. (1997) Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor. *Kidney Int* 51, 553-555.
- Sharpe K, Hopkins W, Emslie KR, Howe C, Trout GJ, Kazlauskas R, Ashenden MJ, Gore J, Parisotto R, Hahn AG. (2002) Development of reference ranges in elite athletes for markers of altered erythropoiesis. *Haematologica* 87, 1248-1257.
- Sharpe K, Ashenden MJ, Schumacher YO. (2006) A third generation approach to detect erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica* 91, 356-363.
- Shaskey DJ, Green GA. (2000) Sports haematology. *Sports Med* 29, 27-38.
- Sherwood JB, Carmichael LD, Goldwasser E. (1988) The heterogeneity of circulating human serum erythropoietin. *Endocrinology* 122, 1472-1477.
- Shih YJ, Baynes RD, Hudson BG, Flowers CH, Skikne BS, Cook JD. (1990) Serum transferrin receptor is a truncated form of tissue receptor. *J Biol Chem* 265, 1977-1981.
- Shih YJ, Baynes RD, Hudson BG, Cook JD. (1993) Characterization and quantification of the circulating forms of serum transferrin receptor using domain-specific antibodies. *Blood* 81, 234-238.
- Skibeli V, Nissen-Lie G, Torjesen P. (2001) Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood* 98, 3626-3634.
- Skikne BS, Flowers C, Cook JD. (1990) Serum transferrin receptor: a quantitative measure of tissue iron deficiency. *Blood* 75, 1870-1876.
- Skjaerbaek C, Frystyk J, Kaal A, Laursen T, Moller J, Weeke J, Jorgensen JOL, Sandahl-Christiansen J, Orskov H. (2000) Circadian variation in serum free and total insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II in untreated and treated acromegaly and growth hormone deficiency. *Clin Endocrinol* 52, 25-33.
- Smith RG. (2005) Development of growth hormone secretagogues. *Endocr Rev* 26, 346-360.
- Snow CM, Rosen CJ, Robinson TL. (2000) Serum IGF-I is higher in gymnasts than runners and predicts bone and lean mass. *Med Sci Sports Exerc* 32, 1902-1907.
- Sothmann MS, Hart BA, Horn TS. (1991) Plasma catecholamine response to acute psychological stress in humans: relation to aerobic fitness and exercise training. *Med Sci Sports Exerc* 23, 860-867.

- Spalding BJ. (1991) Black-market biotechnology: athletes abuse EPO and HGH. *Biotechnology (NY)* 9, 1050-1053.
- Stokes K. (2003) Growth hormone responses to sub-maximal and sprint exercise. *GH IGF-I Res* 13, 225-238.
- Stolar MW, Baumann G. (1986) Secretory patterns of growth hormone during basal periods in man. *Metabolism* 35, 883-888.
- Storring PL, Gaines Das RE. (1992) The international standard for recombinant DNA-derived erythropoietin: collaborative study of four recombinant DNA-derived erythropoietins and two highly purified human urinary erythropoietins. *J Endocrinol* 134, 459-484.
- Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Wu Z, Morrison KM. (2001) Normal values of insulin-like growth factor I and their clinical utility in adults. *Horm Res* 55, 100-105.
- Stray-Gundersen J, Chapman RF, Levine BD. (2001) "Living high and training low" altitude training improves sea level in male and female elite runners. *J Appl Physiol* 91, 1113-1120.
- Stray-Gundersen J, Videman T, Penttila I, Lereim I. (2003) Abnormal hematologic profiles in elite cross-country skiers: blood doping or? *Clin J Sport Med* 13, 132-137.
- Suikkari A-M, Sane T, Seppala M, Yki-Jarvinen H, Karonen S-L, Koivisto VA. (1989) Prolonged exercise increased serum insulin-like growth factor-binding protein concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 68, 141-144.
- Suominen P, Punnonen K, Rajamaki A, Irjala K. (1997) Evaluation of new immunoenzymometric assay for measuring soluble transferrin receptor to detect iron deficiency in anemic patients. *Clin Chem* 43, 1641-1646.
- Suominen P, Punnonen K, Rajamaki A, Irjala K. (1997) Evaluation of new immunoenzymometric assay for measuring soluble transferrin receptor to detect iron deficiency in anemic patients. *Clin Chem* 43, 1614-1616.
- Suominen P, Punnonen K, Rajamaki A, Majuri R, Hanninen V, Irjala K. (1999) Automated immunoturbidimetric method for measuring serum transferrin receptor. *Clin Chem* 45, 1302-1305.
- Suominen P, Virtanen A, Lehtonen-Veromaa M, Heinonen OJ, Salmi TT, Alanen M, Mottonen T, Rajamaki A, Irjala K. (2001) Regression-based reference limits for serum transferrin receptor in children 6 months to 16 years of age. *Clin Chem* 47, 935-937.

T

- Taaffe DR, Jin IH, Vu TH, Hoffman AR, Marcus R. (1996) Lack of effect of recombinant human growth hormone (GH) on muscle morphology and GH-insulin-like growth factor expression in resistance-trained elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 421-425.
- Takala TES, Vuori J, Anttinen H, Väänänen K, Myllylä R. (1986) Prolonged exercise causes an increase in the activity of galactosylhydroxylysyl glucosyltransferase and in concentration of type III procollagen aminopropeptide in human serum. *Pflugers Arch* 407, 500-503.
- Takala TES, Vuori JJ, Rahkila PJ, Hakala EO, Karpakka JA, Alen MJ, Orava YS, Väänänen HK. (1989) Carbonic anhydrase III and collagen markers in serum following cross-country skiing. *Med Sci Sports Exerc* 21, 593-597.
- Thierry van Dessel HJ, Chandrasekher Y, Yap OW, Lee PD, Hintz RL, Faessen GH, Braat DD, Fauser BC, Giudice LC. (1996) Serum and follicular fluid levels of insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, and IGF-binding protein-1 and -3 during normal menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 1224-1231.
- Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE. (1994) Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocrinol Rev* 15, 80-101.
- Thissen JP, Ketelslegers JM, Maiter D. (1996) Use of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 in the diagnosis of acromegaly and growth hormone deficiency in adults. *Growth Regul* 6, 222-229.
- Thomas C, Thomas L. (2002) Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem* 48, 1066-1076.
- Tonshoff B, Blum WF, Vickers M, Kurilenko S, Mehls O, Ritz E. Quantification of urinary insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding protein 3 in healthy volunteers before and after stimulation with recombinant human growth hormone. *Eur J Endocrinol* 1995; 132: 443-437.
- Toogood AA, O'Neill PA, Shalet SM. (1996) Beyond the somatopause: growth hormone deficiency in adults over the age of 60 years. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 460-465.
- Trivedi P, Hindmarsh P, Risteli J, Risteli L, Mowat AP, Brook CG. (1989) Growth velocity, growth hormone therapy, and serum concentrations of the amino-terminal propeptide of type III procollagen. *J Pediatr* 114, 225-230.

Trivedi P, Risteli J, Risteli L, Hindmarsh PC, Brook CG, Mowat AP. (1991) Serum concentrations of type I and III procollagen propeptides as biochemical markers of growth velocity in healthy infants and children and in children with growth disorders. *Pediatr Res* 30, 276-280.

Trout GJ, Kazlauskas R. (2004) Sports drug testing – an analyst's perspective. *Chem Soc Rev* 33, 1-13.

U

Uchida H, Naito N, Asada N, Wada M, Ikeda M, Kobayashi H, Asanagi M, Mori K, Fujita Y, Konda K, Kusuhara N, Kamioka T, Nakashima K, Honjo M. (1997) Secretion of authentic 20-kDa human growth hormone (20K hGH) in *Escherichia coli* and properties of the purified product. *J Biotechnol* 55, 101-112.

Uemasu J, Fujihara M, Kawasaki H. (1996) Effects of low dose of recombinant human growth hormone on renal excretion of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in humans: an inverse relation between serum and urinary IGF-I level. *Clin Nephrol* 46: 1-5.

Ulrich D, Noah E-M, Burchardt ER, Atkins D, Pallua N. (2002) Serum concentration of amino-terminal propeptide of type III procollagen (PIIINP) as a prognostic marker for skin fibrosis after scar correction in burned patients. *Burns* 28, 766-771.

Uusimaa P, Risteli J, Niemela M, Lume J, Ikaheimo M, Jounela A, Peuhkurinen K. (1997) Collagen scar formation after acute myocardial infarction: relationships to infarct size, left ventricular function, and coronary artery patency. *Circulation* 21, 2565-72.

V

Van Cauter E, Copinschi G. (2000) Interrelationships between growth hormone and sleep. *GH IGF-I Res* 10 (Suppl B), S57-S62.

Vanhaesebrouck P, Kint J, Dhont M, De Praeter C, Leroy J. (1994) Aminoterminal propeptide of type III procollagen in cord blood and amniotic fluid of appropriate-for-gestational-age infants : a predictor of age-related fetal growth rate. *Pediatr Res* 36, 64-70.

Varlet-Marie E, Gaudard A, Audran M, Bressolle F. (2003) Pharmacokinetics/pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin in doping control. *Sports Med* 33, 301-315.

- Verde GG, Santi I, Chiodini P, Cozzi R, Dallabonzana D, Oppizzi G, Liuzzi A. (1986) Serum type III procollagen propeptide levels in acromegalic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 63, 1406-1410.
- Vergouwen PCJ, Collee T, Marx JJM. (1999) Haematocrit in elite athletes. *Int J Sports Med* 20, 538-541.
- Vesper HW, Demers LM, Eastell R, Garnero P, Kleerekoper M, Robins SP, Srivastava AK, Warnick GR, Watts NB, Myers GL. (2002) Assessment and recommendations on factors contributing to preanalytical variability of urinary pyridinoline and deoxypyridinoline. *Clin Chem* 48, 220-235.
- Videman T, Lereim I, Hemmingsson P, Turner MS, Rousseau-Bianchi M-P, Jenouire P, Raas E, Schonhuber H, Rusko H, Stray-Gundersen J. (2000) Changes in haemoglobin values in elite cross-country skiers from 1987 to 1999. *Scand J Med Sci Sports* 10, 98-102.
- Villa JG, Lucia A, Marroyo JA, Avila C, Jimenez F, Garcia-Lopez J, Earnest CP, Cordova A. (2005) Does intermittent hypoxia increase erythropoiesis in professional cyclists during a 3-week race? *Can J Appl Physiol* 30, 61-73.
- Virtanen P, Viitasalo JT, Vuori J, Väänänen K, Takala TES. (1993) Effect of concentric exercise on serum muscle and collagen markers. *J Appl Physiol* 75, 1272-1277.
- Virtanen MA, Viinika LU, Virtanen MKG, Svahn JCE, Anttila RM, Krusius T, Cook JD, Axelsson IEM, Raiha NCR, Siimes MA. (1999) Higher concentrations of serum transferrin receptor in children than in adults. *Am J Clin Nutr* 69, 256-260.
- Vogel G. (2004) A race to the starting line. *Science* 305, 632-635.

W

- Wallace JD, Cuneo RC, Baxter R, Orskov H, Keay N, Pentecost C, Dall R, Rosen T, Jorgensen JO, Cittadini A, Longobardi S, Sacca L, Christiansen JS, Bengtsson B-A, Sonksen PH. (1999) Responses of the growth hormone (GH) and insulin-like growth factor axis to exercise, GH administration, and GH withdrawal in trained adult males: A potential test for GH abuse in sport. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 3591-3601.
- Wallace JD, Cuneo RC, Lundberg PA, Rosen T, Jorgensen JO, Longobardi S, Keay N, Sacca L, Christiansen JS, Bengtsson B-A, Sonksen PH. (2000) Responses of markers of bone and

- collagen turnover to exercise, growth hormone (GH) administration, and GH withdrawal in trained adult males. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 124-133.
- Wallace JD, Cuneo RC, Bidlingmaier M, Lundberg PA, Carlsson L, Boguszewski CL, Hay J, Healy M-L, Napoli R, Dall R, Rosen T, Strasburger CJ. (2001a) The response of molecular isoforms of growth hormone to acute exercise in trained adult males. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 200-206.
- Wallace JD, Cuneo RC, Bidlingmaier M, Lundberg PA, Carlsson L, Boguszewski CL, Hay J, Boroujerdi M, Cittadini A, Dall R, Rosen T, Strasburger CJ. (2001b) Changes in non-22-kilodalton (kDa) isoforms of growth hormone (GH) after administration of 22-kDa recombinant human GH in trained adult males. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1731-1737.
- Walsh KM, Fletcher A, MacSween RN, Morris AJ. (1999) Comparison of assays for N-amino terminal propeptide of type III procollagen in chronic hepatitis C by using receiver operating characteristic analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 11, 827-831.
- Wang HS, Lee JD, Soong YK. (1995) Serum levels of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding protein-1 and -3 in women with regular menstrual cycles. *Fertil Steril* 63, 1204-1209.
- Waters DL, Qualls CR, Dorin R, Veldhuis JD, Baumgartner RN. (2001) Increased pulsatility, process irregularity, and nocturnal trough concentrations of growth hormone in amenorrheic compared to eumenorrheic athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1013-1019.
- Weight LM, Alexander D, Elliot T, Jacobs P. (1992) Erythropoietic adaptations to endurance training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 64, 444-448.
- Wians F, Urban J, Kroft S, Keffer J. (2001) Soluble transferrin receptor (sTfR) concentration quantified using two sTfR kits: analytical and clinical performance characteristics. *Clin Chim Acta* 303, 75-81.
- Wickrema A, Krantz SB, Winkelmann JC, Bondurant MC. (1992) Differentiation and erythropoietin receptor gene expression in human erythroid progenitor cells. *Blood* 80, 1940-1949.
- Wide L, Bengtsson C. (1990) Molecular charge heterogeneity of human serum erythropoietin. *Br J Haematol* 76, 121-127.
- Wide L, Bengtsson C, Berglund B, Ekblom B. (1995) Detection of blood and urine of recombinant erythropoietin administered to healthy men. *Med Sci Sports Exerc* 27, 1569-1576.

Wilber RL. (2002) Detection of DNA-recombinant human epoetin-alfa as a pharmacological ergogenic aid.

Wilber RL. (2004) Altitude training and athletic performance. Champaign, Illinois: Human Kinetics.

Wolthers DO, Heuck C, Heickendorff L. (2001) Diurnal variations in serum and urine markers of type I and type III collagen turnover in children. *Clin Chem* 47, 1721-1722.

World Antidoping Agency Technical Document. Harmonization of the method for the identification of epoetin alfa and beta (EPO) and darbepoetin alfa (NESP) by IEF-double blotting and chemiluminescent detection. - TD2004EPO (version 1.0)

Wu Z, Bidlingmaier M, Dall R, Strasburger CJ. (1999) Detection of doping with human growth hormone. *Lancet* 353, 895.

Y

Yarasheski KE, Campbell JA, Smith K, Rennie MJ, Holloszy JO, Bier DM. (1992) Effect of growth hormone and resistance exercise on muscle growth in young men. *Am J Physiol* 262, E261-E267.

Yarasheski KE, Zachweija JJ, Angelopoulos TJ, Bier DM. (1993) Short-term growth hormone treatment does not increase muscle protein synthesis in experienced weight lifters. *J Appl Physiol* 74, 3073-3076.

Yeung GS, Kjarsgaard JC, Zlotkin SH. (1998) Disparity of serum transferrin receptor measurements among different assay methods. *Eur J Clin Nut* 52, 801-804.

Z

Zanjani ED, Peterson EN, Gordon AS, Wasserman LR. (1974) Erythropoietin production in the fetus: role of the kidney and maternal naemia. *J Lab Clin Med* 83, 281-287.

Zachariae H, Heickendorff L, Sogaard H. (2001) The value of amino-terminal propeptide of type III procollagen in routine screening for methotrexate-induced liver fibrosis: a 10 year follow-up. *Br J Dermatol* 144, 100-103.

Zanker CL, Swaine IL. (2000) Responses of bone turnover markers to repeated endurance running in humans under conditions of energy balance or energy restriction. *Eur J Appl Physiol* 83, 434-440.

Zhou GH, Luo GA, Zhou Y, Zhou KY, Zhang XD, Huang LDI. (1998) Application of capillary electrophoresis, liquid chromatography, electrospray-mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry to the characterization of recombinant human erythropoietin. *Electrophoresis* 19, 2348-2355.

Zofkova I. (2003) Pathophysiological and clinical importance of insulin-like growth factor-I with respect to bone metabolism. *Physiol Res* 52, 657-679.

8. Anexo

C S B Consorci Sanitari de Barcelona



IMAS

Institut Municipal
d'Investigació Mèdica. IMIM

**"ESTUDIO EN POBLACIONES SELECCIONADAS DE LA FIABILIDAD DE
NUEVOS PROTOCOLOS DE DETECCIÓN DE CONSUMO DE HORMONAS
RECOMBINANTES (hGH Y EPO)".**

CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

**Código
Identificación**

C	A	R			
---	---	---	--	--	--

**PROMOTOR: Unitat de Recerca en Farmacologia
 Institut Municipal d'Investigació Mèdica. IMIM
 Doctor Aiguader 80. 08003 Barcelona, España**

**Código
Identificación**

C	A	R			
---	---	---	--	--	--

**Nº historia
clínica**

--	--	--	--	--	--	--	--

APELLIDOS

NOMBRE

Código Identificación C A R

Nº historia clínica

Fecha de nacimiento - -

Edad (años)

Sexo ♂ ♀

Peso Kg

Talla cm descalzo

GRUPO DE INCLUSIÓN

Especialidad deportiva _____ Horas de entrenamiento semanal _____

Patología Descripción

ANTECEDENTES PERSONALES

ALÉRGICOS

Alimentarios _____
 Medicamentosos _____
 Ambientales _____
 Desconocidos _____

PATOLÓGICOS

Diabetes _____
 Anomalías crecimiento _____
 Hemoglobinopatías _____
 Insuficiencia renal _____
 Lesiones óseas _____
 Otras (explicar) _____

Serologías (hepatitis, HIV) _____

QUIRÚRGICOS

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- 1. Exploración física previa al inicio del estudio normal SI NO
- 2. Aceptación de los procedimientos del ensayo y firma del consentimiento informado SI NO

(Para ser admitido en el estudio, todos los criterios de inclusión deben ser **SI**)

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- 1. No cumplir los criterios de inclusión..... SI NO
- 2. Haber donado sangre o participado en ensayos clínicos con fármacos en las 4 semanas anteriores al inicio del estudio..... SI NO
- 3. Sujetos con serología positiva a Hepatitis B, y/o C y/o VIH..... SI NO

(Para ser admitido en el estudio, todos los criterios de exclusión deben ser **NO**)

Participa en el estudio SI NO → Especificar _____

NOMBRE y APELLIDOS
(médico que realiza la historia clínica) _____

FIRMA _____

Fecha: ____ / _____ / _____

Código Identificación C A R

Nº historia clínica

APELLIDOS _____ **NOMBRE** _____

GRUPO DE INCLUSIÓN

Especialidad deportiva _____ Horas de entrenamiento semanal _____

Patología Descripción

MUESTRAS

Nº	Fecha	Matriz #	Ocasión *	Comentarios
01		Suero <input type="checkbox"/> Orina <input type="checkbox"/>		
02		Suero <input type="checkbox"/> Orina <input type="checkbox"/>		
03		Suero <input type="checkbox"/> Orina <input type="checkbox"/>		
04		Suero <input type="checkbox"/> Orina <input type="checkbox"/>		
05		Suero <input type="checkbox"/> Orina <input type="checkbox"/>		
06		Suero <input type="checkbox"/> Orina <input type="checkbox"/>		
07		Suero <input type="checkbox"/> Orina <input type="checkbox"/>		
08		Suero <input type="checkbox"/> Orina <input type="checkbox"/>		
09		Suero <input type="checkbox"/> Orina <input type="checkbox"/>		
10		Suero <input type="checkbox"/> Orina <input type="checkbox"/>		

Muestra: indicar la que proceda

* Ocasión: **B**: Basal, **PRC**: Pre-competición (nº días/horas antes) , **PSC**: Post-competición (nº días/horas después)

PARA CADA OCASIÓN, CUMPLIMENTAR EL CUESTIONARIO DE ANTECEDENTES FISIOLÓGICOS Y TÓXICOS DE LA PÁGINA SIGUIENTE

ANTECEDENTES FISIOLÓGICOS Y TÓXICOS DE CADA OCASIÓN:

OCASIÓN A*

Fecha

* Ocasión: **B:** Basal, **PRC:** Pre-competición (nº días/horas antes) , **PSC:** Post-competición (nº días/horas después)

FISIOLÓGICOS (últimas 2 semanas)

Hábitos alimentarios: Carga carbohidratos: _____ Carga proteica: _____
 Restricción calórica (Kg perdidos antes de la competición) _____
 Ayudas ergogénicas: SI NO ¿Cuáles? _____

Hábito intestinal: _____ Hábito urinario: _____
 Ciclo del sueño _____
 Ciclo menstrual _____ menarquia _____ FUR _____

Amenorrea (sin ciclo) Oligomenorrea (más de 6 meses sin ciclo) Eumenorrea (ciclos regulares)

TÓXICOS

Tabaco (tipo, cig/día) _____
 Alcohol (gr/día o unidades/día) _____
 Cafeína (café, cola nº/día) _____
 Medicamentos (tomados en la última semana; indicar tratamientos crónicos) _____
 Contraceptivos (especialidad, dosis) _____

OCASIÓN B*

Fecha

* Ocasión: **B:** Basal, **PRC:** Pre-competición (nº días/horas antes) , **PSC:** Post-competición (nº días/horas después)

FISIOLÓGICOS (últimas 2 semanas)

Hábitos alimentarios: Carga carbohidratos: _____ Carga proteica: _____
 Restricción calórica (Kg perdidos antes de la competición) _____
 Ayudas ergogénicas: SI NO ¿Cuáles? _____

Hábito intestinal: _____ Hábito urinario: _____
 Ciclo del sueño _____
 Ciclo menstrual _____ menarquia _____ FUR _____

Amenorrea (sin ciclo) Oligomenorrea (más de 6 meses sin ciclo) Eumenorrea (ciclos regulares)

TÓXICOS

Tabaco (tipo, cig/día) _____
 Alcohol (gr/día o unidades/día) _____
 Cafeína (café, cola nº/día) _____
 Medicamentos (tomados en la última semana; indicar tratamientos crónicos) _____
 Contraceptivos (especialidad, dosis) _____

OCASIÓN C*

Fecha _____

* Ocasión: **B**: Basal, **PRC**: Pre-competición (nº días/horas antes), **PSC**: Post-competición (nº días/horas después)**FISIOLÓGICOS** (últimas 2 semanas)

Hábitos alimentarios: Carga carbohidratos: _____ Carga proteica: _____
 Restricción calórica (Kg perdidos antes de la competición) _____
 Ayudas ergogénicas: SI NO ¿Cuáles? _____

Hábito intestinal: _____ Hábito urinario: _____

Ciclo del sueño _____

Ciclo menstrual _____ menarquia _____ FUR _____

Amenorrea (sin ciclo) Oligomenorrea (más de 6 meses sin ciclo) Eumenorrea (ciclos regulares) **TÓXICOS**

Tabaco (tipo, cig/día) _____

Alcohol (gr/día o unidades/día) _____

Cafeína (café, cola nº/día) _____

Medicamentos (tomados en la última semana; indicar tratamientos crónicos) _____

Contraceptivos (especialidad, dosis) _____

OCASIÓN D*

Fecha _____

* Ocasión: **B**: Basal, **PRC**: Pre-competición (nº días/horas antes), **PSC**: Post-competición (nº días/horas después)**FISIOLÓGICOS** (últimas 2 semanas)

Hábitos alimentarios: Carga carbohidratos: _____ Carga proteica: _____
 Restricción calórica (Kg perdidos antes de la competición) _____
 Ayudas ergogénicas: SI NO ¿Cuáles? _____

Hábito intestinal: _____ Hábito urinario: _____

Ciclo del sueño _____

Ciclo menstrual _____ menarquia _____ FUR _____

Amenorrea (sin ciclo) Oligomenorrea (más de 6 meses sin ciclo) Eumenorrea (ciclos regulares) **TÓXICOS**

Tabaco (tipo, cig/día) _____

Alcohol (gr/día o unidades/día) _____

Cafeína (café, cola nº/día) _____

Medicamentos (tomados en la última semana; indicar tratamientos crónicos) _____

Contraceptivos (especialidad, dosis) _____

OCASIÓN E*

Fecha

* Ocasión: **B**: Basal, **PRC**: Pre-competición (nº días/horas antes) , **PSC**: Post-competición (nº días/horas después)

FISIOLÓGICOS (últimas 2 semanas)

Hábitos alimentarios: Carga carbohidratos: _____ Carga proteica: _____
Restricción calórica (Kg perdidos antes de la competición) _____
Ayudas ergogénicas: SI NO ¿Cuáles? _____

Hábito intestinal: _____ Hábito urinario: _____

Ciclo del sueño _____

Ciclo menstrual _____ menarquia _____ FUR _____

Amenorrea (sin ciclo) Oligomenorrea (más de 6 meses sin ciclo) Eumenorrea (ciclos regulares)

TÓXICOS

Tabaco (tipo, cig/día) _____

Alcohol (gr/día o unidades/día) _____

Cafeína (café, cola nº/día) _____

Medicamentos (tomados en la última semana; indicar tratamientos crónicos) _____

Contraceptivos (especialidad, dosis) _____