

La investigación en la Universidad de Extremadura en el dopaje

DR. JUAN I. MAYNAR MARIÑO
 LCDA. MARÍA MAYNAR MUÑOZ
 Universidad de Extremadura

RESUMEN

En la actualidad, el campo de los análisis químicos en el ámbito deportivo ha sufrido una gran evolución. Al igual que esto las técnicas de dopaje y los métodos empleados para estas prácticas han sufrido la misma evolución.

Uno de los retos, es poder discernir entre la posible procedencia endógena o exógena de determinadas sustancias (metabolitos de nandrolona) que aparecen en la lista de los productos prohibidos en el deporte. Para ello existen, al menos, dos tipos de estudios: estimaciones directas (Cromatografía de gases-relación isotópica-MS (GC-IRMS), análisis del pelo); y estimaciones indirectas (Valoración hormonal en plasma, valoración del perfil esteroideo, diferencias entre las fracciones sulfoconjugadas y glucoconjugadas, pruebas de estimulación con hCG para la valoración de una posible alteración de los sistemas aromatasas)

En el caso de la nandrolona y sus metabolitos presentamos los datos obtenidos al aplicar como criterio científico las variaciones de la relación Testosterona/ β estradiol ($T/\beta E$).

ABSTRACT

Nowadays the world of sports analyses has suffered a great evolution. Just like this, doping technicals and methods used for these practices have suffered the same evolution.

One of the challenges, it is to be able to discern among the possible endogenous or exogenous procedence of given substances (metabolites of nandrolone) that appear in the list of products forbidden in sports. Two types of studies exist: direct evaluations ((Gas-Isotopyc relation-MS Chromatography (GC-IRMS), hair analysis)); and indirect evaluations (Hormonal valoration in serum, evaluation of the esteroideal profile difference among sulfoconjugated and glucoconjugated fractions, test of stimulation with hCG for the evaluation of a possible alteration of aromatase systems).

In the case of the nandrolone and its metabolites we present the obtained data when we applied the variations of the relation Testosterone/ β -Estradiol ($T/\beta E$) as scientific criteria.

LÍNEAS PRIORITARIAS DE INVESTIGACIÓN:

- Modificaciones e influencias sobre el Perfil Hormonal Esteroideo y su aplicación en el control del dopaje
- Detección y confirmación de las hormonas andrógenas endógenas utilizadas como sustancias dopantes
- Detección de hormonas peptídicas y glicoproteínicas y análogos utilizadas como sustancias dopantes
- Aplicación de las técnicas analíticas de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), GC/MS/MS y electroforesis capilar la control analítico del dopaje
- Síntesis de metabolitos fisiológicos dopantes esteroideos

ESTEROIDES ANABOLIZANTES

Efectos buscados con su uso:

- Mayor atención y lucidez durante el esfuerzo.
- Más rapidez en la recuperación física y psíquica durante el esfuerzo.
- Aumento de la intensidad y duración del esfuerzo diario.
- Sensible incremento de la forma física.

Efectos nocivos derivados de su uso:

- Virilización en mujeres
- Incremento de la libido
- Priapismo en hombres
- Azoospermia
- Neoplasia de próstata
- Hepatitis e ictericia
- Adenocarcinoma hepático

CONTROL DEL DOPAJE

La misión de los laboratorios especializados es compleja. Se busca en la orina la posible presencia de uno de los 300 principios activos prohibidos y/o sus metabolitos. Esto requiere una metodología muy precisa. Normalmente en 24 h. hay que dar un resultado.

Sólo un reducido número de laboratorios en todo el mundo están reconocidos por la AMA.

PROCESOS DE UN CONTROL DE DOPAJE

- Selección de deportistas
- Procedimiento de recogida de muestras
- Análisis de muestras "A"
- Consideraciones legales y análisis de muestras "B"
- Sanciones

PROCEDIMIENTOS EN EL CONTROL DEL DOPAJE

CARACTERÍSTICAS:

- Procedimientos de análisis complejos (CG/EM)
- Determinación de un alto número de analitos (> 200 analitos)
- Principalmente análisis cualitativo
- Algunos análisis en concentraciones umbral (SI/NO)
- Poco tiempo para los análisis

CONDICIONES PARA UN CONTROL DE DOPAJE GARANTIZABLE

- Ausencia de error o fraude en la recogida de muestras
- Rigor, calidad y fiabilidad en la analítica
- Justicia y equidad en la emisión de sanciones

PROBLEMÁTICAS

El deporte se encuentra en una constante evolución, de modo que todos sus estamentos no han de anclarse en el pasado y avanzar conforme lo hace el resto de áreas de conocimiento e investigación. El mundo científico va evolucionando constantemente, de modo que muy frecuentemente vierte información que viene a reemplazar o a complementar otra ya existente. Esto es debido principalmente a las mejoras en la técnica y a avances en las investigaciones. Con todo esto parece algo lógico que el mundo del deporte aproveche estos avances y los incorpore en la medida de lo posible a su disciplina para así poder ofrecer una mejor cobertura y fiabilidad en todos sus actos.

El caso de las agencias antidopaje no es algo a parte, ya que éstas más que nadie han de evolucionar conforme a las nuevas evidencias (contrastadas científicamente) para así poder ser más fiables en sus decisiones.

Desde que en 1950 se sintetizase la nandrolona su uso ha estado a disposición del ser humano. Tras este hecho y al ver las ventajas y problemas, (a partir de los años 70 se introducen los esteroides anabolizantes en las listas, listas destinadas, más que a impedir la mejora deportiva de forma exógena, a salvaguardar la salud del deportista), que esto producía, se ha ido regulando su uso en función a las investigaciones científicas que hasta ese momento estaban disponibles. Pero en este capítulo no vamos a remontarnos tanto, sino que, vamos a ver esta evolución en los últimos años.

La Agencia Mundial Antidopaje (AMA) creada en 1999, publica cada año un listado de sustancias cuyo uso está prohibido o restringido, además indica las cantidades máximas de estas sustancias (las que se deben cuantificar) que se pueden encontrar en el organismo del deportista y que a partir de las cuales el resultado de un control sería positivo.

En el caso de la Nandrolona, inicialmente la sola presencia de ésta (sus metabolitos 19-NA y 19-NE) era considerada como positiva (Listas COI y CSD años 90-99). Posteriormente con la evolución y mejora de la técnica se empezaron a detectar más casos positivos y se fijó un valor umbral de forma subjetiva por las autoridades deportivas (no existen estudios científicos que indiquen ese valor, sólo el “dato estadístico” que se hizo en los juegos de Nagano), de modo que todo deportista que superase en orina un valor de 2ng/mL era considerado como positivo.

Tras unos años con estos límites establecidos, se vio que en el caso de las mujeres podían existir concentraciones superiores a las establecidas sin el uso de ninguna sustancia externa (Galán AM, 2002) (Mareck-Engelke U,

2002). Por esto se modificaron las listas indicándose que el límite de concentración de NA para deportistas de género masculino era de 2ng/mL, mientras que para deportistas de género femenino este límite se veía aumentado hasta 5 ng/mL.

Finalmente se volvió a instaurar el límite único para deportistas de ambos sexos fijándolo de nuevo en 2 ng/mL basándose no sabemos en que estudios (Lista AMA 2003). Es curioso precisar como la UCI (Unión Ciclista Internacional) establece para sus deportistas el límite de 5ng/mL, según criterios científicos de esta organización. ¿Son diferentes los deportistas de este deporte del resto?

Es ya en 2004 cuando la AMA, modifica el criterio en lo referente al control de la NA, y se refiere en los términos siguientes: “En el caso de que una sustancia prohibida pueda ser producida por el organismo, será considerada positiva si la cantidad supera ella o sus metabolitos o sustancias precursoras, los **“valores normales”** encontrados en el hombre por no corresponder a una producción endógena **“normal”**. Una muestra será considerada negativa si el deportista prueba que la concentración anterior es atribuida a un estado patológico o fisiológico ¿pero en qué laboratorios realizará su estudio el deportista, los laboratorios acreditados por la AMA, según normativa, sólo pueden realizar análisis sobre una muestra tomada en un control? También cuando el laboratorio por un método fiable pueda demostrar que la sustancia encontrada es de origen exógeno”.

Actualmente, la última resolución de la AMA (Enero 2005) declara los metabolitos de la Nandrolona (19-norandrosterona y 19-noreticolanolona) como esteroides anabolizantes **¡endógenos!** ¿Pero que tipos de estudio se permitirán para probar la procedencia endógena de la Nandrolona? ¿Los realizarán ¿laboratorios acreditados? o laboratorios independientes? Se reconoce la producción endógena de estos metabolitos por el organismo, como así esta demostrado en los deportistas sometidos a situación de estrés como es el deporte de alto nivel. Por fin desaparece el concepto (criterio especulativo) cuantitativo (poca cantidad endógeno, mucha cantidad exógeno) y serán los laboratorios acreditados los responsables de demostrar si la sustancia declarada no negativa es de procedencia exógena, y sólo en ese caso se declarará por los organismos correspondientes la positividad de un dato. Pero ¿están todos los laboratorios acreditados capacitados para aplicar estas técnicas? ¿Por qué no se aportan datos por los mismos?

¿Cuál es la situación en el organismo (CSD) que rige el control antidopaje en España? Hasta 2003 este organismo seguía una dinámica seme-

jante a la de la AMA pero para el 2004 y 2005, se separa de la vía marcada por la agencia mundial y basándose en algún “*Supuesto Científico*”, desconocido por la comunidad científica, mantiene que el criterio de positividad para deportistas de ambos sexos en los metabolitos de la nandrolona es de 2 ng/ml, ignorando así la existencia de recientes estudios en los que se demuestran que estas concentraciones de metabolitos pueden darse en un individuo de forma natural bajo ciertas condiciones.

Todo esto es una ceremonia de confusión para los deportistas que se encuentran en una encrucijada que ellos no provocan y que los laboratorios acreditados del control del dopaje, al menos en España el del CSD, contribuyen con su rechazo a los criterios científicos y siendo más restrictivos que la AMA. ¿Por qué ese rechazo a discutir los resultados obtenidos, que van en beneficio de los deportistas, como personas sometidos a un estrés elevado, y a los que hay que ayudar sin trampas y de acuerdo a los resultados de la Ciencia? ¿Por qué tomar una actitud inquisitorial y no desde la razón científica?

POSIBLES CAUSAS DE LA PRESENCIA DE METABOLITOS DE NANDROLONA EN ORINA

A. Exógena:

- Inyecciones
- Alimentación (cerdo, caballo, cabra).
- Suplementos nutricionales.

B. Endógena:

- Rupturas metabólicas.
- Alto nivel de actividad de enzimas aromatasas.
- Genética.
- Situaciones de estrés.

ESTUDIOS PARA LA DIFERENCIACIÓN DE LA PROCEDENCIA ENDÓGENA O EXÓGENA DE LA NANDROLONA

1. Estimaciones directas:

- Cromatografía de gases-relación isotópica-MS (GC-IRMS): Técnica definitiva para la diferenciación entre hormona endógena y exógena. El problema es que en el caso de la nandrolona hay una limitación técnica en cuanto a la cantidad necesaria para poder estudiar esta sustancia. No factible en el momento actual.
- Análisis del pelo: Técnica usual en toxicología para la determinación de consumo de sustancias, pero que no se emplea por no estar reconocida esta matriz de análisis en el control del dopaje. En una persona que ha usado esta sustancia aparecería en su pelo de forma inequívoca.

2. Estimaciones indirectas:

- Valoración hormonal en plasma: Nos da información sobre la existencia o no de alteraciones endocrinológicas en las hormonas esteroideas del organismo humano. Si existe una alteración en la síntesis fisiológica de esteroides los precursores o los productos finales del ciclo esteroideo estarían alterados y se podrían ver en plasma o en orina.
- Valoración del perfil esteroideo: Propuesta del profesor Donike que dice que cuando se emplea esteroides sintéticos se produce un bloqueo en la producción de testosterona endógena y se provocaba una disminución en la eliminación de los metabolitos de la testosterona (androsterona y etiolanolona) en la orina. Por tanto un sujeto que ha usado esta sustancia tendría su perfil urinario esteroideo alterado (Donike M, 1990).
- Diferencias entre las fracciones sulfoconjugadas y glucoconjugadas. Teoría propuesta por el profesor Le Bizet y que supone que la eliminación de metabolitos endógenos se realiza como metabolitos sulfoconjugados y en el caso de una eliminación de metabolitos exógenos sería como glucoconjugados (Le Bizet B, 2002).
- Pruebas de estimulación con hCG para la valoración de una posible alteración de los sistemas aromatasas (Reznik Y, 2001).

La aplicación de esta sustancia, práctica que es de uso clínico habitual para determinar alteraciones del eje Hipotálamo-Hipofisario-Testicular, produce un incremento en la síntesis de testosterona endógena por las células de Leydig testiculares y al mismo tiempo un incremento en la actividad de las enzimas aromatasas. La hCG, está en las listas como sustancia dopante, pero al igual que el salbutamol, un broncodilatador prohibido en las listas como sustancia dopante, se usa en la clínica para saber si un deportista tiene o no asma y es una prueba fundamental para darle un certificado que le permita el uso de esta sustancia en competición. ¿Por qué sí se puede utilizar esta sustancia prohibida para estudiar una patología en deportistas y no se puede utilizar la hCG para el mismo fin?

Valoración del Perfil Esteroideo Urinario

Cambios en los metabolitos de la nandrolona y testosterona tras una inyección con nandrolona a la semana y a los 4 meses de la inyección, comparación con la de un sujeto considerado como positivo

Parámetro	Inyectados con Nandrolona			Sujeto considerado positivo	
	Inicial	A la Semana	A los cuatro meses	Antes	Después
Nor-Andros	0	54.28±23**	1.50±0.2**	ND	2.2
Nor-etioicol	0	44.34±24**	0.62±0.4**	ND	ND
Androsterona	2420±1025	2300±926	574±232**	3428	6621
Etiocolano	2716±955	2412±876	736±412**	2648	6315

En la tabla se observan los perfiles de sujetos inyectados con nandrolona y un sujeto (antes y después de una competición deportiva) que no se inyectó esta sustancia. Podemos apreciar como los sujetos que se inyectaron nandrolona al cabo de un tiempo presentaban, como indicó el Dr. Donike, un descenso estadísticamente significativo en los metabolitos de la testosterona endógena (androsterona y etioicolanolona), por el contrario en el sujeto considerado como positivo los valores eran del todo normales, incluso elevados.

**Pruebas de Estimulación con hCG
(Gonadotropina Coriónica Humana) para la Valoración de
una Posible Alteración de los Sistemas Aromatasa**

Valores de Nor-androsterona, testosterona, estradiol y relación testosterona/estradiol en orina después de una estimulación de sujetos sin alteraciones (19)

	INICIAL	24 HORAS	48 HORAS
NA	NA	ND	ND
Testos	78,23±23	117,198±65*	143,42±79*
Estradiol	22,04±12	25,87±14*	39,34±19*
Test/Estrad	4,02±1,99	5,13±4,29*	5,61±4,38*

* p<0,05 test de Wilcoxon

Valores de Nor-androsterona, Testosterona, Estradiol y relación testosterona/Estradiol en orina después de una estimulación de sujetos con una alteración de aromatasas con hCG

	INICIAL	24 HORAS	48 HORAS
NA	ND	4,22	5,19
Testos	17,94	173,46	307,96
Estradiol	12,43	9,37	11,99
Test/Estrad	1,44	18,51	25,68

En las tablas, se observa el perfil esteroideo de sujetos normales y sujetos que creemos que presentan una patología de sus sistemas aromatasas. Como podemos apreciar en ambos casos se producía un incremento en los niveles urinarios de testosterona y β -estradiol, como consecuencia de la acción de la hCG sobre el testículo. Pero únicamente en los sujetos que presentaban alteraciones en las aromatasas aparecían metabolitos de nandrolona en orina, incluso por encima de la barrera de los 2 ng/mL. Ello indicaría una procedencia endógena de esta sustancia.

Índice testosterona/ β -estradiol urinario como posible parámetro para la diferenciación entre norandrosterona de procedencia endógena y exógena en orina de deportistas

COMPARACIÓN ENTRE SUJETOS CON POSIBLE PRODUCCIÓN ENDOGENA CON SUJETOS INYECTADOS CON NANDROLONA Y SUJETOS CONTROL

Valores urinarios de la relación Testosterona/ β -Estradiol en varones no deportistas, sujetos declarados como positivos en un control de dopaje (1, 2 y 3) y sujetos a los que se les inyectó 25 mg de Deca-durabolín.

Parámetro	Control	Positivo 1	Positivo 2	Positivo 3	Inyectados
NA	ND	3,12	0,49	4,22	9,55±5,70
Test/Estradi	2,97±2,23	23,70	18,31	18,51	4,65±3,98

Observamos los cambios en la relación Testosterona/ β -Estradiol urinaria, esta relación nos indica la acción de las aromatasas sobre la testosterona. En nuestro estudio llama la atención los altos valores que presenta esta relación en los sujetos que pueden presentar una alteración en los sistemas aromatasas (sujetos no negativos), frente a los sujetos control y sujetos a los que se les inyectó 25 mg de Deca-durabolín (nandrolona). Este incremento, a nuestro entender es debido a una alteración en los sistemas aromatasas en las que habría un correcto funcionamiento en la primera fase del proceso de aromatización con formación de 19-Nortestosterona inicialmente, pero al fa-

llar la segunda fase (aromatización de la 19-nortestosterona), se producirían menores cantidades de β -estradiol y con ello una menor eliminación urinaria de la misma y por el contrario se produciría nandrolona endógena que se eliminaría posteriormente como 19-NA y/o 19-NE en valores que pueden ser muy superiores a lo establecido como normal.

Creemos que esta relación de fácil determinación puede ser un interesante marcador para la diferenciación entre la procedencia endógena y exógena de la 19-NA y/o 19-NE en la orina de deportistas que pueden tener una patología en este sistema enzimático, algo similar a lo que ocurre en la gota, enfermedad debida igualmente a una alteración en un sistema enzimático de nuestro organismo. En esta enfermedad se puede diagnosticar fácilmente por la presencia de altos niveles de ácido Úrico en la sangre, sin embargo para diagnosticar una alteración en las aromatasas solamente si se hicieran análisis de orina para ver los metabolitos de la nandrolona se podría suponer la presencia de esta anomalía. Sin embargo en el mundo deportivo a estas personas se les acusa sin darles la mínima posibilidad de demostrarlo.

En conclusión el índice testosterona/ β estradiol (T/ β E) es un buen parámetro para la diferenciación entre norandrosterona de procedencia endógena y exógena en orinas de deportistas y lo asumimos como un buen criterio científico para estos estudios.

BIBLIOGRAFÍA

- DONIKE, M.; GEYER, H.; KRAFT, M. y RAUTH S.: *Influencia a largo plazo del uso indebido de esteroides anabolizantes sobre el perfil esteroideo*. Archiv. de Medicina del deporte (1990); Vol II:162-172.
- GALÁN MARTÍN, A. M.; MAYNAR MARIÑO, J. I.; GARCÍA DE TIEDRA, M. P.; RIVERO MARABÉ, J.J.; CABALLERO LOSCOS, M. J.; MAYNAR MARIÑO, M.: "Determination of nandrolone and metabolites in urine samples from sedentary person and sportsmen". *Journal of Chromatography B*. 761 (2001) 229-236.
- GALÁN MARTÍN, A.M.; MAYNAR MARIÑO, M.; GARCÍA DE TIEDRA, M. P.; MAYNAR MARIÑO, J. I.: La nandrolona y el dopaje. *Revista Jurídica del Deporte* (2003); Año 2002-2. (8). 63-75.

- LE BIZEC, B.; BRYAND F.; GAUDIN, I et al.: "Endogenous nandrolona metabolites in humanan urine. Two-year monitoring of male professional soccer players". *J. Anal Toxicol* (2002); 26 (1): 43-7.
- MARECK_ENGELKE, U.; SCHULTZE, G; SELLER H, Schänzer W.: "The appereance of Urinary 19-norandrosterone during Pregnancy". *European J of Sport Sci.* (2002);2:1-7
- REZNIK, Y.; DEHENNIN, L.; COFFIN C. et al.: *Urinary nandrolone metabolites of endogenous origin in man : a confirmation by output regulation under human chorionic gonodotropin stimulation.* *J. Clin Endocrinol Metab.* (2001);86:146-50.