



Rev. Cub. Med. Dep. & Cul. Fís. 2015; Vol. 10, Núm. 1

ISSN: 1728-922X

Artículo de Revisión

Dopaje genético, sustancias moduladoras de la expresión genética y riesgos para la salud.

Genetic doping substances modulating gene expression and health risks

Autores: Víctor M Cabrera Oliva¹, Yamil Gutiérrez Jorge², Jorge Pavel Pino Rivero³, Pablo Castillo⁴ Díaz. vcabrera@infomed.sld.cu

1DrC, Investigador Titular, Profesor Titular, Instituto de Medicina Deportiva, La Habana, Cuba.

2Especialista de Primer Grado en Medicina Deportiva, Instituto de Medicina Deportiva, La Habana, Cuba.

3Especialista de Primer Grado en Medicina Deportiva, Instituto de Medicina Deportiva, La Habana, Cuba.

4Especialista de Primer Grado en Medicina Deportiva, Instituto de Medicina Deportiva, La Habana, Cuba.

Resumen

Durante las últimas 2 décadas, los avances en la decodificación del mapa genético humano, así como el descubrimiento de genes defectuosos que codifican las proteínas específicas particulares en algunas enfermedades humanas graves han dado lugar a intentos de tratar a los pacientes enfermos con terapia génica. Se ha puesto especial interés en las proteínas recombinantes humanas que han sido genéticamente modificadas y producidas in vitro (insulina, hormona crecimiento, factor de crecimiento-1 similar a la insulina, eritropoyetina).

Por desgracia, estas sustancias y los métodos utilizados también se han convertido en herramientas inadecuadas para los atletas deshonestos. Las investigaciones Biomédicas se han centrado en la posible inserción directa del material genético en el organismo, con el fin de reemplazar algunos genes defectuosos in vivo y/o para promover la síntesis endógena de proteínas deficientes de larga duración. Teóricamente, la diabetes, anemia, distrofias musculares, las deficiencias inmunes, las enfermedades cardiovasculares y otras numerosas enfermedades podrían beneficiarse de estas Investigaciones biomédicas innovadoras, aunque todavía queda mucho trabajo por realizar.

Considerando los hallazgos recientes que vinculan genotipos específicos y el rendimiento físico, para algunas personas resulta tentador someter a la joven población atlética a las transformaciones genéticas o en su defecto, a la modulación de la expresión genética artificial. Se han desarrollado muchas investigaciones con la finalidad de lograr una transferencia segura de material genético a los seres humanos. Esto es de importancia crítica ya que debido a la producción no controlada de proteínas específicamente codificadas, podrían ocurrir efectos secundarios adversos graves (policitemia, problemas cardiovasculares agudos, cáncer, etc.). También son posibles otras reacciones impredecibles (inmunogenicidad de vectores o complejos ADN-vector, las anemias autoinmunes, la producción de material genético de tipo salvaje). Algunas de las nuevas sustancias (bloqueadores de miostatina o anticuerpos anti-miostatina), aunque no son material genético significativo, podrían representar una herramienta útil

en el tratamiento y la prevención de las distrofias musculares. Del mismo modo, otras moléculas, con las funciones de activadores genéticos o metabólicos [5-aminoimidazol-4-carboxamida 1-β-D-ribofuranósido (AICAR), GW1516] , podrían concomitantemente mejorar la capacidad de los ejercicios de resistencia no solo en condiciones de isquemia , sino también en condiciones normales.

Sin duda, algunos atletas intentarán aprovecharse de estas nuevas moléculas para aumentar la fuerza o la resistencia.

Palabras Claves:doping, genes, sustancias moduladoras

Los Laboratorios Antidoping están mejorando los métodos de detección. Estos se basan tanto en la identificación directa de las nuevas sustancias o sus metabolitos como en la evaluación indirecta de cambios en los patrones genéticos, proteínas o metabolitos (genómica, proteómica o la metabolómica).

Summary

During the past 2 decades, advances in decoding the human genetic map as well as the discovery of defective genes that encode specific proteins in particular some serious human diseases have led to attempts to treat sick patients with gene therapy. There has been considerable focus on human recombinant proteins that have been genetically engineered and produced in vitro (insulin, growth hormone, growth factor -1 similar to insulin , erythropoietin) Unfortunately, these substances and methods have also become inadequate for athletes unscrupulous tools. The biomedical research have focused on the possible direct insertion of genetic material into the body to replace some defective genes in vivo and / or to promote the endogenous synthesis of full length proteins deficient. Theoretically, diabetes, anemia, muscular dystrophy, immune deficiencies, cardiovascular disease and numerous other diseases could benefit from such innovative biomedical research, although there is still much work to do.

Considering the recent findings linking specific genotypes and physical performance, for some people it is tempting to subdue the young athletic population genetic transformations or failing that, to the artificial modulation of gene expression. Many researches have been developed in order to achieve a secure transfer of genetic material to humans. This is critical because due to uncontrolled production of encoded proteins specifically, serious adverse side effects (polycythemia, acute cardiovascular problems, cancer, etc.) may occur. Other unpredictable reactions (immunogenicity vector or DNA-vector complex, autoimmune anemias, genetic material producing wild-type) are also possible. Some of the new substances (myostatin blockers or anti - myostatin antibodies), although not significant genetic material, could be a useful tool in the treatment and prevention of muscular dystrophies. Similarly, other molecules, with the functions of genetic or metabolic activators [5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside (AICAR), GW1516], could concomitantly improve the capacity of endurance exercise not only able to ischemia, but also in normal conditions.

No doubt some athletes try to take advantage of these new molecules to increase strength or endurance. The Anti-Doping Laboratory are improving detection methods. These are based on both direct identification of new substances or their metabolites and indirect assessment of changes in genetic patterns, proteins or metabolites (genomics, proteomics or metabolomics).

Keys Words:doping, genes, modulatory substances

1. Introducción

La terapia génica está adquiriendo una importancia considerable en el tratamiento prospectivo de muchas enfermedades genéticas o adquiridas [1]. Descifrar el genoma humano completo permite a los científicos descubrir el origen de algunas enfermedades genéticas y al mismo tiempo estudiar posibles métodos para el tratamiento. En el campo terapéutico, se produce la posibilidad del tratamiento genético por introducción directa de material genético en el organismo o por la regulación (o baja regulación) de la actividad de algunos genes deficientes (o dañados). Esto podría permitir una producción casi fisiológica y continua de algunas proteínas, evitando la administración periódica de proteínas recombinantes externas.

Desafortunadamente, los mismos métodos podrían ser utilizados por los deportistas para hacer trampa con el objetivo de mejorar la producción endógena de algunas proteínas particulares artificialmente [2]. La posible mala utilización de estas terapias génicas podría mostrar la misma eficacia que los métodos de dopaje reales basados en la administración de moléculas recombinante exógenas.

2. Evolución de las Reglas Antidoping

En junio de 2001, por primera vez, fue designado por la Comisión Médica el Comité Olímpico Internacional (COI) el Grupo de Trabajo de Terapia Génica, ante la posibilidad potencial del abuso del dopaje genético por parte de los atletas, en una reunión sobre "La terapia génica y su impacto en el deporte" [3].

En marzo de 2002, la Agencia Mundial Antidopaje (AMA), junto con científicos del deporte, expertos en genética y representantes del deporte organizó un taller en el Centro Banbury en Nueva York para discutir la posibilidad de la transferencia de genes en el deporte donde el talento y la manipulación genética convergen, y más tarde (2004) nombró un grupo de expertos sobre el dopaje genético [4].

Introducido por primera vez en 2003 en la lista IOC/WADA, se incluyó el dopaje genético en las listas de prohibiciones. El doping genético fue incluido en la lista prohibida de la AMA del 2004 con la siguiente definición: "El dopaje genético o celular se define como el uso no terapéutico de genes, elementos genéticos y/o células que tienen la capacidad de mejorar el rendimiento atlético".

En la lista de la versión 2011, se expuso con más detalle y especificada como:

" M3. GENE DOPAJE". Con el potencial para mejorar el rendimiento deportivo, están prohibidas:

1. La transferencia de ácidos nucleicos o secuencias de ácidos nucleicos;
2. El uso de células normales o genéticamente modificadas;
3. Está prohibido el uso de agentes que afectan directa o indirectamente las funciones conocidas que influyen en el rendimiento al alterar la expresión génica. Por ejemplo, el Receptor Activado por el Proliferador de Peroxisoma tipo δ (PPAR δ) agonistas (por ejemplo, GW 1516) y PPAR δ – Monofosfato de Adenosina (AMP)- Activada por Proteína Cinasa (AMPK), agonistas del eje tales como 5-Aminoimidazol-4-carboxamida 1- β -d-ribofuranósido (AICAR) "

En la lista de prohibiciones de la AMA de 2012, la definición de dopaje genético se limitaba sólo a los puntos 1 y 2, mientras que las sustancias en el punto 3 (agonistas PPAR δ y los agonistas del eje AMPK, GW1516 y AICAR) fueron trasladados a la clase de S4, "Hormonales y moduladores metabólicos".

En la lista de la AMA 2013, el dopaje genético tiene una definición con mayor precisión del punto 1: "La transferencia de polímeros de ácidos nucleico o análogos de ácidos nucleicos" [5].

3. Ingeniería genética y detección de genes

La evolución de la "ingeniería genética" se inició en la década del 1980 con la producción "in vitro" de sustancias fisiológicas activas, como fueron la insulina, eritropoyetina (EPO), la hormona de crecimiento (GH) y el factor de crecimiento de tipo 1 similar a la insulina (IGF-1), que se encuentran estructuralmente muy cercanos a las hormonas humanas [6].

La evolución fue muy rápida. Las primeras preparaciones de EPO humana recombinante (rHuEPO) se obtuvieron con el gen de la EPO humana introducida en las líneas de células de ovario de hámster chino, y eran responsables de las diferencias sutiles en las estructuras de hidratos de carbono. Mediante el uso de células de riñón humano en lugar de células de hámster, Shire Pharmaceuticals presentó Dynepo en 2007. Esta nueva rHuEPO mostró una estructura molecular que estaba muy cercana a la EPO endógena.

Debido a su analogía estructural, algunos atletas consideraron erróneamente que Dynepo podría ser utilizada para hacer trampa en el deporte sin peligro de ser detectados de acuerdo con las pruebas de orina existentes en ese momento [7,8].

A partir de dos proyectos principales de investigación, PATRIMONIO y GENATHLETE, orientado a encontrar los genes responsables de la capacidad de resistencia en los seres humanos [9], se identificaron muchos otros genes relacionados con el rendimiento en el deporte. Algunos genes y su polimorfismo como son los genes codificadores de la Enzima Convertidora de la Angiotensina (ACE), el código genético (185-pb) del receptor de la EPO, el código genético de la creatina quinasa muscular, o el código del gen del receptor adrenérgico $\alpha 2$ se correlacionaron positivamente en algunos estudios con la capacidad de mejorar la resistencia en corredores [10].

La revisión de carácter anual publicada por Rankinen y colaboradores, y que ha sido nombrada "mapa genético para el rendimiento humano", actualiza la lista de los genes humanos descubiertos relacionados con fenotipos de aptitud física. Hasta la fecha se han registrado hasta 214 entradas de genes autosómico y locus de rasgos, además de otros siete en el cromosoma X y 18 genes mitocondriales que mostraron una clara influencia en la aptitud y fenotipos del rendimiento. Los Genes con polimorfismos genéticos singular o especial están relacionados con los fenotipos de la resistencia, o fenotipos de resistencia muscular, o respuesta al entrenamiento o fenotipos de intolerancia al ejercicio [11, 12].

La investigación genética podría convertirse en un método de selección capaz de evaluar, de acuerdo con los distintos genes o patrones cromosómicos, la posible predisposición genética de un atleta orientado hacia la resistencia o la potencia. Esta característica distintiva ya fue documentada por el estudio del polimorfismo del gen PPAR α en una gran cohorte de atletas. Estos sujetos y sus controles sedentarios

pareados experimentaron un genotipaje para el ADN de las células de la mucosa y biopsia de los músculos de la boca para un subgrupo. Los resultados mostraron que miotipología estaba relacionada con el polimorfismo del gen PPAR α [13].

Algunas publicaciones también han subrayado el aspecto ético de una violación de la privacidad relacionada con el uso y el manejo confidencial de la información relativa al mapeo genéticos del individuo. Aunque no se aplica todavía en gran escala, es factible el mapeo de genes de una población deportiva específica, como ya se ha documentado. La identificación de talentos en una edad temprana, basada en la predisposición genética de cada individuo, más las características antropomórficas externas observables alrededor de la pubertad, no está lejos de la conversión del deporte de un evento de campo a un evento de laboratorio [14, 15].

Se llegó a un consenso similar en la ética y deporte durante el Simposio de la AMA de 2005, sobre el dopaje genético en Estocolmo, con la declaración de que, "El uso de la información genética para seleccionar a favor o discriminar a los atletas se debe prohibir. Este principio no se aplica para la detección o legitimación de la investigación médica" [16].

Este riesgo de abuso del tamizaje genético parece ser más probable ya que algunos artículos publicados subrayan el importante papel de un solo gen (ACTN3, alfa -actinina - 3) en la expresión de las fibras de tipo II de contracción rápida en el rendimiento de velocidad [17, 18]. Aunque la contribución de este único gen está aún en discusión, existen algunos kits comerciales que ofrecen la posibilidad de realizar un tamizaje genético de forma rápida en los atletas. Tal estrategia, con un interés que aún debe ser demostrado, no parece ética, especialmente entre una población de atletas jóvenes o sanos [19].

De acuerdo con el Convenio del Consejo de Europa de Bioética y del Acta de la Ley de No-discriminación de la Información Genética de los EE.UU., las pruebas de predisposición genética son éticamente, o legalmente, aplicable sólo por estrictas razones de salud, y con adecuado consejo genético, y no son para otros fines de evaluar la capacidad física o de empleo [20]. Estas reglamentaciones no consideran la aplicación del tamizaje a priori de atletas saludables para una enfermedad genética o una condición la cual pudiera revelar o empeorar por la práctica del deporte [21]. Unos pocos ejemplos típicos se observan en algunas enfermedades del corazón (miocardiopatía hipertrófica, el síndrome de QT largo, miocardiopatía ventricular arritmogénica derecha, síndrome de Brugada, etc.), detectado durante un examen de rutina antes de la participación, en la cual se observa un fuerte vínculo con algún familiar y/o predisposiciones genéticas [22, 23]. En algunas de estas condiciones, un análisis genético bien realizado posibilita una correcta estratificación del riesgo y algunas medidas de prevención secundaria, incluida la planificación o retirada de la actividad deportiva [24].

4. Tratamiento genético y manipulación genética

Sin lugar a dudas, la terapia génica es probable que se convierta en una importante herramienta para el tratamiento de pacientes que sufren de graves enfermedades. Algunas condiciones patológicas que podrían potencialmente beneficiarse de tales tipos de tratamiento incluidas las distrofias musculares congénita o adquirida, diabetes,

formas primarias o secundarias de la anemia grave (insuficiencia renal, cáncer), enfermedades cardiovasculares y trastornos del crecimiento.

Desafortunadamente, otro aspecto debe ser considerado sobre el posible uso de la manipulación genética. Estas futuras terapias innovativas utilizadas como tratamiento a largo plazo de algunas enfermedades específicas probablemente serán mal utilizadas simultáneamente por los atletas que hacen trampa y sus asesores científicos, para buscar una mejoría artificial de los parámetros fisiológicos y las capacidades [25-27]. En muchas enfermedades, la ciencia médica tiene como primer objetivo identificar las deficiencias congénitas o adquiridas o función anormal de sustancias particulares en el cuerpo humano (proteínas, hormonas, enzimas, etc.). Entonces, los actuales tratamientos consisten en un intento de equilibrar los mecanismos defectuosos por la introducción externa de las sustancias deficientes en el cuerpo humano. Este es el caso, por ejemplo, de la insulina, GH y EPO, que, aun siendo insuficiente, por ejemplo, en pacientes con diabetes, provocan problemas de crecimiento o anemia, se producen de forma externa in vitro o in vivo y posteriormente son inyectadas en el organismo humano [28].

La manipulación genética prenatal de células madre embrionarias en realidad es de interés práctico. Por el contrario, la intervención postnatal en las células somáticas, por la introducción de material genético (ADN, ARN o células modificadas genéticamente) en el cuerpo, es capaz de mejorar o suprimir la producción de sustancias responsables de los patrones de la enfermedad.

El progreso de la terapia génica se basa en la identificación de los genes responsables de la producción de una sustancia/hormona/enzima específica, seguido por la introducción de este gen (transgén) en el cuerpo humano.

Se prevé que este transgén se incorporará en la célula y utilizará la maquinaria celular para sintetizar la proteína recombinante especificada o la hormona in vivo, directamente dentro del cuerpo humano, dando lugar a la producción de una proteína muy similar a la endógena que falta o que está dañada [29-31].

De manera similar, los atletas que están decididos a hacer trampa podrían tratar de usar las mismas manipulaciones genéticas para mejorar su rendimiento mediante el aumento de la producción de algunas proteínas relacionadas con el rendimiento. En consecuencia, poder diferenciar las moléculas producidas a partir de dopaje genético de sus contrapartes "naturales" es un verdadero desafío [32, 33].

Varios métodos, incluyendo la inhalación o inyección, pueden ser utilizados para incorporar el material genético al interior del cuerpo.

Una vez que el material genético se incluye dentro de la masa nuclear de la célula, la secuencia de ADN del gen induce, a través de RNA, la producción de la proteína específica codificada por el material genético insertado. Se han propuesto varios métodos de introducción del material genético, con diferentes ventajas y/o efectos adversos:

- Trasplante directo: Con esta técnica, las células humanas son aisladas del cuerpo, modificadas genéticamente in vitro, se tamizan y finalmente de nuevo son trasplantadas al donante. Este método ha recibido un renovado interés desde que Medgenics inició recientemente un estudio de fase IIb con el uso de la Biobomba (Biopump) de EPO en pacientes anémicos dializados [34, 35].

- Transfección: Este método implica transportadores no virales (liposomas, plásmidos, vesículas lipídicas, el ADN normal, Complejos proteína-ADN, ADN desnudo) [36]. El

vector de transporte es generalmente más fácil y más barato para preparar y está menos sujeto a la contaminación que otros métodos.

El material genético es inyectado y ejerce sólo efectos locales. La inmunogenicidad de este método es baja, así como la duración de la acción (días o semanas).

- La transducción con vectores virales inactivos [adenovirus, virus adeno-asociado (AAV), onco-retrovirus, spumavirus, virus del herpes, lentivirus, virus del bosque Semliki] :Al parecer, hasta la fecha, este es el método más eficaz [37]. La duración de los efectos, que también puede ser sistémico, es más largo (meses o años), pero la preparación es más costosa, más prolongada y tiene más riesgos.

De hecho, los virus inactivos lisados no son patógenos, pero en comparación con los vectores no virales, que muestran mayor toxicidad e inmunogenicidad, a veces producen rechazo. Además, el riesgo de contaminación con virus virulentos o de tipo salvaje durante la preparación no se puede excluir, a pesar de las pruebas de contaminación y de seguridad que se realizan.

- Otras técnicas: existen métodos adicionales, tales como microinyección, biobalística (que utiliza pequeñas partículas de plata recubiertas con el material genético que se insertará en la célula receptora), y incorporaciones electro y químicas (que implican la creación de poros en la membrana celular de modo que los genes se pueden transferir fácilmente) [38].

Las problemas más comunes relacionados con la terapia génica son [39-41]:

- La calidad del material genético: incluso si se obtiene fácilmente y no es costoso de producir en grandes cantidades por cultivos bacterianos, el material necesita ser liberado posteriormente de sustancias químicas o de pirógenos y probado para su uso con seguridad;

- Contaminación con virus de tipo salvaje;

- Posible mutagénesis: consiste en un cambio definitivo en los ácidos nucleicos de la célula (ADN o ARN) y la capacidad de inducir modificaciones genéticas de las estructuras del cromosoma con la toxicidad maligna, dentro de diferentes enfermedades, incluyendo los cánceres.

-Las potenciales y grandes reacciones inmunogénicas inducidas no sólo por la introducción de material diferente (vectores o genes, o la combinación de genes de virus en sí) en el cuerpo, sino también por la producción interna de una proteína que a veces difiere ligeramente de la fisiológicamente endógena.

- El riesgo de tener los tejidos no diana activados por esta terapia transgénica;

- Una disregulación o una activación de un oncogén secundaria a una falta de control de la zona donde se inserta el transgén.

- La modulación de la expresión génica tras la introducción en el cuerpo del paciente: en esta situación, la cantidad y la calidad de la sustancia producida genéticamente son una cuestión, así como la duración de los efectos autónomos.

- El riesgo de una producción excesiva o deficiente.

- Los riesgos ambientales vinculados con la eliminación del fluido corporal que contenga virus modificados genéticamente o de sus subproductos;

- La posible integración de material genético en las células germinales, con la transmisión genética de los rasgos imprevisibles a las siguientes generaciones.

Los genes y fenotipos de resistencia de fuerza muscular

La fosforilación aeróbica u oxidativa es el principal sistema de energía en eventos deportivos o ejercicios

que duran más de 1 min. El sistema de suministro de oxígeno en el músculo activo puede estar limitado por la capacidad del metabolismo de los músculos esqueléticos lo cual se relaciona con la densidad capilar, el contenido mitocondrial y el tipo y proporción de fibras de contracción lenta (ST) y contracción rápida (FT). Este es un problema que limita el rendimiento del deportista. Por lo tanto, se puede concluir que cualquier gen que pueda mejorar la capacidad del sistema de transporte de oxígeno (por ejemplo, el gen de la EPO), la densidad capilar (por ejemplo, VEGF), el contenido mitocondrial (por ejemplo, PPAR δ) y las fibras de contracción lenta (por ejemplo: ACTN2) pueden tener potencialidad para el dopaje en los atletas de resistencia.

Algunos genes comunes que pueden utilizarse para mejorar la capacidad de resistencia incluyen eritropoyetina (EPO), los factores inducibles por hipoxia (HIF), proteína de unión Actinin 2 (ACTN2), factores angiogénicos (VEGF, FGF, Angiopietins, TGF- β , PDGF- $\beta\beta$), receptores delta (PPAR δ) activados por el proliferador de peroxisoma, endorfinas, encefalinas, hormona de crecimiento (GH) / factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1). En otros resultados atléticos, la fuerza, velocidad, potencia y capacidad anaeróbica son los principales factores que indican el rendimiento del atleta élite. Estos factores se relacionan con algunos genes que se expresan más en los atletas con la práctica de ejercicio que en cualquier otra persona. Varios genes importantes relacionados con el rendimiento de fuerza como son los factores de crecimiento-1 y 2 similar a la insulina (IGF-1 y 2), la miostatina, hormona de crecimiento (GH), la proteína de unión a Actinin 3 (ACTN3), la enzima convertidora de angiotensina I (ECA).

5. La ingeniería genética y la terapia de la eritropoyetina (EPO)

La EPO y sus diferentes formulaciones químicas o compuestos similares (agentes estimulantes de la eritropoyesis) son, por mucho, las moléculas más estudiadas. La EPO fue una revolución en la farmacología y la medicina clínica, y ha proporcionado a ambos pacientes y médicos una alternativa segura a la transfusión de sangre en pacientes con cáncer o insuficiencia renal con estado anémico severo.

La historia documentada de Eero Mäntyranta, un finlandés esquiador de fondo, ganador de dos medallas de oro (15 y 30 km) en los Juegos Olímpicos de 1964 en Innsbruck, permitió a los científicos descubrir a una persona afectada físicamente por una mutación en su genoma [42]. Una variación en el cromosoma 19p 1.3, conectada con los receptores de EPO, condujo a un déficit en el control de retroalimentación sobre la masa roja y permitió una producción de células sanguíneas y hemoglobina superior a los niveles normales, lo que permitió un incremento en el aporte de oxígeno a los músculos del cuerpo.

Investigaciones llevadas a cabo desde la década de 1990 identificaron una mutación específica familiar, la eritrocitosis autosómica dominante, que se encuentra en todos los miembros de una familia en particular o grupo étnico local. Este consistió en un aumento de la sensibilidad de los receptores de la EPO, con valores más elevados de eritrocitos (policitemia o eritrocitosis) [43-46].

Se descubrió que una mutación en el gen de Janus quinasa 2, es capaz de producir algunos trastornos mieloproliferativos y, en particular, eritrocitosis [47].

Tan pronto como rHuEPO se hubo de introducir en el mercado para curar pacientes con anemia grave, se convirtió desgraciadamente, para algunos atletas sin escrúpulos en la forma más fácil de mejorar sus rendimientos a la resistencia y para maximizar el consumo de oxígeno de manera ilegal. Este efecto ergogénico está mediado por un nivel de hemoglobina mayor y probablemente también por aumento de la angiogénesis [8, 48].

La capacidad de los laboratorios antidoping de hoy para identificar diferentes formas de agentes estimulantes de la eritropoyesis producidos in vitro [EPO, darbepoetina, nuevas proteínas estimuladores de la eritropoyesis, Dynepo, Activador Continuo del activador del receptor de la eritropoyetina, peginesatide, etc.] [49-53] está limitada por la vida biológica media de estas diferentes sustancias [54]. A pesar de las ventanas algo limitada de detección en la sangre y la orina de estas sustancias, las técnicas actuales utilizadas por los laboratorios muestran buena efectividad para la disuasión del manejo del dopaje sanguíneo en el deporte [55, 56].

La opción de la introducción de genes in situ capaces de inducir de manera persistente la producción de EPO 'in vivo' se ha estudiado desde finales de 1990. Esto se logró a través de inyecciones intramusculares en animales (ratones y monos) del gen de la EPO codificado en adenovirus o encapsulado en plásmidos o liposomas. Como consecuencia directa, se observó un aumento del hematocrito de 49 a 81 % en ratones, lo cual fue persistente hasta 1 año, y de 40 a 70% en monos, persistente hasta 3 meses. Mayores aumentos de hemoglobina y larga persistencia incluso fueron reportados por otros autores utilizando un AAV de genes [57, 58].

Estos aumentos exagerados en el hematocrito demuestran la sobreexpresión del transgén. Este sigue siendo el reto más difícil para los científicos debido a la incapacidad de controlar el proceso de síntesis de proteínas, lo cual finalmente resulta en la sobreproducción de hemoglobina (policitemia o eritrocitosis). Algunos estudios experimentales en animales, utilizando un código genético encapsulado en mioblastos (células embrionaria precursoras), hacen posible la síntesis de EPO en la cantidad demandada, controlado por la ingesta de doxiciclina/tetraciclina o pequeñas moléculas similares promotoras, que funcionan como temporizador de encendido y apagado de la señal [59, 60].

Nuevos avances también se han basado en el conocimiento de factores inducibles por hipoxia (HIF). Estos factores fisiológicos de transcripción (o factores de secuencia específica de unión al ADN) son producidos por células de un individuo, en particular en el riñón y el corazón. HIFs se producen en mayores concentraciones en el caso de condiciones de hipoxia, y son capaces de facilitar la transcripción de genes, para aumentar las enzimas glicolítica y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y para inducir la superproducción secundaria de EPO por las células peritubulares. Por ejemplo, bajo una condición médica llamada Policitemia Chuvashia congénita se asocia con reducción de la degradación de HIF. Esto conduce a una sobreexpresión de los genes relacionados con la EPO [45, 46]. La industria farmacéutica ha investigado algunas moléculas pequeñas (FibroGen FG-2216 y FG-4592) que estabilizan al HIF a través de la inhibición de HIF proлил-hidroxilasa (HIF-PH).

Consecuentemente, la inhibición de HIF-PH es capaz de incrementar los niveles de HIF, independientes de los niveles tisulares de oxígeno, con una mayor expresión de

genes de respuesta a HIF, EPO y/o VEGF. Cuando se administran Inhibidores de HIF-PH sintéticos (FibroGen FG-2216), por vía oral a pacientes con enfermedades renales en etapa terminal, se observa un aumento significativo de los niveles de EPO [61]. Aún está siendo investigado si los posibles beneficios de la administración oral de estos moduladores de la expresión genética, son contrarrestados por el riesgo de neogénesis vascular oncogénica [62, 63].

En ratones se observó un mejor control de la expresión génica con el uso del elemento de respuesta a la hipoxia de Oxford Biomedica Repoxygen que es un gen vector EPO especial por el cual la secreción de EPO, a diferencia del gen transportador del citomegalovirus-incontrolado, se activa sólo en presencia de condiciones anémicas o hipóxicas, y se detiene cuando se alcanza el nivel fisiológico de curación [64, 65]. El Repoxygen puede haber sido el primer producto que se asocia con el dopaje genético y es un medicamento de terapia génica que se ha desarrollado recientemente y en respuesta a la baja concentración de oxígeno, tiene un efecto sobre la liberación de eritropoyetina (EPO) en ratones. Este medicamento se utiliza por vía intramuscular en respuesta a la hipoxia e induce la síntesis de EPO transgénica. Los atletas especialmente de resistencia podrían utilizar Repoxygen como un medio de aumentar el número de sus células rojas de la sangre. Debido a sus supuestas propiedades, actualmente pudiera ser imposible de detectar su presencia. La AMA en la Lista de Prohibiciones del 2006, prohibió el Repoxygen tanto dentro como fuera de competencias.

Como medio de aumentar el número de células rojas de la sangre, y debido a sus propiedades autorregulantes y su difícil detección, un exentrenador alemán intentó utilizar Repoxygen con el propósito de incrementar el rendimiento de sus atletas. De acuerdo a los conocimientos actuales el desarrollo de esta terapia génica ha sido abandonada.

En ocasiones se han observado efectos adversos, lo cual puede ser explica fácilmente por los mecanismos de acción del gen de la EPO. En primer lugar, el gen vector complejo podría ser inmunogénico por sí mismo, o por la estructura viral o las posibles impurezas contenidas en la compleja combinación. En segundo lugar, cuando el material genético es introducido en el organismo, existe un riesgo de propagación de DNA a todo el organismo. Algunos tejidos principalmente tejidos no dianas (por ejemplo, células musculares), entonces podrían comenzar a sintetizar EPO, resultando finalmente en la producción de una proteína que es ligeramente diferente a la EPO fisiológicamente normal. De hecho, el tipo de tejido que incorpora el ADN EPO y luego produce la hormona podría imponer su propia firma química (por modificaciones post-traduccionales alteradas) en una molécula de EPO que podrían diferenciarse ligeramente de la forma fisiológica normal. Esta molécula, más o menos "bioequivalente", podría ser reconocida como anormal, incrementando la posibilidad de una respuesta inmune [66]. Por ejemplo, la anemia autoinmune se observó en macacos tratados con la administración de genes de EPO [67, 68].

Estas pequeñas diferencias estructurales obtenidas por ingeniería genética de las moléculas de EPO son esenciales para la lucha contra el dopaje sanguíneo. La detección de abuso de EPO por análisis de muestras de orina en los atletas está mejorando continuamente, utilizando principalmente focalización isoelectrica junto con técnicas de inmunoblotting [49].

Por ejemplo, las isoformas de EPO sintetizadas por las células musculares, en lugar de fibroblastos peritubulares renales, son detectables en el suero de macacos por isoelectroenfoque, mostrando diferentes patrones en los mismos animales antes y después de la transferencia genética por AAV inyectado en el músculo esquelético [69]. Desde hace algunos años, un nuevo enfoque antidoping ha sido utilizado para luchar contra el dopaje. Se llama el Pasaporte Biológico del Atleta y se basa en un análisis longitudinal de algunos parámetros biológicos seleccionados obtenidos de manera repetitiva en muestras de sangre u orina del atleta [70]. El propósito de esta herramienta es monitorear las fluctuaciones individuales de algunos parámetros seleccionados relacionados con el dopaje sanguíneo (concentración de hemoglobina y el recuento de reticulocitos), los cuales están normalmente sujetos a variaciones limitadas [71]. Posteriormente se aplica un modelo de algorítmico matemático para detectar variaciones muy improbables que podrían reflejar bien una condición patológica (que deberá ser probada por el atleta) o una estrategia de dopaje sanguíneo [72,73]. Esta herramienta indirecta es independiente de la estrategia de dopaje sanguíneo utilizada por los atletas que hacen trampa (agentes estimulantes de la eritropoyesis o EPO exógena administración o transfusión de sangre o la manipulación genética EPO) [74, 75]. Aunque en realidad actualmente sólo se implementa el módulo hematológica por algunos organismos rectores del deporte, se están estudiando otros módulos como el módulo endocrino (somatotrópicas, gonadal, y el eje corticotrópico) y el módulo esteroideal en muestras de orina.

6. La modulación de la actividad genética y el Metabolismo

Un enfoque interesante y sorprendente a la posible modulación genética provino de la observación de que el receptor activador del proliferador de peroxisoma por el gamma-co- activador-1 alfa (PGC-1a), un co-activador de la transcripción, aumentó durante el ejercicio, y era capaz de estimular la biogénesis mitocondrial e inducir un metabolismo más oxidativo y menos glicolítico durante el entrenamiento de resistencia en las fibras de contracción lenta [76, 77].

Por otra parte, se encontró que los ratones tratados con resveratrol (un compuesto natural polifenólico con propiedades antioxidante que se encuentran en la piel de las uvas) elevó su tiempo de funcionamiento y el consumo de oxígeno por la inducción de proteína quinasa activada por AMP, la fosforilación oxidativa mitocondrial y la biogénesis mediada por el aumento de la actividad de PGC -1^a [78]. Esto también tuvo un efecto protector contra la obesidad, enfermedades relacionadas con la edad y resistencia a la insulina [79,80]. Adicionalmente, se informó que ratones transgénicos con la expresión genética de una forma activada de PPAR δ mostraron una mayor proporción de fibras tipo 1, con mayor capacidad oxidativa y aumento de la capacidad de resistencia [81]. Prácticamente, es razonable asumir que la actividad de PPAR α , PPAR δ , PGC-1a y PGC-1b podrían influir en la expresión del ARN mensajero (ARNm) en las fibras del músculo esquelético [82].

También se ha demostrado que algunas moléculas pequeñas (tales como GW1516) fueron capaces de activar directamente la vía del PPAR δ [81]. Otras, sin embargo, como AICAR, después de la conversión en nucleótidos, imitan los efectos de AMP, y la activación de AMPK en el núcleo. Esta vía ejercicio-similar promueve la activación de esta manera la expresión de genes oxidativos de 'regulación' de PGC-1a y PPAR δ ,

con un incremento secundario del metabolismo muscular. Como consecuencia, estas moléculas parecen mostrar un mayor efecto fisiológico en animales entrenados, sin excluir un efecto autónomo en animales sedentarios. En particular, la administración GW1516, aunque que no funciona en ratones sedentario, fue capaz de incrementar hasta el 100% de la capacidad de resistencia de los ratones individuales cuando se combinó con el ejercicio.

Por el contrario, 4 semanas de tratamiento AICAR solo, incluso en ratones sedentarios, fue capaz de mejorar la resistencia durante las carreras en un 44 % [83]. Los experimentos con animales demostraron que estas moléculas podrían potenciar los efectos fisiológicos del ejercicio, en particular, aumentar el metabolismo de las grasas [84, 85]. Podían también aumentar algunas expresiones genéticas celulares y por lo tanto la masa mitocondrial, así como la angiogénesis conduciendo a la mejoría de la capacidad de resistencia en el ejercicio de [86].

Desde un punto de vista teórico, los atletas de resistencia podrían beneficiarse en términos de rendimiento de la utilización de estas sustancias, actuando como "píldoras del ejercicio, por una respuesta metabólica amplificada, en particular sobre la oxidación de los ácidos grasos [87]. Sin embargo, los posibles efectos ergogénicos en humanos, si existen, es probable que sean irrelevantes desde dicha estrategia de dopaje y se necesitarían grandes cantidades de estas costosas moléculas con el objetivo de obtener cualquier efecto en el cuerpo humano. Además, no está claro si la administración de AICAR produciría alguna activación metabólica adicional en los tejidos musculares de los atletas entrenados donde AMPK ya estaría activada en un alto nivel [88].

7. Moduladores de la enzima convertidora de la angiotensina

Los estudios genéticos demostraron, hace muchos años, una correlación estadística entre la capacidad de resistencia en los seres humanos y el polimorfismo del código genético de ACE [89]. Por lo tanto, una reducción de la actividad ACE está vinculada a un máximo consumo de oxígeno más elevado, un aumento de la capacidad de ejercicio y una mayor respuesta al entrenamiento. Una actividad de la ECA reducida es responsable de una menor conversión de angiotensina I a la angiotensina II vasoconstrictora y de mayores niveles de bradiquinina (vasodilatador). Se llevaron a cabo numerosos estudios, con diferentes grupos étnicos, con la inserción/delección del polimorfismo ACE, de forma abreviada 'en / del ' o ' I / D'.

La posible prevalencia de un "alelo ACE-in'" correlacionado con la capacidad de resistencia se evaluó en las poblaciones indígenas andina que vive en las latitudes elevadas, así como en Kenia, Australia y en los atletas europeos, y no mostraron resultados inequívocos. Del mismo modo, el "alelo CEA-del", aparentemente está relacionado con el rendimiento de velocidad/potencia y se ha estudiado en los grupos de rusos, británicos y de Jamaicanos, y se realizaron con varias correlaciones [90]. Muy Recientemente, un estudio retrospectivo humano mostró que el alelo ACE-I modula la respuesta muscular a los entrenamientos de resistencia en ciclistas [91]. Los portadores del alelo ACE-I, en comparación con los no portadores (es decir, los genotipos ACE-DD), muestran una mayor densidad de volumen de mitocondrias subsarcolemales y de los lípidos intracelulares. Estos ajustes en las mejorías se

correspondieron con el alelo ACE I dependiente de la regulación superior de los transcritos musculares asociado con el metabolismo de la glucosa y de los lípidos. Aunque aún no está totalmente comprobado científicamente en una población joven normal y sana, la inhibición farmacológica de la ACE puede mejorar la duración del ejercicio. El recientemente descubrimiento de la capacidad del bloqueador del receptor de angiotensina II telmisartán para inducir cambios bioquímicos y metabólicos (por ejemplo biogénesis mitocondrial y cambios en los tipos de fibras musculares esqueléticas), similar al AICAR, está en correspondencia con los hallazgos anteriores [92].

8. hormona de crecimiento, factor de crecimiento -1 similar a la insulina y miostatina

Los efectos anabólicos de la GH en las proteínas y masa musculares, conjuntamente con los aumentos en el metabolismo de los carbohidratos y los ácidos grasos, son bien conocidos por los atletas inescrupulosos que utilizan su forma recombinante humana. Por otra parte, IGF-1, una proteína producida principalmente en el hígado, estimulado por GH y un mediador principal de su acción, pero que actualmente también es producida mediante tecnología recombinante como la forma sintética humana de IGF-1, y es una sustancia dopante. Se conoce que es capaz de evitar la pérdida de la masa muscular relacionada con la edad y promover, en los seres humanos sanos, la hipertrofia muscular y el crecimiento somático, y ambos se producen por el aumento de la síntesis de proteínas y la diferenciación de las células satélite [93]. El IGF-1 (producido en el propio músculo) también es capaz de promover, después de las lesiones normales de estrés, la reparación del músculo y la hipertrofia relativa a través de la proliferación de las células satélite por división, fusión con las fibras musculares y un aumento en las miofibrillas y núcleos [94].

Lee et al. [95] observaron un aumento en la masa muscular (31,8 %) y en la fuerza (28,3 %) después de la administración del gen viral de IGF-1 (AAV inyectado en la pata posterior) en ratones entrenados durante 8 semanas por el aumento de cargas sucesivas. Este aumento fue mayor con la asociación del gen de IGF-1 y entrenamiento de fuerza - resistencia mixta que con el ejercicio solo o el IGF-1 solo. La pérdida de masa muscular durante el período de desentrenamiento fue significativamente menor en las ratas tratadas con el gen de IGF-1, en comparación con los animales no tratados [95]. El uso médico de la IGF-1 sería proteger contra sarcopenia relacionada con la edad y, por otra parte, para ayudar a la recuperación de las lesiones musculares locales (en presencia de un número adecuado de células satélites en el músculo) [94, 96]. Esto podría convertirse en un método incorrecto para aumentar la masa muscular del cuerpo, sobre todo cuando se asocia con los ejercicios de entrenamiento de fuerza.

La miostatina es otra importante proteína sintetizada en el músculo esquelético, y su expresión génica ha sido ampliamente estudiada porque actúa como un regulador de la masa muscular [97].

Esta es capaz de controlar y disminuir el anabolismo muscular, por inhibición de la activación de células satélite, hiperplasia de la fibra muscular o hipertrofia con un mecanismo de retroalimentación [98, 99].

La supresión o la mutación de los genes 2Myostatin en animales causa hiperplasia e hipertrofia muscular con una mayor masa en el ganado belga Blue y Piemontese (20-30%) y en ratones (200-300 %). De hecho, en las razas de ganado, la herencia de la forma truncada e ineficaz de la miostatina permite el crecimiento del músculo sin control, y los animales tienen una apariencia magra esculpida, debido a la interferencia contemporánea con la deposición de grasa [100, 101]. Los ratones en los que el gen de la miostatina se ha inactivado muestran una marcada hipertrofia muscular [102]. También se informó de este fenómeno con una forma dominante negativa del receptor de miostatina ActRIIB o con la inhibición de los receptores de miostatina por folistatina o por propéptido de miostatina (una versión mutante que carece de la porción de señalización de la molécula de miostatina) [103, 104].

Se ha informado la existencia una variación frecuente de la secuencia del gen de la miostatina [105] así como la existencia del polimorfismo de la miostatina y la folistatina [106]. Estas variaciones tienden a ser responsable de los fenotipos musculares encontrados en los seres humanos. Aunque nunca se ha confirmado oficialmente, se sospecha que un famoso campeón de fisicoculturismo, así como un campeón europeo de levantamiento de pesas Europeo presentan una mutación genética del tipo descrito. Hace algunos años, se observó un tipo particular de hipertrofia muscular, desde su nacimiento, en un niño con mutaciones en ambas copias del gen de la miostatina con una deficiencia típica de miostatina, mientras que la madre, una ex atleta profesional, tuvo una falta de sólo una copia del gen (no se estudió ningún otro miembro de la familia). El niño cuando tenía 4,5 años de edad, era capaz de mantener 3 kg de peso con ambos brazos extendidos [107].

A raíz de estos informes clínicos y biológicos, se han realizado extensas investigaciones médicas con el objetivo de producir pequeños propéptidos, o folistatina o una versión mutante de la miostatina (ambas genéticamente inducidas), los cuales serían capaces de bloquear el receptor de unión a la miostatina normal en pacientes distróficos musculares [108]. Recientemente se han publicado resultados prometedores de un estudio que se propone para tratar los trastornos de desgaste muscular como la distrofia muscular de Duchenne en un modelo murino [109]. Estos autores reportaron un procedimiento para el bloqueo efectivo de la miostatina obtenidas con pequeños ARN de interferencia y genes silenciadores transcripcionales.

También se estudiaron los anticuerpos monoclonales humanizados para la miostatina en pacientes distróficos y/o en pacientes ancianos con sarcopenia [110].

Desafortunadamente, el bloqueo de la miostatina podría potencialmente permitir a los atletas inescrupulosos aumentar su masa muscular rápidamente.

Estos anticuerpos, aunque están prohibidos por las reglas antidopaje, pronto podrían convertirse en una manera tentadora para los deportistas deshonestos para mejorar sus desempeño de fuerza y potencia [111].

9. Factor de crecimiento endotelial vascular

Actualmente los VEGF se estudian para el tratamiento genético en algunos trastornos cardiovasculares (infarto de miocardio, enfermedad arterial periférica). Su efecto positivo sobre la angiogénesis es realmente prometedor para la recuperación parcial del daño isquémico [112]. La transferencia de genes de VEGF con el virus del resfriado común en los seres humanos podría inducir la producción de nuevos vasos,

probablemente útiles para los pacientes con angina de pecho u otras enfermedades cardíacas o vasculares que requieren un mayor transporte de oxígeno a los tejidos periféricos isquémicos [113 , 114].

En el futuro, el aumento de la génesis capilar dentro de los músculos y otros sistemas corporales (cardíaco, pulmonar, endocrina, etc.) podría, por desgracia, convertirse en una forma alternativa de dopaje sanguíneo, debido al mejor suministro de oxígeno a los tejidos periféricos.

10. Los riesgos del dopaje genético para la salud

Aunque teóricamente resultan útiles y relevantes en algunas enfermedades humanas graves raras, los tratamientos basados en genes no están libres de efectos secundarios a veces inesperados y graves.

La transferencia a los humanos de los experimentos con animales no es nunca fácil, tanto a causa de diferentes tamaños de los cuerpos como por las reacciones especies específicas [115]. Una publicación francesa en 2008 informó que nueve de cada diez niños con inmunodeficiencia severa combinada asociada a los cromosomas X fueron tratados con éxito con terapia génica in vivo utilizando vectores retrovirales gamma.

Sus funciones inmunológicas mejoraron significativamente, y estos pacientes jóvenes no desarrollaron de nuevo las infecciones habituales y, a menudo letales [116, 117]. Sin embargo, probablemente debido a la inserción de un gen vector retroviral en las células del cuerpo, cuatro de nueve niños tratados con éxito desarrollaron secundariamente leucemia de células T severa dentro de 31-68 meses, y uno falleció [118] .

Se observó una reacción incontrolable del vector en otro tratamiento basado en genes donde la muerte se debió a la coagulación intravascular y fallo multiorgánico [119].

Como se mencionó anteriormente, el principal riesgo con la terapia génica surge de la actividad incontrolada de genes después de su introducción en el cuerpo. Esto difiere sustancialmente de la administración directa de la sustancia, donde los efectos se limitan al periodo de administración (por ejemplo, con EPO, GH y IGF-1) y disminuyen rápidamente después de la cesación del tratamiento. Otros riesgos con la terapia génica están representados por un transgén que se inserta en una ubicación incorrecta en el ADN, o una modificación del gen en una línea de células no blanco, incluyendo las células reproductoras, con una posible transmisión de este transgén a la descendencia.

La posibilidad de la producción no controlada de glóbulos rojos, con ninguna posibilidad de detener el mecanismo, es el principal problema del dopaje genético para la EPO. Existe la posibilidad de un mayor riesgo de hipertensión, problemas cardíacos, vasculares y cerebrales causados por la alta densidad arterial. Por ejemplo, en una manera similar en poblaciones jóvenes con policitemia familiar y congénita, [45] y se ha encontrado una alta incidencia de muerte cardiovascular precoz (cerebral trombosis venosa o hemorragia, trombosis periférica, insuficiencia cardíaca congestiva, etc.) [46,47].

Una sobreexpresión del gen de IGF-1 podría aumentar la masa muscular más allá de las expectativas de los atletas fraudulentos. Por otra parte una posible consecuencia de la sobreexpresión del gen IGF-1, como se observa en pacientes con acromegalia donde las concentraciones circulantes GH y IGF-1 son muy elevadas, es el desarrollo incontrolado del tejido conectivo en algunos órganos (corazón, hígado, pulmones, etc.).

Esto podría suceder, al menos teóricamente, por ejemplo, sobre las valvulopatías cardíacas, fallos cardíacos, la apnea del sueño (engrosamiento de los tejidos blandos), engrosamiento de la piel y la enfermedad de Raynaud. Por último, el potente efecto mitogénico y los efectos anti-apoptóticos de GH e IGF-1 son bien conocidos, y el efecto oncogénico estimulado genéticamente es más que una hipótesis provocado por la sobreproducción indeterminada de estas sustancias anabolizantes [120]. Del mismo modo, la sobreexpresión estimulada genéticamente de factores angiogénicos podría aumentar potencialmente la vascularización de tumores no detectados y contribuir a su crecimiento, como se sospecha con la EPO y con los miméticos de la EPO [62, 63]. Los atletas violadores de las reglas antidopaje y dispuesto a manipular sus genes con el fin de inhibir la miostatina pudieran enfrentarse a un problema de falta de control sobre una hipertrofia exagerada del músculo esquelético. Como se informó anteriormente con el abuso de los esteroides anabólicos [121], pudieran ocurrir sobrecargas secundarias de los tejidos conectivos y esqueléticos y podrían aumentar el riesgo de ocurrencia de lesiones osteoarticulares.

Tampoco se puede descartar el riesgo inmunogénico. Es particularmente frecuente cuando se utiliza el adenovirus como una vector, pero también es frecuentemente causado por las impurezas persistentes después de la preparación y producción de vectores [66].

Además, una diferencia estructural sutil de una proteína producida genéticamente por los tejidos que no son diana podría desencadenar reacciones patológicas tales como las observados en la anemia autoinmune de macacos tratados con terapia génica de EPO [67, 68].

Aunque es poco probable, no se puede excluir las posibilidades de que los vectores virales puedan repentinamente adquirir una alta virulencia o producir un nuevo virus mutante [122].

Es cierto que sólo las mutaciones de las células germinales (y no los cambios en las células somática) pueden ser transmitidos a las generaciones siguientes. En el caso de que ocurra este fenómeno teóricamente poco probable, aparecerían algunas preocupaciones éticas y legales graves [123].

11. Estrategias para la detección del dopaje genético

Aunque las sustancias o métodos de dopaje prohibidos son detectados por métodos directos e indirectos, los mismos enfoques no son tan fácilmente aplicables en el caso del dopaje genético. Esto es debido a la conformidad particular del material genético con el ADN fisiológico, lo que hace difícil la aplicación de los métodos de detección no invasivos [124]. El intento de utilizar un método de detección de vectores, incluso cuando indirectamente se basen en la respuesta inmune del organismo (por ejemplo, a los vectores virales tales como adenovirus u otros), son a menudo incapaces de discriminar entre la infección natural y la introducción artificial del virus. Sin embargo, se han probado con éxito algunos métodos recientes de detección en glóbulos blancos de macacos. De hecho, los autores fueron capaces de detectar AAV recombinante (rAAV) mediante reacción de polimerasa en cadena en tiempo real (PCR) en ADN genómico de glóbulos blancos de macaco de hasta 57 semanas después de la inyección intramuscular, con un riesgo muy bajo de falsos positivos o falsos negativos [125, 126].

La identificación en los fluidos corporales de las pequeñas moléculas (antibióticos como la rapamicina, la doxiciclina y la tetraciclina u otras sustancias tales como antiprogestinas) utilizados como promotores de conexión o desconexión de la actividad inducida por del gen, proporciona pruebas indirectas de la manipulación genética cuando no estén justificadas o autorizadas para recibir tratamiento médico.

Sin embargo, sigue siendo problemático, ya que algunos de estos fármacos se utilizan comúnmente en la práctica médica y no se han incluido en la lista de sustancias y métodos prohibidos.

La improbable detección "directa" de vectores o genes inyectados localmente podría ser posible sólo si:

- El análisis se lleva a cabo lo suficientemente temprano después de la administración;
- En el caso de la inyección, el sitio de tratamiento local es conocido;
- El atleta acepta procedimientos invasivos (tales como biopsia), que es poco probable.

Es una opción teórica la identificación del gen o vectores con marcadores específicos agregado por los fabricantes, como se propone para la producción transgénica en la agricultura. Sin embargo, este etiquetado no está libre de riesgo y podrían aumentar los riesgos inmunogénicos y técnicos con la introducción de un componente adicional. Se podría poner en peligro la eficacia del tratamiento, y no se conoce que las empresas farmacéuticas acepten este procedimiento y puedan financiar su costo adicional. En último lugar, pero no menos importante, cualquier producción ilegal del transgén por un laboratorio no oficial puede hacer que esta estrategia de detección resulte completamente ineficaz. Por todas estas razones, la opción del método de detección del «etiquetado» ha sido abandonada.

Por otro lado, el mencionado estudio de Lasne et al. [69] fue capaz de identificar, en muestras de suero de macacos, Isoformas de EPO producidas por la inyección del Gen de codificación de AAV de la EPO y controlada por doxiciclina como un promotor. Fue posible diferenciar características post-translacionales (observadas por doble Blot seguido por isoelectroenfoque en suero) de la proteína producida por el músculo esquelético en comparación con el obtenido a partir de fibroblastos de tejido peritubular del riñón.

El mal uso del gen IGF-1 u otros genes de factores crecimiento mecánico, mientras que se inyectan localmente en el lugar habitual fisiológico para la producción de las formas endógenas, producirá isoformas similares sólo a nivel local. En consecuencia, cualquier detección potencial podría ser a través del análisis de una muestra recogida a través de la biopsia local, más que por el método más fácil y habitual de colección de fluidos corporales.

Sin embargo, ha sido descrito un método prometedor para la detección directa de la EPO transgénica (ADN complementario utilizado como gen de transferencia, con una ligera diferencia del ADN genómico endógeno). En el mismo se utilizan especialmente ensayos de PCR con el fin de amplificar selectivamente en la sangre las cantidades mínimas de ADN del posible transgén [127, 128].

Del mismo modo, Ni et al. [125] recientemente demostraron que la inyección intramuscular de un plásmido convencional o vectores de rAAV dan como resultado la presencia de ADN que puede ser detectado en altos niveles en la sangre antes de su rápida eliminación, y que los genomas rAAV pueden persistir durante varios meses en las células blancas de la sangre. Estos glóbulos blancos colateralmente transfectados podrían por lo tanto ser utilizados como marcadores sustitutos para el dopaje genético.

Algunos de los nuevos métodos alternativos están siendo actualmente evaluados [39]; genéricamente llamados " perfil transcripcional, " su objetivo es detectar cambios en los niveles de proteína en comparación con niveles basales fisiológicamente medidos. Esto, por supuesto, requiere de la medición simultánea y repetida de miles de proteínas a partir de la expresión génica (transcriptómica) del perfil proteico (proteómica) y sus resultados bioquímicos (metabolómica) [124].

La transcriptómica, mediante la tecnología de microarrays, parece ser capaz de identificar pequeños cambios en miles de genes. Sin embargo, no es seguro que una sola modificación genética pueda dar lugar a diferencias detectables y discriminar entre una condición fisiológica y otra artificial (dopaje genético). La Proteómica se basa en el análisis por electroforesis en gel bidimensional, electroforesis capilar y cromatografía líquida bidimensional de alta resolución, después de la separación, para identificar y cuantificar un número enorme de proteínas mediante espectrometría de masas. Algunos grupos específicos de biomarcadores probablemente podrían ser dirigidos y utilizados para propósitos antidoping. Metabolómica, el análisis de los metabolitos de bajo peso molecular podría proporcionar evidencia para sospechar una respuesta metabólica a los estímulos artificiales. Mediante la determinación específica del impacto de una sustancia dopante o método, este interesante enfoque antidoping podría superar algunos de las limitaciones encontradas con agentes dopantes con vidas medias corta.

Las limitaciones prácticas a estos métodos incluyen la necesidad de perfiles frecuentes y regulares de un solo atleta, con las consiguientes limitaciones prácticas y de laboratorio.

De hecho, la principal dificultad de los métodos " ómicas " indirectos se basan en los cambios de expresión génica en las células de la sangre (transcriptómica) y de sangre u orina (proteómica y metabolómica) sería la determinación de qué niveles deben considerarse normales y que cambios podrían dar evidencia inequívoca de dopaje. De hecho, los perfiles genéticos individuales, el ejercicio, la dieta, la etnia o el medio ambiente son factores que podrían conducir a cambios fisiológicos en los niveles de los productos génicos específicos. Estos diversos factores de confusión y sus efectos deben ser resueltos por el estudio de poblaciones suficientemente grandes y heterogéneas de atletas y sedentarios durante la fase de desarrollo del método antidoping. Los cambios longitudinales anormales de ARNm, proteínas o metabolitos podrían dar fe de la práctica de un dopaje genético. Sin embargo, algunos atletas no dopados también podrían presentar una característica genética innata o mutación (patología no diagnosticada), que también podría alterar su perfil individual.

La imagenología por radiografía, tanto la tomografía por emisión de positrones como la tomografía computerizada por emisión de fotones, se han utilizado en estudios clínicos para analizar la transferencia de genes en los seres humanos, pero su uso en la detección de la manipulación en el deporte parecen ser irrelevante desde el punto de vista práctico [129,130] .

Hasta ahora, la situación más probable con respecto al dopaje moderno parece estar ligada más al dopaje asistido por la biotecnología que al propio dopaje genético. Estos escenarios estarían relacionados con el uso indebido de cualquiera de los moduladores de genes tales como GW1516 o AICAR o moduladores de miostatina (Anticuerpos antimioestatina). Estas moléculas, que parecen estar disponible ya en el mercado negro, representan una amenaza grave y real para el juego limpio en el deporte [131].

El GW1516, un compuesto sintético, se puede detectar en plasma por precipitación de proteínas, centrifugación y el análisis por espectrometría de masas y cromatografía líquida del sobrenadante [132]. Los estudios sobre el metabolismo y eliminación renal están mostrando el desarrollo de una prueba válida para su detección en la orina [133, 134]. El AICAR es, por otro lado, un intermediario natural de ruta biosintética de las purinas. Por lo tanto, su presencia fisiológica en muestras de orina de los seres humanos sanos es tan conocida como la variabilidad de su concentración debido a diversas condiciones fisiológicas o al estado nutricional. Tanto la producción endógena como la ingesta exógena se miden en la sangre o en la orina por cromatografía líquida y espectrometría de masa. En consecuencia, se están realizando estudios analíticos para cuantificar la cantidad de su producción fisiológica y sus variables de confusión en atletas (género, tipo de deporte, y diferentes períodos de entrenamiento) [135, 136].

Efectos fisiológicos de los receptores delta (δ ppar) activados por el proliferador de peroxisoma

Uno de los nuevos grupos de genes que pueden utilizarse en protocolos de terapia génica son los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR). Estos receptores nucleares moduladores transforman la expresión de genes específicos. Hay tres subtipos distintos de los PPAR, incluyendo PPAR alfa (α), delta (δ) y gamma (γ). Cada subtipo se expresa en un tejido particular y genera heterodímeros con el receptor retinoide X para afectar a la transcripción de un gen específico (138). El receptor delta activado por el proliferador de genes (PPAR- delta) de peroxisomas puede ser utilizado por los atletas de resistencia con el aumento de la biogénesis de las mitocondrias y capacidad de fosforilación oxidativa, y cambiando las fibras de FT a ST (139). Estos resultados han sido confirmados por los informes de algunos investigadores sobre el aumento de gen PPAR - delta en los atletas elite de resistencia (140,141).

Efectos fisiológicos de las endorfinas, encefalinas

El dolor es una señal de advertencia y no debe ser enmascarada. Por otra parte, el rendimiento deportivo puede verse limitado por el dolor de las lesiones durante las competencias. Los atletas que usan una gran cantidad de medicamentos anti-inflamatorios y remedios para aliviar el dolor tratan de mantener ocultas numerosas lesiones dolorosas para mejorar el rendimiento. Hoy en día, los analgésicos se utilizan como un over-the-counter de la mayoría de los atletas. Las endorfinas y encefalinas son péptidos para aliviar el dolor que ayudan a las personas a trabajar por un período más largo sin dolor. Los genes que aumentan estos péptidos podrían utilizarse en el alivio del dolor severo en enfermedades y lesiones de los atletas (142). Estos genes también aumentan la capacidad de la tolerancia y el momento de la aparición del dolor en respuesta al aumento de los factores metabólicos que producen dolor tales como el ácido láctico, y las lesiones crónicas y agudas en los atletas.

Las endorfinas y encefalinas mediante el bloqueo de los receptores del dolor aumentan el umbral de dolor, sin embargo, estos receptores actúan como un mecanismo de defensa contra las lesiones. Al bloquear los receptores del dolor se incrementarán los riesgos del uso excesivo de sistema musculoesquelético y del sistema cardiovascular y

también el estrés y la presión sobre el corazón y las lesiones de estos sistemas y la muerte súbita

Efectos fisiológicos de la hormona de crecimiento (GH) y del Factor de Crecimiento Insulinico- 1 (IGF- 1)

La GH es una hormona anabólica que aumenta el crecimiento de todos los tejidos musculares específicamente esquelético inducido por el factor de crecimiento insulínico (IGF-1). IGF-1 tiene efectos anabólicos y se produce en el hígado, así como los músculos y otros lugares como cerebro. Los genes de IGF-1 dan lugar a un aumento en la masa muscular en ratones y regulan el crecimiento y la regeneración del músculo esquelético (143). La expresión exógena de IGF-I en ratones produce el aumento el tamaño y el número de las fibras musculares sin ningún tipo de programa de ejercicio (144). La combinación de IGF- 1 con otros factores de crecimiento o con los programas de entrenamiento de fuerza puede conducir a mayores respuestas en el crecimiento muscular (144). Se combina con un cambio fenotípico en las fibras lentas y oxidativas resistentes a la fatiga. Las personas con condiciones musculares degenerativas tales como la distrofia muscular pueden beneficiarse de la terapia génica con hormonas anabólicas como el factor de crecimiento tipo 1 similar a la insulina o factor de crecimiento 1 (IGF- 1).

Los efectos secundarios y los factores de riesgos relacionados con la salud.

Hay algunos efectos secundarios graves en los pacientes o atletas tratados con GH como la hipertensión intracraneal, cambios en la visión, dolor de cabeza, náuseas, vómitos, edema periférico, el síndrome del túnel carpiano, artralgia, mialgia, características acromegalia como la nariz y la ampliación de la mandíbula, la hipertensión, cardiomegalia, aumento de artralgias de riesgo cardiovascular, resistencia a la insulina y la diabetes (143). Además, los individuos tratados con IGF-I pueden ser afectados por tumores, ya que algunos estudios informaron que el IGF-1 se expresó en 17 tumores diferentes (145-147). Por lo tanto, el uso de estos genes puede tener un riesgo potencial de varios tumores y cánceres.

Efectos fisiológicos de los bloqueadores de la miostatina

La miostatina tiene un efecto negativo sobre el crecimiento del músculo esquelético y es un miembro de la familia del factor β transformador del crecimiento (TGF) (148). Los bloqueadores de miostatina son aquellos grupos de péptidos que bloquean la miostatina y aumentan la masa muscular por la hipertrofia y la hiperplasia en ratones nulos. Ejemplo de bloqueador de miostatina se puede ver en una cierta raza de ganado a través de mutación natural. El bloqueo de esta proteína reguladora negativa tiene ventajas notables para los usuarios como son la hipertrofia muscular y menos grasa del cuerpo.

Uno de los efectos secundarios en la terapia génica y del dopaje con bloqueadores de miostatina es mayor expresión de estos genes y el aumento de los músculos sobre su tamaño natural, que como consecuencia aumenta la sobrecarga en los tendones y huesos, o marcados daños diferenciales sobre los mismos. El aumento de la masa

muscular en poco tiempo sin adaptación cardíaca puede promover algunas condiciones patológicas del corazón, como la miocardiopatía hipertónica y el aumento de ataque al corazón.

Efectos fisiológicos de los factores inductores de hipoxia

Los Factores Inducibles de Hipoxia (HIF) aumentan la EPO y la capacidad para el transporte de oxígeno. Los Mecanismos de hipoxia se producen en los tejidos bajo condiciones en las cuales aumentan las demandas de oxígeno, tales como el ejercicio. En condición de hipoxia, la actividad de los genes es modulada por HIF (149, 150). Otros efectos de HIFs están relacionados con la alteración del metabolismo del oxígeno, como en el cáncer, inflamación, ataque cardíaco y accidentes cerebrovasculares.

Otros efectos secundarios y factores de riesgos para la salud de las personas que utilizan HIF, consisten en que esta sustancia puede inducir la aparición de cáncer mediante la estimulación de genes que codifican el factor angiogénico de crecimiento endotelial vascular (VEGF), Angiotensin1 (Ang1), angiotensin2 (Ang2) y Metaloproteínas (MMPs) (151), así como otras proteínas relacionadas con el crecimiento celular (150).

Efectos fisiológicos de las proteínas de unión a la actinina (actn2, actn3)

Dos importantes miembros de las proteínas de unión a la actinina - que se relacionan con el ejercicio y el rendimiento deportivo son los alelos Alpha-actininas de las actininas ACTN2 y ACTN3, las cuales mantienen la estructura de la matriz miofibrilar y regulan las miofibrillas de contracción (152). Se ha informado de que los atletas de velocidad en comparación con grupos de control tienen más α -Actinina-3. Con la correlación de la α -actinina-3 con la frecuencia de las miofibras de contracción rápida, podría llegarse a la conclusión de que este alelo tiene un efecto positivo en la fuerza y velocidad de la acción muscular (153). Otros informes indican que los genes codificados por ACTN2 tienen efectos sobre la resistencia muscular (154,152).

Ninguna investigación ha demostrado efectos secundarios o riesgos para la salud debido a la utilización de los alelos ACTN.

Efectos fisiológicos de los factores angiogénicos (VEGF, FGF, Angiopoietinas, TGF- β , Y PDGF- $\beta\beta$)

Los factores angiogénicos son mediadores del proceso de la angiogénesis en respuesta a la hipoxia y a la condición de bajas concentraciones de oxígeno y cambios metabólicos en el músculo esquelético después del entrenamiento. Los factores angiogénicos importantes son el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), Angiopoietinas, factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF- $\beta\beta$). El proceso de angiogénesis es controlado por estimuladores e inhibidores. El ejercicio es un fuerte estimulador de inductor de los factores metabólicos que activan la formación de nuevos vasos sanguíneos en un estado de bajas concentraciones de oxígeno para satisfacer las necesidades del músculo esquelético durante la práctica de

ejercicio. La terapia génica angiogénica es principalmente una técnica potencial para tratar estados patológicos relacionados con la reducción del flujo sanguíneo hacia los tejidos como en las enfermedades cardíacas coronaria y la obstrucción vascular periférica, que es la muerte de tejidos en las extremidades del cuerpo a causa del suministro inadecuado de oxígeno (155-157). El uso de factores angiogénicos por los atletas aumenta potencialmente el sistema circulatorio por el aumento de los vasos sanguíneos, para llevar oxígeno y nutrientes a toda la economía de los músculos y tejidos.

Efectos fisiológicos de la enzima convertidora de angiotensina (ACE)

Se ha informado que la supresión continuamente de la enzima convertidora de la angiotensina desarrolla el rendimiento aeróbico (158, 159). Algunos estudios sobre alpinistas élite de gran altitud (159), remeros de resistencia (160), nadadores élite de corta distancia (161) sugieren que hay dos alelos en el polimorfismo ACE I/D que tienen diferentes efectos sobre el rendimiento atlético, con el alelo I favoreciendo la capacidad de resistencia y el alelo D mejorando el rendimiento en las pruebas de velocidad o potencia. ACE no sólo afecta a la función del músculo esquelético, sino también la hipertrofia ventricular izquierda inducida por el ejercicio (HVI) (162).

El angioedema es un efecto secundario grave de la terapia génica ACE con un incidente 0,1 % -0,5 % en los pacientes (161,162). No hay informes sobre el uso de los genes de la ECA y sus efectos secundarios en personas sanas o atletas.

La Interleucina-15 es factor de crecimiento, que se expresa ampliamente, en el músculo esquelético. Este factor de crecimiento debido a que induce un aumento de la masa muscular puede ser un candidato para el dopaje genético (163). Algunos hallazgos indican que la IL-15 afecta los parámetros asociados con los miocitos estimulados y con las fibras musculares para aumentar las cantidades de proteínas contráctiles y la hipertrofia de la fibra de músculo esquelético (164).

Los genes de la IL-15 pueden ser similares a IGF-1 que incrementa algunos riesgos, de padecer enfermedades como el cáncer y daños musculoesqueléticos.

Efectos fisiológicos de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (pepck)

La Fosfoenolpiruvato Carboxiquinasa (PEPCK) tiene algunos efectos sobre el proceso del metabolismo en varios tejidos, tales como la corteza renal y el hígado. Esta enzima mitocondrial cataliza la conversión de oxaloacetato a fosfoenolpiruvato (165, 139) en el hígado y en los tejidos adiposos. La PEPCK regula la gluconeogénesis y glyceroneogenesis. Hakimi et al. informaron sobre la expresión de la PEPCK en el músculo esquelético, el aumento de la resistencia, la actividad física, la esperanza de vida y la disminución de la grasa corporal en ratones (166). Estos resultados pueden indicar un incremento de la probabilidad de utilizar la codificación del gen de la PEPCK en el dopaje genético.

Hasta el presente no existe información o investigaciones sobre los efectos secundarios o riesgo de usar PEPCK en el deporte.

12 Conclusiones

La terapia génica se limita realmente a algunos tipos particulares de enfermedades graves, pero las investigaciones relacionadas han resultado útiles para el descubrimiento de nuevas moléculas y vías en la biología humana. En el futuro, las aplicaciones prácticas de estas Investigaciones podrían ayudar a la recuperación de algunas enfermedades genéticas, con un retorno a la vida y actividad física normal. Del mismo modo, el uso terapéutico local de algunos tipos de materiales genéticos podrían mejorar y acortar el tiempo de recuperación de músculos, huesos, lesiones graves y articulaciones y tendones. Como resultado, esta tecnología podría convertirse, en el futuro, en un reto para distinguir entre una terapia médica éticamente aceptada, mejorar la recuperación de una lesión, y la práctica prohibida del dopaje genético [15, 137]. En esta situación, la comunidad de la medicina deportiva tendrá que trabajar en estrecha colaboración con la AMA para modificar y ajustar sus reglas antidoping genéticos.

Al igual que en las últimas décadas, el conocimiento científico aplicado a la fisiología del deporte podría convertirse en una herramienta importante para mejorar el rendimiento, mediante manipulaciones artificiales de las características genéticas individuales. El mercado negro está siempre listo para proporcionar a los atletas sin escrúpulos sustancias que ni siquiera han completado todas las fases del estudio clínico, ni han demostrado su valor ergogénico en deportistas de alto nivel. Aunque la industria de alta tecnología genética ha prestado hasta ahora poca atención al deporte, algunos atletas potencialmente tramposos y sus séquitos ya han mostrado un gran interés en algunas de las mencionadas sustancias (metabólicas o moduladores genéticos) para estimular los procesos metabólicos endógenos. Actualmente se investiga si una sola manipulación genética pudiera mejorar significativamente el rendimiento físico. Sin embargo, como se ha demostrado en la presente revisión bibliográfica, algunos genes particulares o vías celulares son sensibles de ser utilizados, ya que están ampliamente vinculados a la modulación de algunos componentes del rendimiento atlético. La comunidad de las ciencias del deporte está comprometido con una tarea difícil: prevenir los posibles efectos adversos sobre la salud y detectar cualquier manipulación posible de genes para mejorar el rendimiento deportivo. Por último, pero no menos importante, la política de detección del dopaje genético tendrá que representar un elemento disuasivo suficiente, en parte debido a su costosa investigación, desarrollo e implementación.

Desafortunadamente, no será posible medir los resultados de un compromiso tan difícil por varios años.

Referencias

1. Terapia Génica C. Sheridan encuentra su nicho. *Nat Biotechnol* .2011 ; 29: 121-8 .
2. Oliveira RS, Collares TF, Smith KR, et al. The use of genes for performance enhancement: doping or therapy? *Braz J Med Biol Res*. 2011;44:1194–201.
3. Cummiskey J. Report on the IOC MC gene therapy medicine and sport. Lausanne: IOC; 2002.
4. Haisma HJ. Gene doping. Review. Netherland Centre for Doping Affairs. 2004.
5. WADA prohibited list. <http://www.wada-ama.org/en/World-Anti-Doping-Program/Sports-and-Anti-Doping-Organizations/International-Standards/Prohibited-List/>. Accessed 30 June 2013.

6. Huard J, Li Y, Peng HR, et al. Gene therapy and tissue engineering for sports medicine. *J Gene Med.* 2003;5:93–108.
7. Alonso JM. Methods to increase the delivery of oxygen. *New Stud Athl.* 2004;19:33–43.
8. Gaudard A, Varlet-Marie E, Bressolle F, et al. Drugs for increasing oxygen transport and their potential use in doping. *Sports Med.* 2003;33:187–212.
9. Rivera MA, Perusse L, Simoneau JA, et al. Linkage between a muscle specific creatine kinase gene polymorphism and VO₂ max in the HERITAGE Family study. *Med Sci Sports Exerc.* 1999;31:698–701.
10. Wolfarth B, Rivera MA, Oppert IM, et al. A polymorphism in the alpha2a-adrenoceptor gene and endurance athlete status. *Med Sci Sports Exerc.* 2000;32:1709–12.
11. Bray MS, Hagberg JM, Pe´russe L, et al. The human gene map for performance and health related fitness phenotypes. The 2006–2007 update. *Med Sci Sports Exerc.* 2009;41:34–72.
12. Rankinen T, Roth SM, Bray SM, et al. Advances in exercise, fitness and performance genomics. *Med Sci Sports Exerc.* 2010;42:835–46.
13. Ahmetov II, Mozhayskaya IA, Flavell DM, et al. PPAR-alfa gene variation and physical performance in Russian athletes. *Eur J Appl Physiol.* 2006;97:103–8.
14. Fischetto G. New trends in gene doping. *New Stud Athl.* 2005;20:41–9.
15. Miah A. Genetics, bioethics and sport. *Sport Ethics Philos.* 2007;2:146–58.
16. The Stockholm Declaration (2005). <http://www.wada-ama.org/en/Science-Medicine/Scientific-Events/Stockholm-Symposium-Agenda-and-Presentation-2005/Stockholm-Declaration/>. Accessed 30 June 2013.
17. Yang N, Mac Arthur DG, Gulbin JP, et al. ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance. *Am J Hum Genet.* 2003;73:627–31.
18. Lucia A, Oliván J, Gómez Gallego F, et al. Citius and longius (faster and longer) with no alpha-actinin-3 in skeletal muscles? *Br J Sports Med.* 2007;41:616–7.
19. Miah A, Rich E. Genetic test for ability? Talent identification and the value of an open future. *Sport Educ Soc.* 2006;11:259–73.
20. McNamee MJ, Muller A, van Hilvoorde I, et al. Genetic testing and sports medicine ethics. *Sports Med.* 2009;39:339–44.
21. Corrado D, Drezner J, Basso C, et al. Strategies for the prevention of sudden cardiac death during sports. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2011;18:197–208.
22. Pigozzi F, Rizzo M. Sudden death in competitive athletes. *Clin Sports Med.* 2008;17:153–81.
23. Maron BJ. Sudden death in young athletes. *N Engl J Med.* 2003;11:1064–75.
24. Garratt CJ. Clinical indications for genetic testing in familial sudden cardiac death syndromes. *Heart.* 2008;94:502–7.
25. Sweeney HL. Gene doping. *Sci Am.* 2004;291:63–9.
26. Montgomery HE, Marshall R, Hemingway H, et al. Human gene for physical performance. *Nature.* 1998;393:221–2.
27. Puthuchery Z, Skipworth JRA, Rawal J, et al. Genetic influence in sport and physical performance. *Sports Med.* 2011;41:845–59.
28. Verma IM. Doping, gene transfer and sport. *Mol Ther.* 2004;10:405.
29. Gaffney GR, Parisotto R. Gene doping: a review of performance-enhancing genetics. *Pediatr Clin N Am.* 2007;54:807–22.

30. Pincock S. Feature: gene doping. *Lancet*. 2005;366(Suppl 1):18–9.
31. Lippi G, Guidi GC. Gene manipulation and improvement of athletic performance: new strategies in blood doping. *Br J Sports Med*. 2004;38:641.
32. Azzazy HME, Mansour MMH, Christenson RH. Gene doping: of mice and men. *Clin Biochem*. 2009;12:435–41.
33. Azzazy HME, Mansour MMH, Christenson RH. Doping in the recombinant era: strategies and counterstrategies. *Clin Biochem*. 2005;38:959–65.
34. Brill-Almon E, Pearlman A, Stern B, et al. Biopump: a novel approach to gene-mediated protein production and delivery with application for erythropoietin treatment of anemia. *Mol Ther*. 2004;9:S352–3.
35. Novel sustained delivery of erythropoietin in hemodialysis patients for safer anemia control using EPODURE™ Biopumps—autologous dermal tissue samples secreting erythropoietin. Poster presented at the American Society of Nephrology’s Kidney Week 2012, San Diego.
36. Wang W, Li W, Ma N, et al. Non-viral gene delivery methods. *Curr Pharm Biotechnol*. 2013;14:46–60.
37. Sinn PL, Sauter SL, McCray PB Jr. Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors—design, biosafety, and production. *Gene Ther*. 2005;12:1089–98.
38. Jafari M, Soltani M, Naahidi S, et al. Nonviral approach for targeted nucleic acid delivery. *Curr Med Chem*. 2012;19:197–208.
39. Friedman T, Rabin O, Frankel MS. Gene doping and sport. *Science*. 2010;327:647–8.
40. McCrory P. Super athletes or gene cheats? *Br J Sports Med*. 2003;37:192–3.
41. Wells DJ. Gene doping: the hype and the reality. *Br J Pharmacol*. 2008;154:623–31.
42. Longmore GD. Erythropoietin receptor mutations and Olympic glory. *Nat Genet*. 1993;4:108–10.
43. de la Chapelle A, Sistonen P, Lehtvaslaiho H, et al. Familial erythrocytosis genetically linked to erythropoietin receptor gene. *Lancet*. 1993;341:82–4.
44. Juvonen E, Ikkala E, Fyhrquist F, et al. Autosomal dominant erythrocytosis caused by increased sensitivity to erythropoietin. *Blood*. 1991;78:3066–9.
45. Sergeeva A, Gordeuk VR, Tokarev YN, et al. Congenital polycythemia in Chuvashia. *Blood*. 1997;6:2148–54.
46. Ang SO, Chen H, Hirota K, et al. Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia. *Nat Genet*. 2002;32:614–21.
47. Scott LM, Tong W, Levine RL, et al. JAK2 Exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007;356:459–68.
48. Diamanti-Kandarakis E, Konstantinopoulos PA, Papailiou J, et al. Erythropoietin abuse and erythropoietin gene doping. Detection strategies in the genomic era. *Sports Med*. 2005;35:831–40.
49. Lasne F, de Ceaurriz J. Recombinant erythropoietin in urine. *Nature*. 2000;405:635.
50. Wilber RL. Detection of DNA-recombinant human epoetin-alfa as a pharmacological ergogenic aid. *Sports Med*. 2002;32:125–42.
51. Lamon S, Robinson N, Mangin P, et al. Detection window of darbepoetin-alpha following one single subcutaneous injection. *Clin Chim Acta*. 2007;379:145–9.
52. Van Maerken T, Dhondt A, Delanghe JR. A rapid and simple assay to determine pegylated erythropoietin in human serum. *J Appl Physiol*. 2010;108:800–3.

53. Leuenberger N, Saugy J, Mortensen RB, et al. Methods for detection and confirmation of Hematide™/peginesatide in antidoping samples. *Forensic Sci Int.* 2011;213:15–9.
54. Lasne F, Martin L, Crepin N. Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal Biochem.* 2002;311:119–26.
55. Lasne F, Thioulouse J, Martin L, et al. Detection of recombinant erythropoietin in urine for doping analysis: interpretation of isoelectric profiles by discriminant analysis. *Electrophoresis.* 2007;28:1875–81.
56. Lasne F, Martin L, Martin JA, et al. Detection of continuous erythropoietin receptor activator in blood and urine in antidoping controls. *Haematologica.* 2009;94:888–90.
57. Svensson E, Black HB, Dugger DLI, et al. Long term erythropoietin expression in rodent and non human primates following intramuscular injection of a replication defective adenoviral vector. *Hum Gene Ther.* 1997;8:1797–806.
58. Zhou S, Murphy JE, Escobedo JA, et al. Adeno-associated virus mediated delivery of erythropoietin leads to sustained elevation of haematocrit in non human primates. *Gene Ther.* 1998;5:665–70.
59. Bohl D, Salvetti A, Moullier P, et al. Control of erythropoietin delivery by doxycycline in mice after intramuscular injection of adeno-associated vector. *Blood.* 1998;98:594–6.
60. Sommer B, Rinsch C, Payen E, et al. Long term doxycycline regulated secretion of erythropoietin by encapsulated myoblasts. *Mol Ther.* 2002;6:155–61.
61. Bernhardt WM, Wiesener M, Scigalla P, et al. Inhibition of prolyl hydroxylases increases erythropoietin production in ESRD. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21:2151–6.
62. Hedley BD, Allan AL, Xenocostas A. The role of erythropoietin and erythropoiesis-stimulating agents in tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2011;17:6373–80.
63. Bunn HF. New agents that stimulate erythropoiesis. *Blood.* 2007;109:868–73.
64. Prchal JT. Delivery on demand. A new era of gene therapy? *N Engl J Med.* 2003;348:1282–3.
65. Binley K, Iqbal S, Spearman H, et al. Long-term reversal of chronic anemia using a hypoxia-regulated erythropoietin gene therapy. *Blood.* 2002;100:2406–13.
66. Tenenbaum L, Lehtonen E, Monahan PE. Evaluation of risks related to the use of adeno-associated virus based vectors. *Curr Gene Ther.* 2003;3:545–65.
67. Chenuaud P, Larcher T, Rabinowitz JE, et al. Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy. *Blood.* 2004;103:3303–4.
68. Gao G, Lebherz C, Weiner DJ, et al. Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques. *Blood.* 2004;103:3300–2.
69. Lasne F, Martin L, de Ceaurriz J, et al. “Genetic doping” with erythropoietin cDNA in primate muscle is detectable. *Mol Ther.* 2004;10:409–10.
70. Sottas PE, Robinson N, Rabin O, et al. The athlete biological passport. *Clin Chem.* 2011;67:969–76.
71. Segura J, Ventura R, Pascual JA. Current strategic approaches for the detection of blood doping practices. *Forensic Sci Intern.* 2011;213:42–8.
72. Sottas PE, Robinson N, Saugy M, et al. A forensic approach to the interpretation of blood doping markers. *Law Probab Risk.* 2008;7:191–210.
73. Sottas PE, Robinson N, Fischetto G, et al. Prevalence of blood doping in samples collected from elite track and field athletes. *Clin Chem.* 2011;57:762–9.

74. Pascual JA, Belalcazar V, de Bolos C, et al. Recombinant erythropoietin and analogues: a challenge for doping control. *Ther Drug Monit.* 2004;26:175–9.
75. Sharpe K, Ashenden MJ, Schumacher YO. A third generation approach to detect erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica.* 2006;91:356–63.
76. Liang H, Ward WF. PGC-1 alpha. A key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ.* 2006;30:145–51.
77. Spedding M, Spedding C. Drugs in sport: a scientist-athlete's perspective: from ambition to neurochemistry. *Br J Pharmacol.* 2008;154:496–501.
78. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1a. *Cell.* 2006;127:1109–22.
79. Hwang JT, Kwon DY, Park OJ, et al. Resveratrol protects ROS induced cell death by activating AMPK in H9c2 cardiac muscle cells. *Genes Nutr.* 2008;2:323–6.
80. Unqvist Z, Sonntag WE, de Cabo R, et al. Mitochondrial protection by resveratrol. *Exerc Sport Sci Rev.* 2011;39:128–32.
81. Wang YX, Zhang CL, Yu RT, et al. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol.* 2004;2:e294.
82. Kramer DK, Ahlsen M, Norrbom J, et al. Human skeletal muscle fibre type variations correlate with PPARalpha, PPARdelta and PGC-1^{alpha} mRNA. *Acta Physiol (Oxf).* 2006;188:207–16.
83. Narkar VA, Downes M, Yu RT, et al. AMPK and PPAR-d agonists are exercise mimetics. *Cell.* 2008;134:405–15.
84. Wang YX, Lee CH, Tjep S, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell.* 2003;113:159–79.
85. Shailendra G, Ramandeep R, Ehtishamul H, et al. AICAR inhibits adipocyte differentiation in 3T3L1 and restores metabolic alterations in diet-induced obesity mice model. *Nutr Metab.* 2006;3:31.
86. Baar K, Hardie DG. Small molecules can have big effects on endurance. *Nat Chem Biol.* 2008;10:583–4.
87. Goodyear LJ. The exercise pill; too good to be true? *N Engl J Med.* 2008;359:1842–4.
88. Richter EA, Kiens B, Wojtaszewski JFP. Can exercise mimetics substitute for exercise? *Cell Metab.* 2008;2:96–8.
89. Puthuchery Z, Skipworth JRA, Rawal J, et al. The ACE gene and human performance 12 years on. *Sports Med.* 2011;41:433–48.
90. Wang P, Fedoruk MN, Rupert JL. Keeping pace with ACE. Are ACE inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists potential doping agents? *Sports Med.* 2008;38:1065–79.
91. Vaughan D, Huber-Abel FA, Graber F, et al. The angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism alters the response of muscle energy supply lines to exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2013 (Epub 2013 Feb 9).
92. Sanchis-Gomar F, Lippi G. Telmisartan as metabolic modulator: a new perspective in sport doping? *J Strength Condit Res.* 2012;26:608–10.
93. Machida SM, Booth FW. Insulin-growth factor 1 and muscle growth: implication for satellite cell proliferation. *Proc Nutr Soc.* 2004;63:337–40.
94. Barton ER, Morris L, Musaro A, et al. Muscle specific expression of insulin like growth factor 1 counters muscle decline in mdx mice. *J Cell Biol.* 2002;157:137–48.

95. Lee S, Barton ER, Sweeney HL, et al. Viral expression of insulin-like growth factor-1 enhances muscle hypertrophy in resistance trained rats. *J Appl Physiol.* 2004;96:1097–104.
96. Barton-Davis ER, Shoturma DI, Musaro A, et al. Viral mediated expression of insulin-like growth factor 1 blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:15603–7.
97. Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:9306–11.
98. Mc Croskery S, Thomas M, Maxwell L, et al. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self renewal. *J Cell Biol.* 2003;162:1135–47.
99. Joulia-Ekaza D, Cabello G. The myostatin gene: physiology and pharmacological relevance. *Curr Opin Pharmacol.* 2007;7:310–5.
100. Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, et al. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet.* 1997;17:71–4.
101. Kambadur R, Sharma M, Smith TP, et al. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.* 1997;7:910–6.
102. Whittemore LA, Song K, Li X, et al. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;300:965–71.
103. Matsakas PD, Diel P. The growth factor myostatin, a key regulator in skeletal muscle growth and homeostasis. *Int J Sports Med.* 2005;26:83–9.
104. Wagner KR. Muscle regeneration through myostatin inhibition. *Curr Opin Rheumatol.* 2005;17:720–4.
105. Ferrell RE, Conte V, Lawrence EC, et al. Frequent sequence variation in the human myostatin (GDF8) gene as a marker for analysis of muscle related phenotypes. *Genomics.* 1999;62:203–7.
106. Kostek MA, Angelopoulos TJ, Clarkson PM, et al. Myostatin and follistatin polymorphisms interact with muscle phenotypes and ethnicity. *Med Sci Sports Exerc.* 2009;41:1063–71.
107. Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, et al. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med.* 2004;350:2682–8.
108. Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, et al. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature.* 2002;420:418–21.
109. Roberts TC, Andaloussi SE, Morris KV, et al. Small RNA-mediated epigenetic myostatin silencing. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2012;1:e23.
110. Murphy KT, Koopman R, Naim T, et al. Antibody-directed myostatin inhibition in 21-month-old mice reveals novel roles for myostatin signalling in skeletal muscle structure and function. *FASEB J.* 2010;24:4433–42.
111. Fedoruk MN, Rupert JL. Myostatin inhibition: a potential performance enhancement strategy? *Scand J Med Sci Sports.* 2008;18:123.
112. Losordo DW, Vale PR, Symes JF, et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis. Initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF(165) as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation.* 1998;98:2800–4.
113. Rajagopalan S, Mohler ER, Lederman RJ, et al. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomised, double blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation.* 2003;108:1933–8.

114. Yeh JL, Giordano FJ. Gene-based therapeutic angiogenesis. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;15:236–49.
115. Fallahi AA, Ravasi AA, Farhud DD. Genetic doping and health damages. *Iranian J Publ Health.* 2011;1:1–14.
116. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science.* 2000;288:669–72.
117. Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, et al. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med.* 2002;346:1185–93.
118. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest.* 2008;118:3132–42.
119. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab.* 2003;80:148–58.
120. Perry JK, Emerald BS, Mertani HC, et al. The oncogenic potential of growth hormone. *Growth Horm IGF Res.* 2006;16:277–89.
121. Horn S, Gregory P, Guskiewicz KM. Self-reported anabolicandrogenic steroids use and musculoskeletal injuries: findings from the center for the study of retired athletes health survey of retired NFL players. *Am J Phys Med Rehabil.* 2009;88:192–200.
122. Haisma HJ, de Hon O. Gene doping. *Int J Sports Med.* 2006;27:257–66.
123. Schneider AJ, Friedmann T. Gene doping in sports: the science and ethics of genetically modified athletes. *Adv Genet.* 2006;51:1–110.
124. Baoutina A, Alexander IE, Rasko JE, et al. Developing strategies for detection of gene doping. *J Gene Med.* 2008;10:3–20.
125. Ni W, Le Guiner C, Gernoux G, et al. Longevity of rAAV vector and plasmid DNA in blood after intramuscular injection in nonhuman primates: implications for gene doping. *Gene Ther.* 2011;18:709–18.
126. Ni W, Le Guiner C, Moullier P, et al. Development and utility of an internal threshold control (ITC) real-time PCR assay for exogenous DNA detection. *PLoS One.* 2012;7(5):e36461.
127. Beiter T, Zimmermann M, Fragasso A, et al. Direct and longterm detection of gene doping in conventional blood samples. *Gene Ther.* 2011;18:225–31.
128. Baoutina A, Coldham T, Bains GS, et al. Gene doping detection: evaluation of approach for direct detection of gene transfer using erythropoietin. *Gene Ther.* 2010;17:1022–32.
129. Min JJ, Gambhir SS. Gene therapy progress and prospects: noninvasive imaging of gene therapy in living subjects. *Gene Ther.* 2004;11:115–25.
130. Segura J, Fillat C, Andreu D, et al. Monitoring gene therapy by external imaging of mRNA: pilot study on murine erythropoietin. *Ther Drug Monit.* 2007;29:612–8.
131. Thevis M, Thomas A, Kohler M, et al. Emerging drugs: mechanism of action, mass spectrometry and doping control analysis. *J Mass Spectrom.* 2009;44:442–60.
132. Thevis M, Beuck S, Thomas A, et al. Doping control analysis of emerging drugs in human plasma—identification of GW501516, S-107, JTV-519, and S-40503. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2009;23:1139.

133. Thevis M, Mo'ller I, Thomas A, et al. Characterization of two major urinary metabolites of the PPARdelta-agonist GW1516 and implementation of the drug in routine doping controls. *Anal Bioanal Chem.* 2010;396:2479–91.
134. Sobolevsky T, Dikunets M, Sukhanova I, et al. Detection of PPARd agonists GW1516 and GW0742 and their metabolites in human urine. *Drug Test Anal.* 2012;4:754–60.
135. Thomas A, Beuck S, Eickhoff JC, et al. Quantification of urinary AICAR concentrations as a matter of doping controls. *Anal Bioanal Chem.* 2010;396:2899–908.
136. Thevis M, Geyer H, Thomas A, et al. Trafficking of drug candidates relevant for sports drug testing: detection of nonapproved therapeutics categorized as anabolic and gene doping agents in products distributed via the internet. *Drug Test Anal.* 2011;3:331–6.
137. Murray TH. Sport enhancement. In: Mary C, editor. *From birth to death and bench to clinic: the Hastings Center bioethics briefing book.* Garrison: The Hastings Center; 2008. p. 153–8
138. Bocher V, Pienda-Torra I, Fruchart J-C, Staels B. PPARs: transcription factors controlling lipid and lipoprotein metabolism. *Ann NY Acad Sci.* 2002;967:7–18.
139. Maciejewska A, Sawczuk M, Cieszczyk P. Variation in the PPAR α gene in Polish rowers. *J Sci Med Sport.* 2011;14(1):58–64.
140. Kramer DK, Ahlsen M, Norrbom J, Jansson E, Hjeltnes N, Gustafsson T, Krook A. Human skeletal muscle fibre type variations correlate with PPAR α , PPAR δ and PGC-1 α mRNA. *Acta Physiol (Oxf)* 2007;189(1):207–16.
141. Grimaldi PA. Regulatory role of peroxisome proliferators-activated receptor delta (PPARd) in muscle metabolism: a new target for metabolic syndrome treatment? *Biochimie.* 2005;87(1):5–8.
142. Haisma HL, De Hon O, Sollie P, Vorstenbosch J. Genetic doping. 2004 Netherlands Centre for Doping Affairs.
143. Stephen DR Harridge, Cristiana P Velloso. IGF-I and GH: Potential use in gene doping. *Growth Horm IGF Res.* 2009;19:378–82.
144. Heydemann A, Doherty KR, McNally EM. Genetic modifiers of muscular dystrophy: Implications for therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772:216–28.
145. Trojan J, Johnson TR, Rudin SD, Ilan Ju, Tykocinski ML, Ilan J. Treatment and prevention of rat glioblastoma by immunogenic C6 cells expressing antisense insulin-like growth factor I RNA. *Science.* 1993;259:94–97.
146. Zumkeller W. IGFs and IGF-binding proteins as diagnostic markers and biological modulators in brain tumors. *Expert Rev Mol Diagn.* 2002;2:473–77.
147. Yu H, Robin T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:1472–89.
148. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta super family member. *Nature.* 1997;387:83–90.
149. Döring F, Onur S, Fischer A, et al. A common haplotype and the Pro582Ser polymorphism of the hypoxia-inducible factor-1 (HIF1A) gene in elite endurance athletes. *J Appl Physiol.* 2010;108:1497–1500.
150. Marx J. How cells endure low oxygen. *Science.* 2004;303:1454–56.
151. Neil S, Don M. *Genetics and molecular biology of muscle adaptation.* 1st ed. Churchill Livingstone; Italy: 2006. pp. 185–89.

152. Lippi G, Giuseppe Longo U, Maffulli N. Genetics and sports. *Br Med Bull.* 2010;93:27–47.
153. Scott RA, Irving R, Irwin L, et al. ACTN3 and ACE genotypes in elite Jamaican and US sprinters. *Med Sci Sports Exerc.* 2010;42(1):107–112.
154. Gaffney GR, Parisotto R. Genetic doping: A Review of Performance-Enhancing Genetics Pediatric. *Clin N Am.* 2007;54:807–22.
155. Lee JS, Feldman AM. Gene therapy for therapeutic myocardial angiogenesis. A promising synthesis of two emerging technologies. *Nature Med.* 1998;4:739–742.
156. Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest.* 1999;9:1231–36. [\[PMC free article\]](#)
157. Paavonen EBK, Ristimaki A, Kumar V, Gunji Y, Klefstrom J, Kivinen L, et al. Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factor, oncoprotein, and hypoxia. *Oncogene.* 1997;14:2475–83.
158. Payne J, Montgomery H. Angiotensin-converting enzyme and human physical performance. *Equine and Comp Exerc Physiol.* 2004;1:255–60.
159. Thompson J, Raitt J, Hutchings L, Drenos F, Bjargo E, Loset A, Grocott M, Montgomery H. Angiotensin-Converting Enzyme Genotype and Successful Ascent to Extreme High Altitude. *High Alt Med Biol.* 2007;8(4):278–85.
160. Gayagay G, Yu B, Hambly B, Boston T, Hahn A, Celermajer DS, Trent RJ. Elite endurance athletes and the ACE I allele-the role of genes in athletic performance. *Hum Genet.* 1998;103:48–50.
161. Woods D, Hickman M, Jamshidi Y, Brull D, Vassiliou V, Jones A, Humphries S, Montgomery H. Elite swimmers and the Allele of the ACE I/D polymorphism. *Hum Genet.* 2001;108:230–32.
162. Hernandez D, de la Rosa A, Barragan A, Barrios Y, Salido E, Torres A, Martin B, Laynez I, Duque A, De Vera A, Lorenzo V, Gonzalez A. The ACE/DD genotype is associated with the extent of exercise-induced left ventricular growth in endurance athletes. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:527–32.
163. Busquets S, Figueras M, Almendro V, López-Soriano FJ, Argilés M. Interleukin-15 increases glucose uptake in skeletal muscle. An antidiabetogenic effect of the cytokine. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1760(11):1613–17.
164. Martinek V, Freddie H, Huard J. Gene Therapy and Tissue Engineering in Sports Medicine. *J Gene Med.* 2003;5:93–108.
165. Hakimi P, Yang J, Casadesus G, Massillon D, Tolentino-Silva F, Nye CK, et al. Overexpression of the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in skeletal muscle repatterns energy metabolism in the mouse. *J Biol Chem.* 2007;282:32844–55.
- 166- Hakimi P, Yang J, Casadesus G, Massillon D, Tolentino-Silva F, Nye CK, et al. Overexpression of the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in skeletal muscle repatterns energy metabolism in the mouse. *J Biol Chem.* 2007;282:32844–55.

Recibido: 26 de enero de 2014

Aprobado: 26 de abril de 2014