

# ESTABLECIMIENTO DE LAS CAPACIDADES TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DEL DOPING EN EL DEPORTE MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Keyler Andres Jaramillo-Hoyos, Laura Melina Mesa-Gaviria, Sebastián Espinosa-Arango, Rafael Mariano Álvarez-Quintero ralvarezq@ces.edu.co

## Resumen

El doping es la utilización de sustancias que aumenta el rendimiento en el deportista, hace que sea una práctica prohibida por organizaciones deportivas como el COI (Comité Olímpico Internacional) y la AMA (Asociación Mundial Antidopaje); las cuales buscan establecer reglamentos y criterios clínicos relevantes que se deben cumplir para reducir en lo más mínimo posible el fraude por dopaje. Generalmente la detección del doping se realiza en muestras de orina o sangre, pero el doping ha sofisticado cada vez más, pues ya se utilizan sustancias enmascarantes que dificulta la detección de estas, por lo que hace que la tecnología implementada para la detección queden en desventaja; por lo tanto para este estudio se implementó la resonancia magnética nuclear (RMN), la cual es una técnica conocida por su capacidad de generar resultados rápidos y certeros, así mismo se puede utilizar en casi todas las matrices humanas donde también proporciona información útil de todas las sustancias contenidas en una muestra y posiblemente sobre las formas de enmascaramiento de doping. En este estudio se establecieron condiciones analíticas para la detección y cuantificación de metabolitos tras el consumo del diurético Indapamida, incluido en la lista de sustancias prohibidas por la Agencia Mundial Antidopaje (AMA). Se procedió al análisis de muestras de orina (placebo, orina enriquecida con Indapamida y positivo tras el consumo a niveles terapéuticos) con el fin de obtener evidencias de la sustancia mediante el uso de un espectrómetro RMN de 600 MHz, de esta manera se evaluaron los atributos como linealidad, precisión y límites de detección y cuantificación. Se observó que la RMN es una tecnología idónea para este fin, pues demostró ser un método robusto que permite la cuantificación de indapamida a niveles de eficacia diurética.

**Palabras clave:** Doping, Sustancia enmascarante, Resonancia Magnética Nuclear, AMA (WADA).

## **Abstract**

Doping is the use of substances that increase performance in the athlete, making it a practice prohibited by sports organizations such as the IOC (International Olympic Committee) and WADA (World Anti-Doping Association); they seek to establish relevant regulations and clinical criteria that must be met to reduce doping fraud as little as possible. Generally, the detection of doping is performed on urine or blood samples, but doping has become increasingly sophisticated, since masking substances are already used that make it difficult to detect them, which means that the technology implemented for detection is at a disadvantage; therefore for this study, nuclear magnetic resonance (NMR) was implemented, which is a technique known for its ability to generate rapid and accurate results, and can also be used in almost all human matrices, where it also provides useful information on all substances contained in a sample and possibly on forms of doping masking. In this study, analytical conditions were established for the detection and quantification of metabolites after the consumption of the diuretic indapamide, included in the list of prohibited substances by the World Anti-Doping Agency (WADA). Urine samples (placebo, indapamide-enriched urine and positive after consumption at therapeutic levels) were analyzed in order to obtain evidence of the substance using a 600 MHz NMR spectrometer, thus evaluating the attributes such as linearity, precision and limits of detection and quantification. NMR was found to be an ideal technology for this purpose, as it proved to be a robust method that allows quantification of indapamide at levels of diuretic efficacy.

**Keywords:** Doping, Masking substance, Nuclear Magnetic Resonance, AMA (WADA).

## Introducción

El dopaje o doping es una táctica utilizada por los deportistas profesionales con el fin de aumentar el rendimiento físico, esto consiste en la administración de sustancias prohibidas o métodos prohibidos. Hay diferentes tipos de sustancias y métodos que aplican para el doping que causan diversos efectos en los deportistas (1). Las sustancias pueden describirse en tres grupos: sustancias nocivas, pero de venta legal, en este caso son sustancias prescritas medicamente; sustancias nocivas y estrictamente ilegales como lo son la cocaína; sustancias legales e inofensivas como diuréticos que están prohibidos por el Comité Olímpico Internacional (COI y la AMA (Asociación Mundial Antidopaje) (2) (3), estas agencias tiene a disposición diferentes tecnologías que permite detectar dichas sustancias.

Las sustancias dopantes han evolucionado desde su aparición, normalmente el doping se detecta en sangre y orina, sin embargo el dopaje se ha perfeccionado con el uso de nuevas sustancias o metabolitos que dificultan su detección (3), por lo tanto, es un reto para la ciencia analítica y para las autoridades que ejercen vigilancia y control del mismo. Actualmente los diuréticos son uno de los medicamentos más utilizados por los atletas por su capacidad enmascarente, pues su administración reduce la concentración de otras sustancias dopantes y sus metabolitos en la orina debido a un aumento en el volumen de excreción de líquido, ocasionan que su detección sea más compleja (4). Cabe resaltar que los atletas pueden utilizar los diuréticos en una sola dosis antes de las competencias pues algunos de estos medicamentos como la hidroclorotiazida reduce su tiempo de vida media con tan sola una hora de ejercicio intenso, disminuyendo no solo la concentración de otros agentes dopantes sino también la propia (5). Por lo tanto estas sustancias pueden no ser detectadas en muestras tomadas al finalizar las competencias.

Los laboratorios antidopaje han buscado todas las herramientas disponibles para tener control sobre las sustancias utilizadas para aumentar el rendimiento físico y aquellas que permiten su enmascaramiento (6). La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS) es la técnica con mayor aplicación pues permite la separación y elucidación de cada uno de los componentes en muestras que pueden estar a una concentración mínima de detección, su grado de sensibilización es muy alta y tiene

diversas características que le confiere la capacidad de diferenciar cada sustancia y realizar un reconocimiento amplio de estas (7). Aunque la técnica sea actualmente la que mayor confianza genera en el estudio de las sustancias dopantes no hay método inequívoco para la detección del dopaje en todas sus modalidades, es por eso que se ha hecho el intento de utilizar técnicas nuevas para detección de estas sustancias (8) (9).

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica analítica constituida por un amplio y reconocido espectro de aplicaciones en el campo del análisis estructural. La selectividad y la reproducibilidad de los métodos de RMN resulta superior a la de prácticas usuales (10), esta tiene la capacidad de cuantificar varios escenarios con resultados confiables a diferencia de otras técnicas que no alcanzan una adecuada separación y en consecuencia arrojan una notable variabilidad en sus resultados. La RMN puede proporcionar información valiosa cuantitativa a nivel molecular, en relación con el análisis de mezclas complejas (estudios in vitro), sistemas biológicos perfundidos (células u órganos) y finalmente los sistemas vivos intactos (estudios in vivo) (11) (12).

Así mismo, la resonancia magnética nuclear (RMN) genera resultados rápidos y certeros y ha incrementado en los últimos años avances tecnológicos que le permite ser más sensible y desarrollar aplicaciones multidimensionales para las muestras, en casi todas las matrices humanas, proporcionando información útil de todas las sustancias contenidas en la muestra y posiblemente sobre las formas de enmascaramiento de doping (13) (14).

## **Materiales y Métodos**

- **Agentes químicos**

El centro de la ciencia y la investigación farmacéutica – CECIF (Sabaneta, Colombia) proporcionó estándar de Indapamida (API: 99,4%). El hidróxido de sodio se adquirió de Merck KGaA (Darmstadt, Germany); los reactivos deuterados como óxido de deuterio (D<sub>2</sub>O) (S5716966 628) se adquirió de Merck KGaA (Darmstadt, Germany) y ácido trimetilsililpropanoico (TSP) se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.); y los tubos de resonancia (032817A) se adquirió de Wilmad-LabGlass (EE.UU).

- **Preparación de soluciones**

**Solución madre de Indapamida:** Se pesaron 2.05 mg de estándar y se disolvió en 1 mL de solución NaOH-D<sub>2</sub>O al 0.025N. Se tomó 600 µL del estándar y se llevó a un tubo de RMN.

**Curva de calibración Indapamida:** Se obtuvieron 5 soluciones a concentración decreciente a partir de una solución intermedia de la solución madre a una concentración de 60 µg/mL. Ésta se preparó tomando 30 µL de la solución madre, se le adicionó 100 µL de D<sub>2</sub>O y 870 µL de orina placebo.

Las 5 soluciones a concentración decreciente se encontraban a 1.8, 1.2, 1.02, 0.84 y 0.54 µg/mL, estas se prepararon tomando 30, 20, 17, 14 y 9 µL de la solución intermedia y se llevaron a un volumen total de 600 µL con orina placebo. Cada solución se depositó en tubo de RMN.

**Solución Limite de cuantificación (LOQ):** Se tomó 400 µL de la solución al 0.54 µg/mL y se le adicionó 500 µL de orina placebo y 100 µL de D<sub>2</sub>O, obteniéndose una solución a una concentración de 0.216 µg/mL; se tomó 600 µL de la solución y se llevó a un tubo de RMN.

**Solución Limite de detención (LOD):** Se tomó 400 µL de la solución LOQ, se le adicionó 500 µL de orina placebo y 100 µL de D<sub>2</sub>O, obteniéndose una solución a una concentración de 0.0864 µg/mL; se tomó 600 µL de la solución y se llevó a un tubo de RMN.

**Orina placebo y orina enriquecida:** Se tomó una muestra de orina suministrada por un hombre joven completamente sano y se prepararon dos soluciones; orina placebo y otra enriquecida con Indapamida. La primera se preparó tomando 500 µL de la orina y se le adicionó 100 µL de D<sub>2</sub>O. La segunda se preparó tomando 300 µL de orina y se le adicionó 300 µL de la solución madre de Indapamida. Ambas soluciones se llevaron a tubos de RMN.

**Orina problema:** Se tomó una muestra de orina suministrada por una mujer bajo tratamiento con Indapamida y se preparó una solución que contenía 500 µL de la orina y adicionó 100 µL de D<sub>2</sub>O. La solución se llevó a tubo de RMN.

**Estándar Interno:** Se pesó 1.01 mg de TSP y se disolvió en 100 mL de D<sub>2</sub>O, obteniéndose una solución 0.01 %P/V. Se tomó 600 µL de la solución y se dividieron en volúmenes de 50 µL quedando una concentración 0.72 µg/ µL. Los 50 µL se adicionaron a las soluciones anteriormente descritas.

- **Adquisición de espectros RMN**

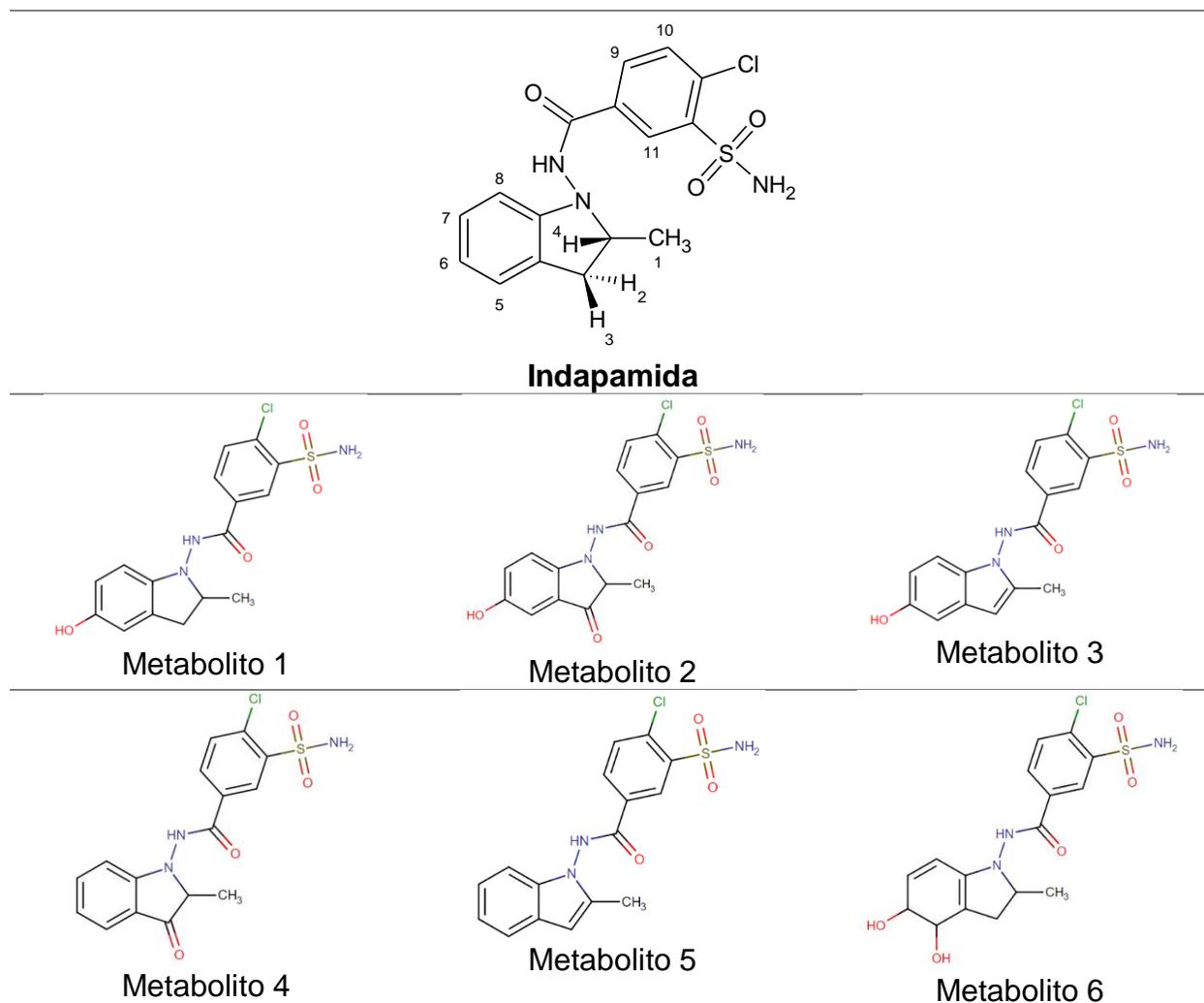
Los datos de RMN se midieron usando un espectrómetro RMN Bruker Avance III HD 600 MHz, equipado con una criosonda (Bruker Prodigy TCI 600 S3 H & F-C/N-D-05 Z) y un cambiador de muestras SampleJet refrigerado automáticamente. El instrumento estuvo operando de la siguiente manera para la adquisición unidimensional <sup>1</sup>H de las señales en las muestras, programa de pulso noesygppr1d con supresión de la señal de agua, número de escaneos: 16, ancho de barrido: 21.0297 ppm, tiempo de adquisición: 3.2440 s, retraso de relajación: 2.5 s, ganancia del receptor: 57, tiempo de permanencia: 39.600 µsec, ampliación de línea: 0.3 Hz, temperatura: 295 K.

A cada una de las soluciones se le tomaron espectros con un número total de repeticiones congruentes para el análisis estadístico de las mismas. Siendo así, todas las soluciones con excepción de la muestra de orina enriquecida con Indapamida fueron obtenidas a través de 3 repeticiones cada una. La muestra enriquecida se le tomaron 7 espectros con el fin de determinar la identificación inequívoca de la Indapamida en una muestra de orina.

## **Resultados y Discusión**

La Indapamida está clasificada químicamente como diurético tipo tiazida, a nivel clínico tiene potentes efectos en la reducción de la presión sanguínea y la eliminación de líquidos; siendo esta segunda propiedad la que deportistas desleales utilizan con el fin de generar un enmascaramiento de otras sustancias dopantes, disminuyendo la concentración de estos al eliminarlos en la orina. La Indapamida es una sustancia absorbida rápidamente en el tracto gastrointestinal, consiguiendo concentraciones plasmáticas máximas en 1-2 horas después de su administración; se caracteriza por sufrir un amplio metabolismo lográndose recuperar como fármaco inalterado tan solo un 7% de la concentración total (15).

El metabolismo por el cual pasan los fármacos dificulta su identificación en las muestras de orina, por lo tanto se hace importante conocer los procesos de transformación de las sustancias, teniendo un reconocimiento de sus principales metabolitos. Siendo esto así, se procedió a realizar una búsqueda a través de base de datos con el fin de hacer un reconocimiento de estas sustancias del metabolismo de la Indapamida. La figura 1 muestra cada uno de los 6 metabolitos identificados de este diurético, allí se logra observar cada una de las transformaciones de la Indapamida diferenciando los cambios estructurales con respecto a la misma.



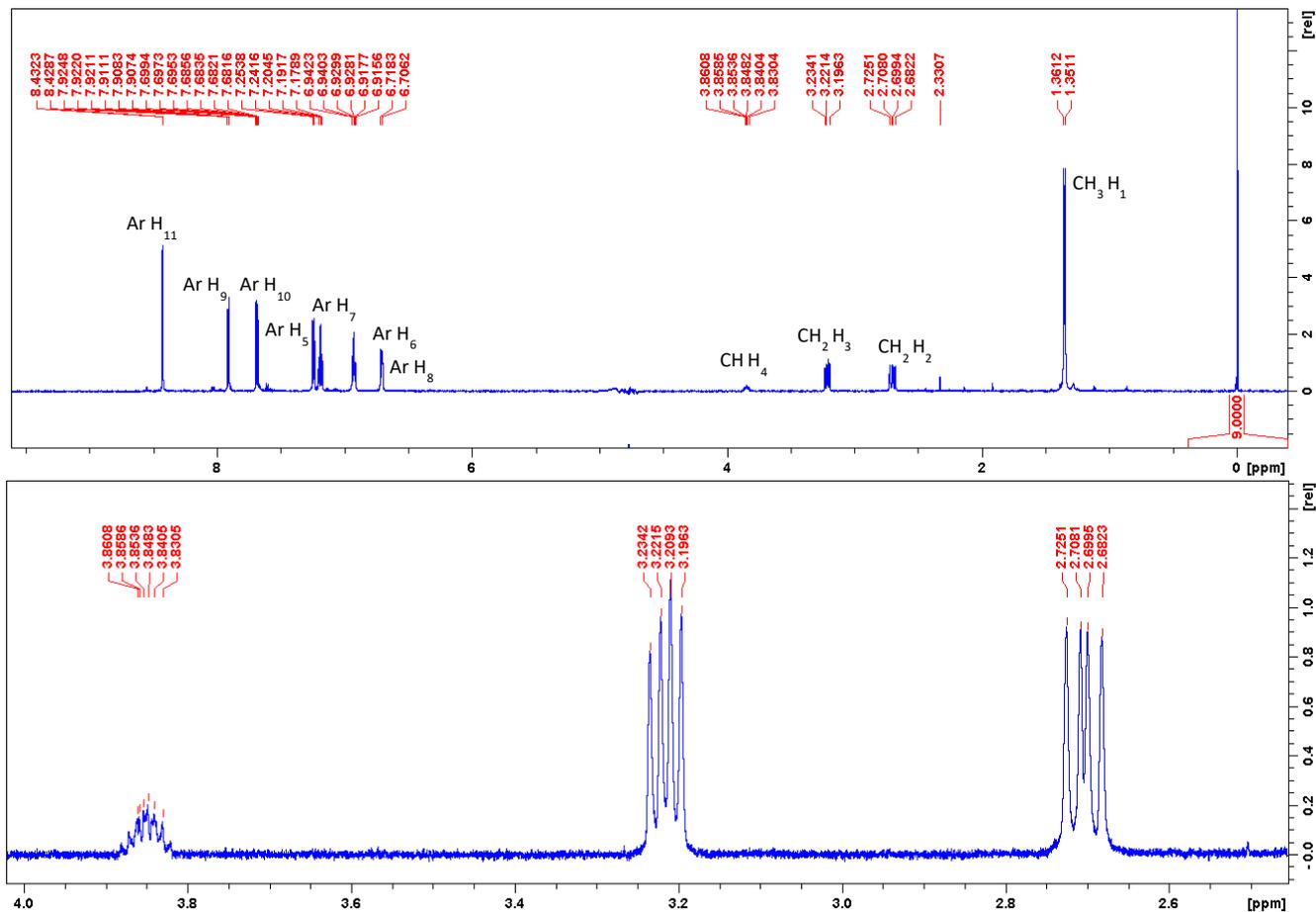
**Figura 1.** Identificación de posiciones de referencia espectral. Indapamida y sus metabolitos presentes en muestras de orina humana tras consumo del fármaco.

El conocimiento estructural de la Indapamida y sus metabolitos permitió la realización de una simulación espectral de protón RMN con el fin de entender los cambios espectrales que se pueden sufrir con el metabolismo de la molécula. Los datos arrojados por el simulador (nmrdb.org) están consignados en la Tabla 1. Este modelo permitió seleccionar adecuadamente las señales características que permiten realizar un rastreo de las sustancias para su posterior identificación y cuantificación, siendo seleccionadas en primera instancia las señales 1, 9,10 y 11 puesto que son señales que permanecen estables a pesar de los cambios estructurales de la Indapamida.

Sin embargo, las señales 1 y 11 fueron las adecuadas para la identificación y cuantificación, gracias a la intensidad de las mismas (Figura 2), esto es importante porque este tipo de señales intensas no desaparecen fácilmente del espectro al momento de realizar el análisis de muestras de orina, las cuales se caracterizan por tener otras sustancias de desecho del metabolismo normal del organismo.

**Tabla 1.** Simulación de espectros H1-RMN 600 MHz (nmrdb.org) para Indapamida y sus metabolitos en agua deuterada.

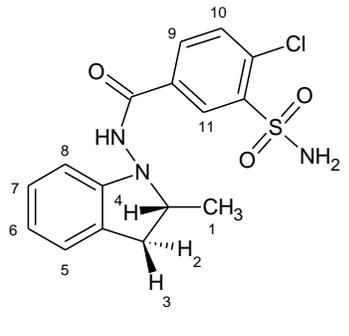
Simulación 1H-NMR 600 MHz							
Posición	Indapamida	M1	M2	M3	M4	M5	M6
1	$\delta=1,091$	$\delta= 1,087$	$\delta= 1,273$	$\delta= 2,386$	$\delta=1,272$	$\delta=2,399$	$\delta=1,06$
2	$\delta=3,084$	$\delta= 3,112$	-	-	-	$\delta=6,45$	$\delta=2,03$
3	$\delta=3,10$	$\delta= 3,143$	-	$\delta= 6,285$	-	-	$\delta=1,799$
4	$\delta=4,06$	$\delta= 4,148$	$\delta= 4,985$	-	$\delta= 5,044$	-	$\delta=4,193$
5	$\delta=6,82$	-	-	-	$\delta= 7,344$	$\delta=7,009$	-
6	$\delta=6,87$	$\delta= 6,937$	$\delta=7,148$	$\delta= 6,941$	$\delta= 7,192$	$\delta=6,879$	$\delta=5,714$
7	$\delta=6,93$	$\delta= 6,613$	$\delta= 6,956$	$\delta= 6,34$	$\delta= 7,677$	$\delta=6,831$	$\delta=5,867$
8	$\delta=7,09$	$\delta= 6,626$	$\delta= 7,505$	$\delta= 6,703$	$\delta= 7,526$	$\delta=7,32$	$\delta=4,052$
9	$\delta=7,802$	$\delta= 7,802$	$\delta=7,803$	$\delta= 7,806$	$\delta= 7,803$	$\delta=7,806$	$\delta=7,735$
10	$\delta=7,81$	$\delta= 7,81$	$\delta= 7,81$	$\delta= 7,811$	$\delta= 7,81$	$\delta=7,811$	$\delta=7,81$
11	$\delta=8,66$	$\delta= 8,605$	$\delta= 8,605$	$\delta= 8,606$	$\delta= 8,605$	$\delta=8,606$	$\delta=8,605$



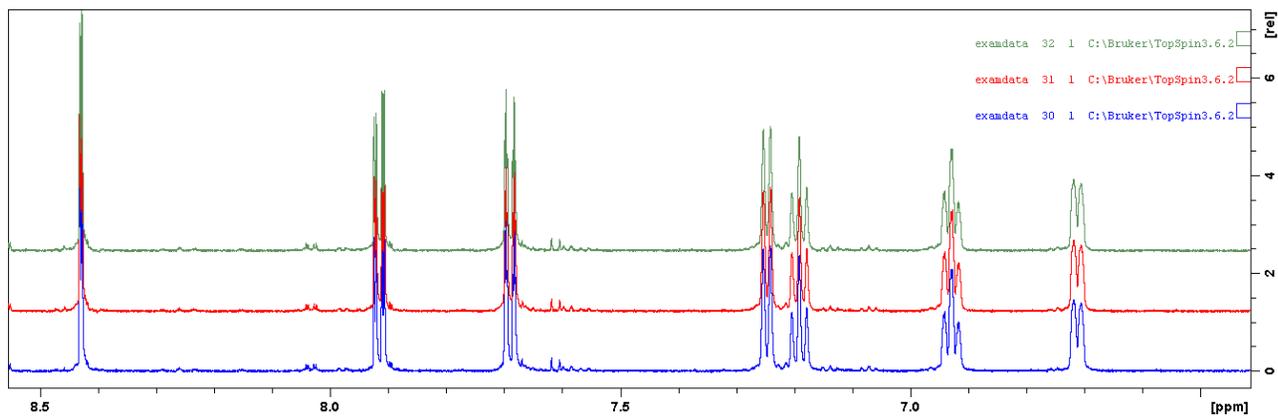
**Figura 2.** Asignación de señales. Espectro H<sup>1</sup>-RMN 600 MHz de Indapamida estándar 2.05 mg/ml en agua deuterada con TSP estándar interno.

Los desplazamientos experimentales de la Indapamida fueron tabulados (Tabla 2) y confrontados versus los valores arrojados por la simulación, la homogeneidad de ambas series de señales fue reproducible y una excelente resolución espectral.

**Tabla 2.** Asignación de señales para Indapamida estándar 2.05 mg/ml en agua deuterada con TSP estándar interno. H1-RMN 600 MHz. Las señales marcadas con asterisco fueron consideradas para RMN de Indapamida (H1) metabolitos (H11).

Estructura Indapamida	Posición	$\delta_h$ (ppm)	Multiplicidad, $J$ (Hz), Nh
	1*	1.36	d, $j = 6.2$ Hz, 3H
	2	2.69	dd, $j = 11.3, 15.4$ Hz, 1H
	3	3.21	dd, $j = 8.2, 15.5$ Hz, 1H
	4	3.85	m, 1H
	5	7.25	d, $j = 7.3$ Hz, 1H
	6	6.92	t, $j = 7.5$ Hz, 1H
	7	7.17	t, $j = 7.7$ Hz, 1H
	8	6.70	d, $j = 7.6$ Hz, 1H
	9	7.92	dd, $j = 8.3, 2.2$ Hz, 1H
	10	7.90	d, $j = 8.3$ Hz, 1H
	11*	8.43	d, $j = 2.1$ Hz, 1H

Un método experimental debe ser lo suficientemente robusto que permita ser realizado las veces necesarias y siempre arroje los mismo resultados sin importar cambios del operador, el día o el mismo equipo. Para esto se realizó un análisis triplicado de la solución madre de Indapamida; los resultados arrojados demuestran la gran reproducibilidad del método, la figura 3 muestra un triplicado para una muestra, allí se observa que cada uno de los espectros son una copia idéntica sobrepuesta, no se generaron diferencias significativas en el desplazamiento y/o intensidad de las señales en las muestras analizadas.



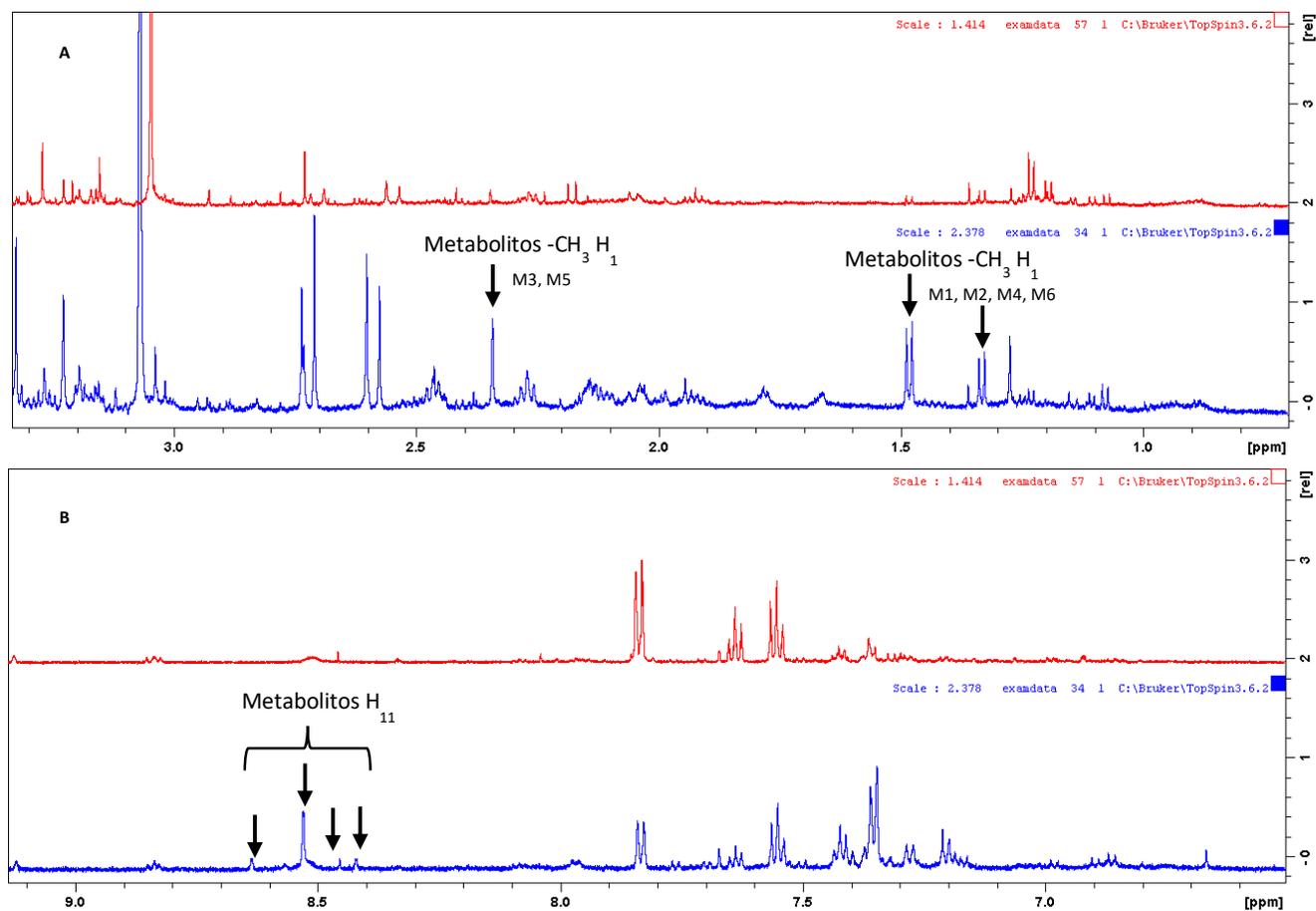
**Figura 3.** Ampliación de la zona de protones aromáticos en el espectro de la Indapamida. Adecuada reproducibilidad y resolución para tres réplicas de indapamida a 2.05 mg/ml en agua deuterada con TSP estándar interno. H1-RMN 600 MHz.

Los resultados del análisis estadístico se muestran en la tabla 3, el método instrumental desarrollado permite la cuantificación de Indapamida en muestras de orina de personas tratadas con el fármaco, el rastreo de señales las especificadas permite la cuantificación de las sustancias sin importar los procesos de biotransformación a través de la curva de calibración, la cual arroja un valor  $r^2$  estadísticamente significativo.

**Tabla 3.** Valores de atributos de método analítico para la evaluación de aptitud de detección de Indapamida mediante H<sup>1</sup>-RMN 600 MHz en muestras de orina humana.

Las curvas de calibración proporcionaron ecuaciones lineales: $y = mx+b$ , donde $y$ es la respuesta, $x$ la concentración de Indapamida, $m$ la pendiente y $b$ el intercepto con el eje $y$					
	<b>Linealidad</b>				
	<b>Ecuación de la recta</b>	$r^2$	<b>Precisión % (RSD) n:9</b>	<b>LOD (<math>\mu</math>M)</b>	<b>LOQ (<math>\mu</math>M)</b>
Indapamida	$y = 7545.3x + 1.8758$	0.9927	<1	0.1527	0.4627

La comparación de espectros <sup>1</sup>H-NMR de muestras de orina placebo Vs consumo de Indapamida permitió el reconocimiento inmediato de los metabolitos específicos de la sustancia. Fueron identificadas fácilmente con ayuda de los datos mostrados en la Tabla 1.



**Figura 4.** A. Región de protones alifáticos en muestras de orina placebo (rojo) y muestra control positivo (azul) de consumo de indapamida a concentraciones terapéuticas. B. Región de protones aromáticos en orina placebo y control positivo. Protones H1 y H11 considerados para identificación y cuantificación.

## **Conclusión**

La espectroscopia NMR es una técnica rápida y eficiente que requiere un mínimo tratamiento de muestra y bajo consumo de tiempo durante su fase analítica, permitiendo la identificación inequívoca y cuantificación de sustancias específicas en matrices complejas como lo son la orina. El presente estudio logró demostrar la idoneidad de la técnica como alternativa tecnológica a ser usada por entes reguladores con el fin de detectar sustancias dopantes o aquellas que tienen capacidad enmascarante como los diuréticos. Los resultados arrojados demuestran que la técnica NMR cumple con los criterios analíticos para iniciar la validación del método usado para la identificación y cuantificación de Indapamida en muestras de orina.

## Bibliografía

- (1) Anti-doping, W. (2015). Code 2015.
- (2) Tamburrini, C. (2010). ¿Qué tiene de malo el dopaje ?\* What's Wrong with Doping ?
- (3) Atienza, E., Lopez Frias, F. J. ., & Perez Triviño, J. L. (2014). El dopaje y el antidopaje en perspectiva historica., 94–110.
- (4) Mørkeberg, J. (2013). Blood manipulation: current challenges from an anti-doping perspective. *Sports Medicine in Hematology*, 627–31. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2013.1.627>
- (5) Cadwallader, A. B., De La Torre, X., Tieri, A., & Botrè, F. (2010). The abuse of diuretics as performance-enhancing drugs and masking agents in sport doping: Pharmacology, toxicology and analysis. *British Journal of Pharmacology*, 161(1), 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00789.x>
- (6) Alquraini, H., & Auchus, R. J. (2016). Strategies that athletes use to avoid detection of androgenic-anabolic steroid doping and sanctions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.01.028>
- (7) Aguilar, M., Muñoz-Guerra, J., & Plata, M. del M. (2017). Thirteen years of the fight against doping in figures. *Drug Testing and Analysis*, 9(6), 866–869.
- (8) Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2010). GC-MS: más de un analizador de masas, ¿para qué? *Scientia Chromatographica*, 2(4), 23–46.
- (9) Warren R. Dunn, MD, MPH, , Michael S. George, MD, Larry Churchill, PhD, Kurt P. Spindler, M. (2017). Ethics in Sports Medicine. *The American Journal of Sports Medicine*, 35(5), 840–844. Retrieved from <http://journals.sagepub.com.bdigital.ces.edu.co:2048/doi/pdf/10.1177/0363546506295177>
- (10) Garrido, Raine, Vélez, Hernan,Vérez, V. (2013). Resonancia magnética nuclear: nuevas aplicaciones en la cuantificación y la evaluación de intermediarios de vacunas basadas en polisacáridos. *Revista Vaccimonitor (Vacunología Y Temas Afines)*, 22(1),

35–42.

Retrieved

from

<http://eds.b.ebscohost.com.bdigital.ces.edu.co:2048/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=3&sid=299e13f9-351f-43bb-86d2-4fa42f6dae%40sessionmgr104>

(11) M.Malet-Martino, U. H. (2011). NMR techniques in biomedical and pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55(1), 1–15. Retrieved from [www.sciencedirect.com.bdigital.ces.edu.co:2048/science/article/pii/S0731708510007302?via%3Dihub](http://www.sciencedirect.com.bdigital.ces.edu.co:2048/science/article/pii/S0731708510007302?via%3Dihub)

(12) Chary KVR, Govil G. *NMR in Biological Systems*. Dordrecht: Springer; 2008.

(13) Holzgrabe U, Diehl B, Wawer I. *NMR spectroscopy in pharmaceutical analysis*. 1st ed. Holzgrabe U, Diehl B, Wawer I, editors. Amsterdam: Elsevier; 2008.

(14) Bharti SK, Roy R. Quantitative <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy. *Trends Anal Chem* 2012;35:5-26.

(15) Arunagirinathan, G., Mckay, G., & Fisher, M. (2010). Indapamide, 27(2), 85–86