

Mario Andrés Rayo Morales

Desafíos en la detección de la eritropoyetina recombinante en el ámbito deportivo

Trabajo Final de Máster

Máster en Genética, Física y Química Forense

Supervisor académico: Ximena Terra Barbadora



Tarragona, Junio 2022

Índice

Abstract.....	1
Resumen.....	2
Abreviaciones	3
1. Introducción	4
1.1. Eritropoyetina.....	4
1.2. Agonistas del receptor de la eritropoyetina.....	5
1.3. Métodos electroforéticos de detección de rEPO.....	7
1.4. Administración de rEPO en micro dosis.....	8
2. Objetivo.....	10
3. Metodología	10
4. Mejora y optimización de los protocolos electroforéticos	10
5. Métodos directos alternativos	13
5.1. Inmunoensayo de isoformas asistido por membrana (EPO WGA MAIIA)	13
5.2. Espectrometría de masas.....	14
5.3. Electroforesis capilar acoplado a sistema Western Blot.....	15
5.4. Sensores electroquímicos/biosensores	16
5.5. Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS).....	17
6. Métodos de detección indirectos.....	19
6.1. Pasaporte biológico del atleta	19
6.2. Proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro	22
6.3. Transcriptómica	23
7. Discusión	25
8. Perspectivas de futuro.....	27
9. Conclusiones	30
10. Referencias bibliográficas	31

Abstract

Doping and its control is one of the biggest challenges in the world of sport. The use of erythropoiesis-stimulating agents (ESAs), and especially recombinant erythropoietin (rEPO), has been used as a doping method since the beginning of doping practices. The promotion of erythrocyte production by ESAs leads to an increase of oxygen transport and, therefore, an improve of the aerobic athletic performance.

In the last decade, a new form of administration based on rEPO micro doses has been expanding and becoming popular among athletes. This strategy is more difficult to be detected in anti-doping controls while potentiates the long-term effects of rEPO.

The main objective of this literature review is the compilation and analysis of the improvements of the current electrophoretic methods for the detection of rEPO during the last years, as well as the development of alternative methods. In addition, the advantages and disadvantages of different methods and future development for greater control of the use of rEPO in athletes will also be reviewed.

From all the information collected, the electrophoretic methods, due to the improvements and optimization of their protocols, have increased their sensitivity and selectivity, prolonging the detection window of rEPO. However, their high cost and time-consuming prevent the realization of more frequent anti-doping tests and, therefore, a more exhaustive control throughout the year. The low cost and shorter time needed of alternative methods are potential options as screening test, despite the lower sensitivity observed. The haematological module of the Athlete Biological Passport (ABP) results as an optimal tool, based on the monitoring and control of haematological variables through the year. However, it still needs an improvement in the interpretation and analysis of the data collected, in addition to the inclusion of new biomarkers.

Resumen

El dopaje es uno de los mayores problemas y retos en el mundo del deporte. El uso de agentes estimulantes de la eritropoyesis (AREs), y en especial la eritropoyetina recombinante (rEPO), ha sido un método habitual de dopaje desde el inicio de las prácticas dopantes. La estimulación de la producción de eritrocitos mediante AREs, provoca un aumento de transporte de oxígeno resultando en una mejora del rendimiento atlético.

En la última década, una nueva forma de administración mediante micro dosis de rEPO ha ido expandiéndose y popularizándose entre los atletas. Esta estrategia dificulta su detección en los controles antidopaje mientras potencia los efectos de rEPO a largo plazo.

El principal objetivo de esta revisión bibliográfica es la recopilación y análisis de las mejoras e implementaciones de los métodos electroforéticos estandarizados para la detección de rEPO en los últimos años, así como el desarrollo de métodos alternativos propuestos. Además, también se revisará las ventajas e inconvenientes de los diferentes métodos y posibles vías de desarrollo e investigación futuras para un mayor control del uso de rEPO en atletas.

En base a toda la información recolectada, los métodos electroforéticos acreditados, gracias a las mejoras y optimización de su protocolo, han incrementado la sensibilidad y selectividad, prolongando la ventana de detección. Sin embargo, su alto coste y tiempo necesario impiden la realización de pruebas antidopaje más rutinarias y frecuentes y por tanto un control más exhaustivo durante todo el año. La rapidez y bajo coste de métodos directivos alternativos son una potencial opción como prueba de muestreo inicial, pese a la menor sensibilidad observada. La herramienta óptima para la detección de micro dosis es el módulo hematológico del Pasaporte biológico del Atleta (PBA), basándose en el seguimiento y control de variables hematológicas a lo largo del tiempo. Sin embargo, todavía necesita de una mejora en la interpretación y el análisis de los datos recopilados, además de la inclusión de nuevos biomarcadores.

Abreviaciones

ABPS: *Abnormal Blood Profile Score*

AEE: Agentes estimulantes de la eritropoyesis

ALAS2: 5'Aminolevulinato sintasa 2

ARE: Agonistas del receptor de la eritropoyetina

CA1: Anhidrasa carbónica 1

CERA: Continuo Activador del Receptor de Eritropoyetina

CE: Electroforesis capilar

CZE: Electroforesis de zona capilar

cIEF: Enfoque isoelectrico capilar

CP: Confirmation Procedure

DBSs: *Dried Blood Spots*

EPO: Eritropoyetina

EPOR: Receptor de eritropoyetina

EPO WGA MAIIA: Inmunoensayo de isoformas asistido por membrana

IEF-: Enfoque isoelectrico

Hb: Hemoglobina

ITP: Initial Test Procedure

IU: Unidad internacional para EPO

LC-MS: Cromatografía líquida de acoplada a espectrometría de masas

LC-MS/MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem

LC-HRMS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución

miRNA: microRNAs

NESP: Nueva proteína estimulante de la eritropoyesis

WADA: World Anti-Doping Agency

rEPO: EPO recombinante

RTf: Receptor de transferrina

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

PBA: Pasaporte Biológico del Atleta

PEG: Grupo metoxi polietilenglicol

SAR-: Sodio N-lauroilsacosinato 'Sarcosil'

SDS-: Dodecil sulfato de sodio-

SERS: *Surface enhanced Raman spectroscopy*

SLC4A1: *Solute carrier family 4 member 1*

Tf: Transferrina

WGA: Aglutinina de germen de trigo

1. Introducción

Uno de los problemas más importantes y significativos en el mundo del deporte es el dopaje, el cual afecta la integridad de la competición, su espíritu y esencia, y la propia salud de los atletas. El dopaje es el término utilizado para referirse al uso de sustancias o métodos que aumentan y mejoran las capacidades y el rendimiento físico de un atleta en un deporte de forma injusta o ilegal.

Para detectar el uso de sustancias y métodos dopantes ilegales por atletas, la *World Anti-Doping Agency* (WADA) regula y supervisa todo el sistema de control antidopaje mediante la recogida y análisis de muestras biológicas como son la orina y sangre, tanto durante competiciones como fuera de ellas. Para estandarizar qué sustancias y métodos son prohibidos en el mundo del deporte, la WADA creó la Lista (*The List*). La Lista es un documento legal que determina que sustancias y métodos quedan prohibidos en los atletas, siendo actualizada cada año (WADA, 2022).

1.1. Eritropoyetina

Una de las estrategias más comunes utilizadas tanto en el pasado como en el presente es la estimulación de la eritropoyesis, resultando en un aumento del rendimiento aeróbico. Las sustancias ilegales usadas con este objetivo son denominadas Agentes estimulantes de la eritropoyesis (AEE), pertenecientes a la clase S2 de la Lista de sustancias prohibidas de la WADA. Dentro de esta subclase, las sustancias más utilizadas y detectadas en los controles de dopaje son los agonistas del receptor de la eritropoyetina (AREs) (WADA, 2022). Los AREs son sustancias sintéticas análogas a la eritropoyetina humana (EPO).

La EPO es una hormona glicoproteína producida por los fibroblastos peritubulares del riñón. Su principal función es estimular la proliferación y diferenciación de los eritroblastos en eritrocitos (glóbulos rojos), mediante la unión al receptor de eritropoyetina (EPOR). Este aumento de eritrocitos por el efecto de la EPO provoca un aumento de transporte y liberación de oxígeno en las células. Su producción se encuentra principalmente regulada y estimulada por hipoxia, situación de deficiencia de oxígeno disponible en sangre y tejidos. Esta disminución de oxígeno activa los factores transcripcionales conocidos como factores inducibles por hipoxia, los cuales inducen la expresión del gen *Epo* (Jelkmann & Jelkmann, 2011).

La EPO recombinante fue desarrollada en 1980 como agente beneficioso en el tratamiento de la anemia crónica asociada de enfermedad de riñón crónica, debido a su capacidad de promover la producción de eritrocitos (Figura 1) (Coyne et al., 2017). Su comercialización produjo un auge de su uso en atletas en 1990. La principal razón proviene de la observación de la capacidad de transporte de oxígeno a los músculos como principal factor limitante de los deportes aeróbicos y de resistencia. Paralelamente, se descubrió que el aumento de hemoglobina y su concentración mejoraba el consumo máximo de oxígeno (VO_{2max}), resultando en una mejora del rendimiento (Ekblom et al., 1972). El fácil acceso y su gran impacto atlético resultó en un uso masivo hasta finales de los 2000.

1.2. Agonistas del receptor de la eritropoyetina

Existen tres generaciones de AREs. La primera generación se encuentra formada por la EPO recombinante (rEPO) conocida como epoetina. La epoetina engloba distintas isoformas llamadas epoetina alfa/beta, delta y omega. El origen de estas isoformas son las diferencias en la producción y las líneas celulares utilizadas, resultando en patrones de glicosilación diferentes (Smith et al., 2007). La epoetina tiene una vida media de entre 8 a 24 horas, lo que la hace ser muy utilizada para propósitos dopantes por esta ventana de detección tan corta (Franz, 2009).

La segunda generación está compuesta de la nueva proteína estimulante de la eritropoyesis (NESP) conocida como darbepoetina. NESP fue diseñada con el objetivo de conseguir una EPO recombinante con una vida media más larga, disminuyendo la frecuencia de inyecciones terapéuticas (Macdougall et al., 2003).

La tercera generación de AREs conocida como activador continuo del receptor de eritropoyetina (CERA) comenzó a ser comercializada en Europa en 2007. Esta sustancia está formada por la unión de la epoetina beta con un grupo metoxi polietilenglicol (PEG). La adición del grupo PEG (o *pegilación*) provoca una disminución de la afinidad con el EPOR debido al aumento de tamaño molecular (60 kDa), lo que resulta en una menor filtración por los riñones y un incremento de su vida media en suero (70-122 h) (Jelkmann, 2012).

Un ARE creado farmacológicamente recientemente es la EPO-Fc, la cual consiste en la EPO monomérica o dimérica unida a la región Fc de la inmunoglobulina G humana (IgG), siendo incluida y prohibida por la WADA en 2012 (Postnikov et al., 2015)

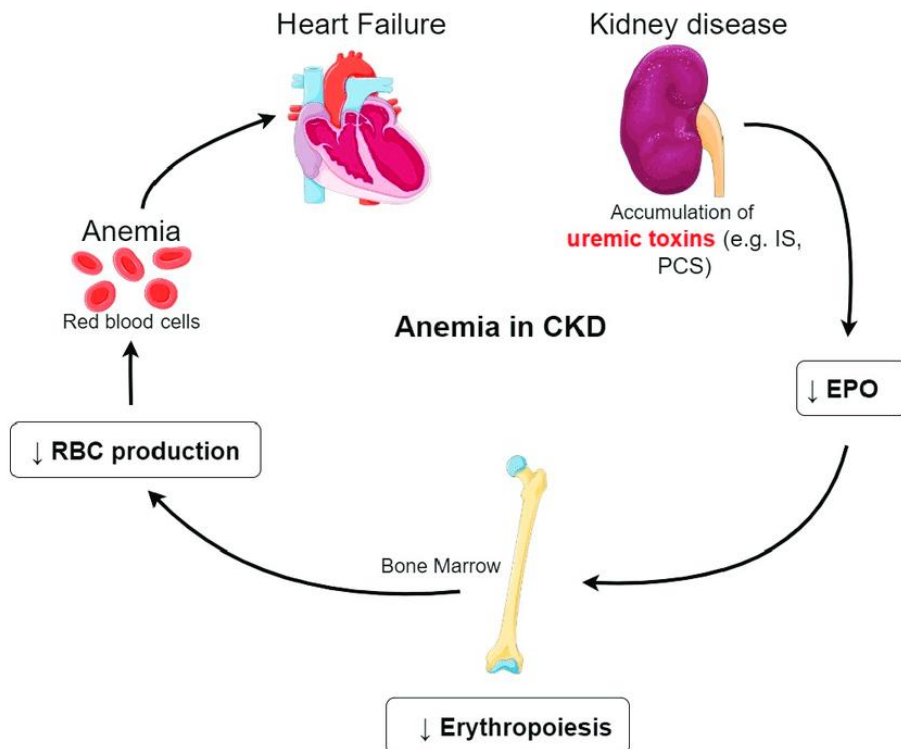


Figura 1. Proceso de aparición de anemia consecuencia de enfermedad crónica renal. La acumulación de toxinas por el malfuncionamiento del riñón causa una disminución de la síntesis y producción de EPO, lo que comporta una disminución de la eritropoyesis provocando la disminución de glóbulos rojos característicos de anemia. Imagen obtenida de Hamza, Eya & Metzinger, Laurent & Metzinger, Valerie. (2020). Uremic Toxins Affect Erythropoiesis during the Course of Chronic Kidney Disease: A Review. Cells. 9.

Como se ha comentado anteriormente, de los diferentes AREs la sustancia por excelencia y más utilizada por su corta vida media y dificultad de detección es la rEPO (epoetina) (WADA, 2022). El uso de rEPO en el deporte tiene un historial y hemeroteca de casos de dopajes muy extenso, como la de ciclistas en la era de los 1990-2010. De los casos más relevantes se encuentra el de Lance Armstrong, el cual causó un revuelo internacional en el mundo del deporte. En la actualidad continúan apareciendo y reportándose nuevos casos de dopaje con rEPO año tras año, lo cual indica que el uso de rEPO en los atletas continua vigente (WADA, 2022). Por ello, a lo largo de los últimos años se ha ido expandiendo el pensamiento popular de la existencia de muchos más casos no detectados y de un uso mucho más común de rEPO entre atletas profesionales y amateurs.

1.3. Métodos electroforéticos de detección de rEPO

Los métodos de detección de rEPO estandarizados son aplicados posterior a la recogida de orina y/o sangre, y su envío al laboratorio antidopaje. En el laboratorio, primeramente, se realiza una prueba de cribaje, llamado *Initial Test Procedure (ITP)*, y en caso de resultado adverso o dudoso se realiza otra prueba llamada *Confirmation Procedure (CP)*.

Para el análisis inicial del rEPO, se utiliza como *ITP* enfoque isoeléctrico (IEF) o dodecil sulfato de sodio (SDS) / sodio N-lauroilsacosinato 'Sarcosil' (SAR) - electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). Por otro lado, para CP sólo se utiliza SDS- o SAR-PAGE (WADA, 2022).

1.3.1. IEF-PAGE

El primer método desarrollado para la detección de EPO recombinante en atletas dopados fue creado por Lasne et al., en los años 2000 conocido como IEF-PAGE. La primera fase de la técnica consiste en la separación de la EPO recombinante de la EPO endógena humana debido a las diferencias en la composición de la cadena de carbohidratos. A un cierto pH se produce un cambio diferencial de la carga neta de las proteínas, el cual se puede observar por enfoque isoeléctrico dónde son separadas por su diferente punto isoeléctrico (Lasne & De Ceaurriz, 2000).

En este caso se utiliza un gradiente de pH de 2 a 6, dónde la EPO humana migra a las regiones más ácidas del gel por tener una carga negativa mayor, mientras que las principales isoformas de la EPO recombinante migran a las áreas más básicas, al tener una carga no tan negativa. Por el contrario, la darbepoetina alfa migra a las zonas más ácidas del gel de enfoque isoeléctrico al tener una mayor carga negativa que la EPO endógena (Franz, 2009) (Figura 2).

1.3.2. SDS-/SAR-PAGE

El otro método de separación de EPO endógena y rEPO es mediante sus pesos moleculares por SDS. rEPO tiene un mayor peso molecular que la EPO endógena debido a los diferentes patrones de glicosilación que pueden ser detectadas por SDS-PAGE en orina o suero. Ambos métodos de separación (IEF- y SDS-PAGE) son complementarios y permiten la detección de EPO

recombinante de primera y segunda generación a través de la posterior detección mediante Western Blot,(Lasne & De Ceaurriz, 2000).

Sin embargo, pese a que CERA tiene un patrón diferente de enfoque isoelectrico y de movilidad relativa por su estructura *pegilada* respecto a la EPO endógena, su larga longitud y el no ser filtrada ni excretada por la orina complica su detección mediante SDS-PAGE. En este caso, se utiliza sodio N-lauroilsacosinato 'Sarcosil' (SAR) en vez de SDS para la separación por pesos moleculares. Esto se debe a que SAR se une únicamente a la cadena aminoacídica de CERA, lo que permite la unión de los anticuerpos y una banda más fina y específica (Lasne et al., 2007).

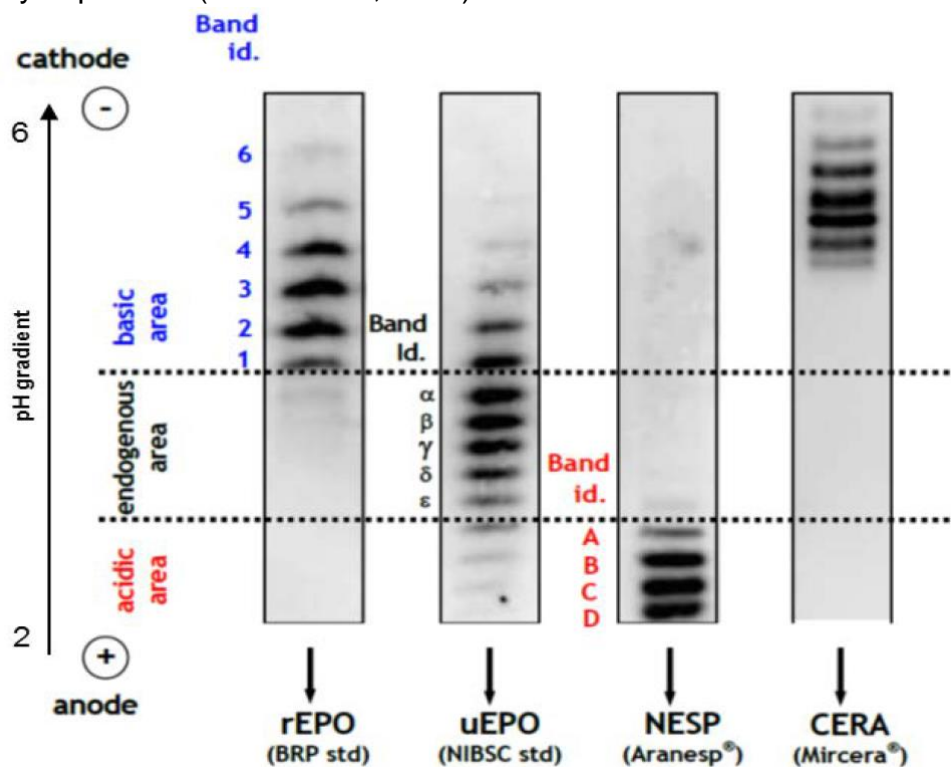


Figura 2. Imagen del patrón de separación entre las diferentes isoformas de EPO marcados por anticuerpos en IEF-PAGE (pH = 2 - 6). uEPO: Eritropoyetina humana observada en orina humana. Representación obtenida de WADA Technical Document – TD2022EPO

1.4. Administración de rEPO en micro dosis

El uso de rEPO en el dopaje ha ido evolucionando y reinventándose a lo largo del tiempo. En los últimos años se ha adoptado una estrategia de administración por micro dosis vía intravenosa, en la cual se utilizan dosis mucho más bajas respecto a las dosis terapéuticas (<50 IU/Kg), de una forma más frecuente (entre 1 a 4 días). (IU, Unidad internacional para eritropoyetina, equivalente a la

actividad biológica de 1,48 mg de EPO de la Preparación internacional de Referencia). Además de disminuir la probabilidad de detección, se ha visto que puede ser incluso más eficaz en el incremento del rendimiento atlético y ejercicio aeróbico que el uso de dosis altas de forma única (Breenfeldt Andersen et al., 2023; Haider et al., 2020).

Un estudio de 2013, con motivo del auge y la aparición de la administración de rEPO mediante micro dosis, evaluó su detección por los métodos electroforéticos. Se observó que la ventana de detección era de 18 horas en orina, obteniendo un 100% de sensibilidad después de la inyección de micro dosis. Sin embargo, la sensibilidad disminuía drásticamente durante las 6 horas posteriores hasta bajar al 50% (Dehnes et al., 2013). En otro estudio posterior, tras la inyección de una micro dosis de rEPO de 500IU (7 IU/Kg), la sensibilidad bajaba de 92% a 67% en el intervalo de las 15 a las 20 horas, respectivamente. Por otro lado, en dosis más altas (900 IU; 12,5 IU/kg), se producía una bajada de 100 a 75%. (Martin et al., 2016).

Debido a los resultados de estos estudios, la mejora y optimización de los protocolos de las técnicas electroforéticas ha sido una vía de investigación prioritaria en el antidopaje. Por otro lado, el desarrollo de nuevas técnicas analíticas también ha sido de gran importancia en la lucha contra el dopaje y el uso de rEPO ésta última década.

Por tanto, al igual que el dopaje se renueva e innova constantemente con el objetivo de encontrar nuevas formas de dopaje que pasen desapercibidas, los métodos de detección también deben adaptarse a esta evolución. El desarrollo y la mejora continua de estos métodos son indispensables para garantizar su eficacia, manteniendo así la integridad de las competiciones deportivas. Por consiguiente, este trabajo se enfoca en analizar los métodos actualmente utilizados para detectar rEPO, así como en explorar su constante desarrollo y actualización. Además, también se pretende identificar nuevos métodos con potencial para su implementación en los laboratorios antidopaje.

2. Objetivo

El objetivo de esta revisión bibliográfica es la recopilación de los diferentes métodos utilizados actualmente en la detección de rEPO, junto con las implementaciones y mejoras de sus protocolos, así como los nuevos métodos potenciales desarrollados durante estos últimos años. Además, se pretende evaluar y analizar tanto la eficacia como el potencial de los métodos existentes y en desarrollo.

3. Metodología

La metodología utilizada se ha basado en una búsqueda literaria mediante las herramientas *PubMed* y *Google académico*, centrada en artículos publicados en los últimos 10 años relacionados con los métodos de detección de rEPO en el dopaje, tanto actuales como en desarrollo. Toda la bibliografía consultada se encuentra referenciada a lo largo del trabajo y agrupada en su totalidad en el apartado de *referencias bibliográficas*, listadas por orden alfabético.

4. Mejora y optimización de los protocolos electroforéticos

Desde la inclusión y estandarización de los métodos electroforéticos en la detección de rEPO en los laboratorios antidopaje, a lo largo de los años se han ido implementando mejoras y optimizando sus protocolos.

4.1. Inmunopurificación

Previo a la realización de las diferentes pruebas analíticas, es necesario realizar una inmunopurificación para eliminar las posibles proteínas inespecíficas de la muestra biológica que puedan interferir en la señal, y concentrar el posible ARE.

El método más frecuente de inmunopurificación en sangre es el kit MAIIA, el cual es capaz de realizar la inmunopurificación en una hora. Sin embargo, es un kit muy laborioso y caro, además de no poder detectar CERA y EPO-Fc en orina (Dehnes et al., 2010). Para la purificación en orina se utiliza el método *Stemcell* ELISA basado en micro pocillos recubiertos con anticuerpos anti-EPO, debido a su bajo coste, facilidad, fiabilidad y alta sensibilidad (Kohler et al., 2008). Sin embargo, este método solo puede ser utilizado en orina, ya que en sangre no es

compatible. Además, presenta una tasa de recuperación muy baja en referencia a CERA (Reihlen et al., 2015). Por ello, diversos métodos de inmunopurificación han sido publicados para mejorar y optimizar este proceso de purificación.

Desharneis et al., diseñó un método basado en el uso de una combinación de perlas inmunomagnéticas recubiertas de estreptavidina con anticuerpos policlonales anti-EPO biotinados. Este método permite el análisis posterior electroforético realizando una única incubación por Western Blot, lo que ahorra tiempo y disminuye posibles errores manuales (Desharnais et al., 2017). Al ser comparado frente a los métodos de referencia, no se encontraron diferencias significativas respecto a la sensibilidad, especificidad y repetibilidad, por lo que su uso depende más de la matriz biológica a analizar y el tiempo y coste de cada método (Zhou, Zhang, et al., 2020).

Otra estrategia reciente propuesta utiliza un kit de perlas de gel de sefarosa anti-EPO, de *MAIIA Diagnostics*, resultando en una mejora del manejo, rendimiento y tiempo de trabajo de las muestras respecto al kit de referencia MAIIA anterior (Heiland et al., 2019). Si bien puede ser usado tanto en orina como sangre, no es posible usarse en combinación con IEF-PAGE.

4.2. Inmunodetección

Una de las principales claves en la eficacia de los métodos electroforéticos es el inmunomarcaje por Western Blot. Por un lado, la automatización de los pasos más manuales de Western Blot mediante un procesador de marcaje automático permitió un aumento de la sensibilidad y una mayor ventana de detección de rEPO en SAR-PAGE (Reichel et al., 2019).

Para la inmunodetección por Western Blot posterior a la separación electroforética por IEF-, SDS-, y SAR-PAGE, normalmente es necesario un doble marcaje e incubación de anticuerpos. Primeramente, se incuba un anticuerpo primario monoclonal anti-EPO, en este caso el clon AE7A5, y posteriormente un anticuerpo secundario conjugado con biotina y un complejo de estreptavidina-HRP, el cual da la señal quimioluminiscente. Recientemente, los anticuerpos de ratón anti-EPO AE7A5 han sido biotinados directamente, uniéndose directamente el complejo estreptavidina-HRP. De esta forma no es necesaria una segunda transferencia e incubación de un anticuerpo secundario (Dehnes et

al., 2020; Zhou, He, et al., 2020). Esta optimización del proceso de inmunodetección ha permitido aumentar la sensibilidad 8 veces en comparación al uso del anticuerpo secundario conjugado con biotina (Voss et al., 2021).

4.3. Detección de rEPO por los métodos electroforéticos optimizados

El impacto de este conjunto de mejoras y optimización en la detección de rEPO han sido analizados recientemente tanto a dosis altas como en micro dosis. Uno de los estudios más destacados se realizó mediante la administración de 10 IU/kg (700–800 IU) de Binocrit (epoetina alfa), una de las isoformas de rEPO con vida media más baja (24 horas aproximadamente) (Martin et al., 2021). Se observó una gran mejoría respecto a la ventana de detección en orina, obteniéndose un 100% 48 después de la administración al principio y al final del tratamiento, y un 100% 72 horas después de la última dosis del tratamiento.

Otro estudio más reciente analizó la sensibilidad de detección en este caso de la administración de micro dosis (7,5 IU/kg) de Retacrit (epoetina zeta) 3 veces por semana durante 2 semanas. En este caso la ventana de detección llegaba hasta las 52-53 horas mediante SAR-PAGE tanto en orina como en suero (Reichel et al., 2023). Esta ventana de detección duplica las ventanas de detección obtenidas en estudios antiguos con anticuerpos AE7A5 no biotinados, en técnicas no electroforéticas, o bien en estudios de SAR-PAGE con el protocolo no optimizado (Martin et al., 2016).

Cabe destacar que en ambos estudios IEF-PAGE presentó una sensibilidad y ventana de detección menor en comparación con SDS/SAR-PAGE. Respecto a Binocrit, IEF-PAGE presentó una sensibilidad de 82% en suero y 64% en orina después de 48 horas, mientras que Retacrit solo era detectable hasta las 18 h después en orina.

5. Métodos directos alternativos

Diversos métodos analíticos han sido desarrollados a lo largo de los últimos años como alternativas a los métodos actuales, con el objetivo de obtener métodos menos laboriosos y costosos para la detección de rEPO y otros AREs.

5.1. Inmunoensayo de isoformas asistido por membrana (EPO WGA MAIIA)

Uno de los métodos alternativos estudiados y propuestos para la detección de rEPO es una prueba conocida como inmunoensayo de isoformas asistido por membrana (EPO WGA MAIIA).

El ensayo permite diferenciar rEPO de EPO endógena según la diferente afinidad de las isoformas de EPO con la lectina de la aglutinina de germen de trigo (WGA), la cual es definida según la glicosilación. Las isoformas de rEPO interactúan más fuerte con la WGA que la EPO endógena. Respecto a los otros AREs, la darbopoetina alfa (NESP) es la molécula con a mayor afinidad por la WGA, mientras que CERA tiene menor afinidad por WGA que la EPO endógena (Lönnberg et al., 2012). A continuación, son eluidas según su afinidad y posteriormente inmovilizadas por anticuerpos anti-EPO y detectadas por otros anticuerpos anti-EPO marcados con nano cadenas de carbono negras, dando una intensidad de señal en una tira reactiva proporcional a la concentración de EPO unida (Lönnberg et al., 2010).

Respecto a su capacidad de detección del uso de rEPO en micro dosis, diversos estudios han sido publicados. Mørkeberg et al., analizó la administración de la misma epoetina beta (rEPO) en 6 inyecciones potenciadoras de 50 IU/kg durante 3 semanas, seguida de dos microinyecciones de 10 IU/kg. EPO MAIIA WGA detectó el uso de micro dosis de rEPO con un 100% de sensibilidad hasta 12 horas después de la inyección, bajando drásticamente hasta solo ser detectada en el 27% de los sujetos a las 72 horas, tanto en orina como en plasma (Mørkeberg et al., 2014).

Por otro lado, Dehnes et al., investigó la detección de la misma epoetina beta del estudio anterior al administrarse 6 micro dosis intravenosas de 7,5 IU/kg (Dehnes et al., 2013). Con una especificidad del 98%, EPO WGA MAIIA detectó la presencia de rEPO 18 horas después de la micro dosis en un 100% de sensibilidad en plasma y 87,5% en orina. Sin embargo, la sensibilidad bajaba al

50% a las 24 horas, y en un 12% después de 48 horas, tanto en orina como en plasma. Cabe destacar que, al confirmar las muestras adversas por SAR-PAGE, se obtuvo un 100% de sensibilidad en las muestras de 18 horas en orina, y un 87,5% en plasma, disminuyendo a las 24 horas a un ~50% en ambas matrices.

5.2. Espectrometría de masas

La técnica de cromatografía líquida de acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) es uno de los métodos analíticos más comúnmente utilizados en el análisis y detección de sustancias dopantes en el deporte. Sin embargo, la identificación y detección de rEPO y AREs es más complicado debido al gran número de interferencias que existen principalmente en sangre, como la presencia de proteínas excesivamente abundantes (Dhurjad et al., 2022). Diferentes métodos de purificación y tratamiento de la muestra han sido propuestos con el objetivo de detectar rEPO en muestras biológicas mediante LC-MS, sin éxito. Yasuoka et al., desarrolló un método basado en la combinación de Western Blot con LC-MS, sin la necesidad de prepurificar EPO. Pese a permitir detectar la presencia de EPO y AREs en la muestra biológica, este método no es capaz de distinguir entre EPO endógena y las diferentes AREs (Yasuoka et al., 2020).

Con la aparición de técnicas de espectroscopia de masas más sensibles y resolutivas, nuevas estrategias han sido probadas y utilizadas con el objetivo de identificar y detectar AREs en muestras biológicas.

Una de las técnicas de espectroscopia de masas más estudiadas para la detección de AREs en el dopaje es la Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). LC-MS/MS ha demostrado ser una herramienta muy útil para la detección de NESP o CERA (Okano et al., 2014). Sin embargo, la detección de rEPO es mucho más complicada ya que LC-MS/MS no es capaz de diferenciar rEPO de EPO debido a que la diferencia estructural es de pocas fracciones de carbohidratos (Skibeli et al., 2001).

Con el objetivo de resolver esta problemática, diferentes estrategias han sido propuestas para la separación y purificación de las isoformas de rEPO. Una metodología alternativa propuesta por Vogel et al., es el aislamiento de las diferentes isoformas de rEPO en orina mediante perlas magnéticas unidas al

EPOR, aprovechando la capacidad de unión de rEPO al EPOR (Vogel et al., 2014, 2015). Sin embargo, los resultados finales no mejoran los obtenidos por métodos electroforéticos.

Otro posible método propuesto es la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS). La estrategia de detección y diferenciación entre EPO endógena y rEPO es el análisis de la glicosilación proteica, principal diferencia estructural entre ellas (Guan et al., 2021). Una de las formas de identificación por nanoLC-HRMS es mediante el análisis de la estructura de glucano tetra-sialílico específicamente situado de forma característica en la rEPO (Seo et al., 2023). Seleccionando el glucopéptido intacto con una estructura de ácido tetra-sialílico, es posible detectar el uso de rEPO pero con un límite de detección muy alto (500 pg/mL).

5.3. Electroforesis capilar acoplado a sistema Western Blot

Debido a las diferentes glicosilaciones postranscripcionales que sufre rEPO, es muy importante el estudio de sus diferentes glicofomas para su correcta separación y análisis. La electroforesis de zona capilar (CZE), junto al enfoque isoeléctrico capilar (cIEF), son dos de los principales métodos desarrollados para la separación, identificación y caracterización de las diferentes glicofomas de rEPO (de Frutos et al., 2003; Dou et al., 2008).

Uno de los métodos más prometedores desarrollado por Desharnais et al. se basa en un sistema completamente automático de electroforesis capilar (CE) integrado en el Western Blot conocido como *Western capillary electrophoresis system* (WCES) (Desharnais et al., 2018). El sistema está formado por un módulo de separación basado en nano capilares de 12 a 230kDa el cual, posterior a la electroforesis, es capaz de inmovilizar proteínas en la pared capilar para ser detectadas por Western Blot. La realización del método permite la detección de NESP, CERA y EPO-Fc a concentraciones de entre 1,5 a 6pg/ml para; y rEPO entre 1 y 3 mIU/ μ L. Dependiendo del sistema de automatización utilizado, se pueden analizar y cuantificar rEPO y otros AREs desde 25 muestras (Sistema Wes) hasta 96 muestras (Sistema Sally) en menos de 3 horas.

5.4. Sensores electroquímicos/biosensores

Uno de los métodos que más se han investigado en la detección de EPO recombinante y otros AREs estos últimos años es el uso de sensores electroquímicos. Los principales motivos son la simpleza y el bajo coste de los métodos en electroquímicos en el análisis y detección de proteínas (Paleček et al., 2015). Además, los puntos fuertes de los sensores electroquímicos son su rápida respuesta, la automatización, el bajo volumen de muestra requerido, y la posibilidad de ser portátil por su pequeño tamaño general (Bahadir & Sezginürk, 2015). El mayor problema de los sensores electroquímicos es la baja selectividad y sensibilidad respecto al analito objetivo (Furst et al., 2014). Sin embargo, en los últimos años grandes esfuerzos se están realizando en la mejora de estos aspectos.

Hassanain et al. diseñó un sensor basado en la modificación de la estructura de rEPO para su detección directa sin marcaje (*label-free*) (Hassanain et al., 2018). Primeramente, rEPO es extraído de las muestras de sangre mediante perlas magnéticas específicas. Posteriormente se redujeron electroquímicamente por cronoamperometría sus puentes disulfuro, permitiendo la unión espontánea de la EPO recombinante reducida con un electrodo de oro nanoestructurado por la formación de puentes de oro y sulfuro. Usando una técnica de voltamperometría, se separó la proteína de la superficie del electrodo para la cuantificación electroquímica. La cantidad de corriente necesaria utilizada es proporcional a la concentración de rEPO (Figura 3). Sin embargo, este método no es capaz de discriminar entre las diferentes isoformas de rEPO.

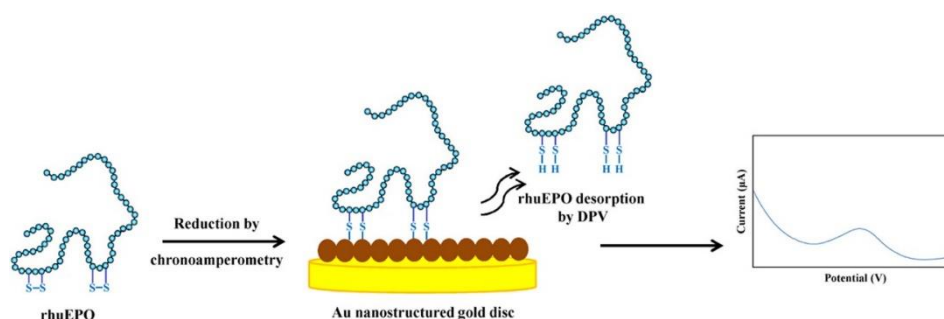


Figura 3. Representación esquemática del proceso de detección de rEPO por biosensor electroquímico. La reducción de rEPO permite su unión con el biosensor de nanopartículas de oro. La cantidad de uso de corriente necesaria para la total separación entre la rEPO y las nanopartículas de oro es proporcional a su concentración. Imagen obtenida de Hassanain, W. A., Sivanesan, A., Izake, E. L., & Ayoko, G. A. (2018). An electrochemical biosensor for the rapid detection of erythropoietin in blood. *Talanta*, 189, 636–640.

Diferentes estudios han utilizado esta misma técnica de voltamperometría, variando la forma de captura y reconocimiento de rEPO. Peng et al., diseñó un biosensor electroquímico de nanopartículas de oro, tubos de nano carbono y un electrodo de carbón vítreo capaz de medir la concentración de rEPO en muestras de sangre de ciclistas (Peng et al., 2022). Se obtuvo una gran mejora del límite de detección (1ng/l), siendo capaz de detectar específicamente la isoforma de rEPO. Recientemente, el mismo método fue aplicado usando nanopartículas de Fe₂O₃-NiO y oxido de grafeno en el electrodo de carbón vítreo, disminuyendo el límite de detección a 0,03ng/L (Jin et al., 2023)

Otra alternativa de diseño de sensores para la detección *label-free* de rEPO son los sensores basados en un polímero impreso molecularmente(Nadim et al., 2021). Se trata de un sensor de flujo de iones potenciométrico específico de rEPO, siendo utilizado en la detección de rEPO en diferentes formulaciones biofarmacéuticas, con un límite de detección de 6,50 ng/mL.

Además de sensores electroquímicos, también han sido diseñados y analizados sensores ópticos para la detección de rEPO. El sensor óptico diseñado por Gholami et al. se focaliza en la rapidez de la detección en base a la corta ventana de rEPO en sangre (Gholami, Theiss, et al., 2020). La base del método consiste en la extracción de rEPO en la muestra de sangre mediante un chip extractor específico para la posterior conversión de rEPO en biotiol. El biotiol reacciona con un producto acuoso específico descomponiéndose rápidamente lo que provoca un rápido cambio en el color del sensor de azul a rosa. Este color rosa es finalmente cuantificado por Espectroscopia UV-Vis, siendo proporcional a la concentración de rEPO con un límite de detección de 34 ng/L.

5.5. Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS)

Debido a la dificultad de los métodos electroquímicos para diferenciar entre las diferentes isoformas de EPO, una de las alternativas propuestas es el uso de *Surface enhanced Raman spectroscopy* (SERS), un método analítico muy potente que puede utilizarse para la detección de proteínas de forma ultrasensible (Gholami, Sonar, et al., 2020). Diferentes estudios han sido publicados en la aplicación de SERS para la detección de rEPO por su marcaje

diferencial, como por ejemplo mediante el uso de nanopartículas de oro (Selbes et al., 2016).

SERS puede ser utilizado en un protocolo *label-free*, logrando obtener información estructural de la molécula en muestras biológicas sin la necesidad de usar marcadores en muestras biológicas (Zheng et al., 2018). Uno de los estudios *label-free* SERS para la detección de rEPO se basa en la modificación de la estructura del puente disulfuro. Al modificarla rEPO puede adsorber químicamente las partículas en un sustrato específico detectable por SERS. Las determinadas bandas de Raman obtenidas en los espectros permiten diferenciar entre EPO y rEPO, además de cuantificar la concentración en un mínimo de 0,5 pM y 0,1 pM, respectivamente (Figura 4) (Hassanain et al., 2022).

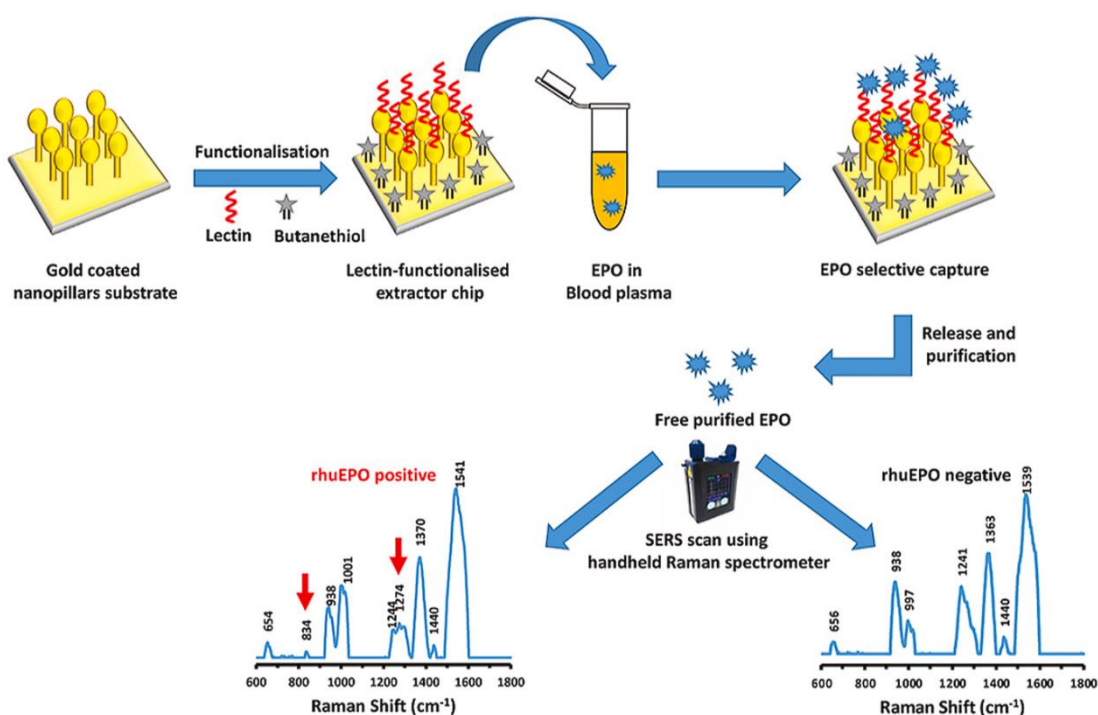


Figura 4. Representación esquemática de la extracción de las isoformas de EPO mediante el chip extractor de lectina y la representación y detección de rEPO por SERS. Figura extraída de Hassanain, W. A., Theiss, F. L., & Izake, E. L. (2022). Label-free identification of Erythropoietin isoforms by surface enhanced Raman spectroscopy. *Talanta*, 236, 122879.

6. Métodos de detección indirectos

6.1. Pasaporte biológico del atleta

El pasaporte biológico atleta (PBA) es un programa implementado por la Unión Internacional de Ciclismo en 2008 e integrado por la WADA en 2009, basado en la monitorización de biomarcadores y variables bioquímicas durante el tiempo. El principio del control de los diferentes parámetros biológicos es la posibilidad de observar de una forma más indirecta posibles efectos producido por el dopaje.

El programa del PBA este compuesto de 3 módulos: hematológico, esteroideo, y endocrinológico. Los 2 primeros, tanto el hematológico como el esteroideo, ya se han implementado y puesto en uso, siendo el primero integrado en 2009 y el segundo, en 2014. Por otra parte, el módulo endocrinológico esta aun siendo estudiado y desarrollado para ser operativo en algún futuro (Sottas et al., 2011).

Módulo hematológico

El módulo de interés de este trabajo se centra en el módulo hematológico. El objetivo de este módulo es la detección de forma indirecta del uso de sustancias y/o métodos dopantes que aumentan y mejoran el transporte de oxígeno a los músculos, incluyendo las isoformas de rEPO u otros AREs. Esta identificación y detección se basa en la recolección de datos de diferentes biomarcadores y variables sanguíneas a lo largo del tiempo. Entre estas variables se encuentran los hematocritos, la hemoglobina (Hb), la fracción de reticulocitos inmaduros, las plaquetas o el número y porcentaje de glóbulos rojos, reticulocitos o los glóbulos blancos (leucocitos) (Verneq, 2014). Además del estudio de los parámetros de estos marcadores sanguíneos, el modelo hematológico considera también el *Abnormal Blood Profile Score* (ABPS). EL ABPS es un marcador multiparamétrico basado en hasta 12 marcadores biológicos sanguíneos diferentes que pueden ser afectados por el uso de rEPO (Bornø et al., 2010).

El funcionamiento del PBA se basa en la realización de unas primeras pruebas iniciales sanguíneas del atleta durante un tiempo para compilar un perfil de parámetros sanguíneos personalizado. El perfil con los valores obtenidos es asignado como "normal" para el atleta, mediante un método de *network* Bayesiano (M. Saugy et al., 2014; Sottas et al., 2011). Entre esos parámetros se encuentra el *OFF Score*, una combinación del nivel de hemoglobina con el

porcentaje de reticulocitos, el cual varía entre individuos, género y otros factores externos. Si se detectan valores anormales y atípicos en el OFF Score o en otros parámetros respecto al perfil normal, un comité de expertos realiza una valoración para determinar si es un posible caso de dopaje o bien es debido a otro posible factor (Figura 6) ((WADA, 2023).

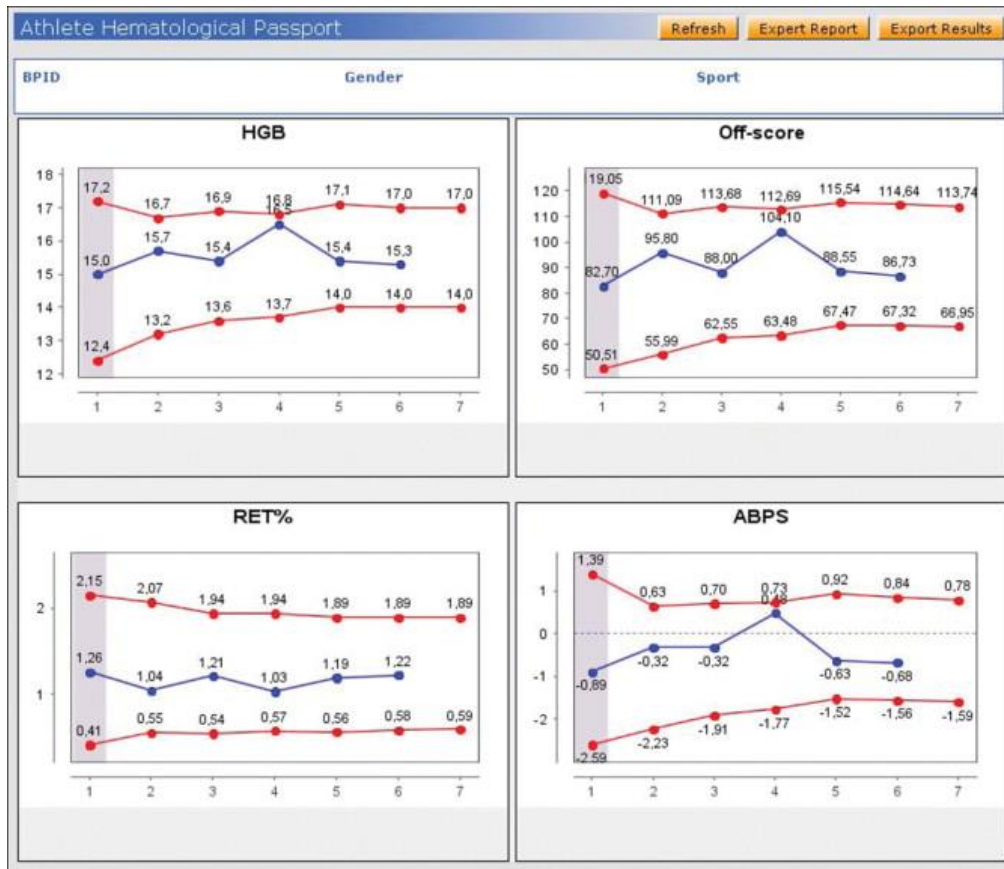


Figura 6. Perfil sanguíneo de un atleta con el seguimiento de los diferentes biomarcadores, este caso hemoglobina, porcentaje de reticulocitos, OFF score y abnormal blood profile score (ABPS) (captura del Athlete Biological Passport software system). Las líneas azules representan los valores obtenidos del atleta al medir cada biomarcador. El eje horizontal representa el número de muestra analizada y el eje vertical, el valor obtenido de la variable analizada. Las líneas rojas representan los límites máximos y mínimos predecibles debidos a la variación natural individual calculados por el algoritmo del software. La detección de un valor por fuera de estos determinados límites sugiere una anomalía. Imagen obtenida de Schumacher Y. O. (2014). The athlete biological passport: haematology in sports. *The Lancet. Haematology*, 1(1), e8–e10.

Para analizar y cuantificar los biomarcadores sanguíneos del PBA, el actual método acreditado por la WADA se basa en el análisis de sangre por citometría de flujo. Este análisis se realiza mediante los instrumentos Sysmex series XN, implementados recientemente y mejorando las series previas XE y XT (Equey et al., 2022). Uno de los mayores esfuerzos que se están realizando en el PBA es en la estandarización y optimización de esta nueva metodología, principalmente en el análisis y medida de los reticulocitos. Los reticulocitos, normalmente

representados como la fracción de reticulocitos inmaduros, es uno de los biomarcadores sanguíneos más sensibles en el aumento de eritropoyesis, pudiendo ser clave en la detección de la administración de EPO exógena u otros AEEs (Sottas et al., 2011).

Recientemente, Miller et al realizó un estudio placebo-controlado basado en la administración de epoetina alfa, inicialmente a dosis altas para potenciar la Hb y posteriormente micro dosis intravenosas para mantener elevada la Hb (Miller et al., 2022). El módulo hematológico del PBA solo reportó y remarcó como sospechosas el 24% de las muestras recolectadas a lo largo del estudio a individuos a los que se administró rEPO. Estos resultados destacan la necesidad y relevancia de buscar vías y enfoques complementarios en el PBA y el antidopaje.

Con el objetivo de obtener un método analítico más fiable y veraz en la detección de AEEs en el PBA, diferentes estudios han analizado y discutido la cuantificación de reticulocitos mediante la actual citometría de flujo y diferentes estrategias de marcaje y detección por fluorescencia sencilla o múltiple han sido propuestas (Equey et al., 2022; Jeppesen et al., 2021).

Por otro lado, se han observado que los parámetros hematológicos pueden ser modificados y alterados por diferentes factores externos. Los principales factores de confusión observados son la exposición a la altitud, hiperhidratación o deshidratación, alta actividad física, hipoxia crónica o incluso el uso de otras sustancias dopantes como los esteroides anabólicos esteroideos (Astolfi et al., 2021; Coffman et al., 2020; Heiland et al., 2023; J. J. Saugy et al., 2022).

La vía más investigada y retadora es la búsqueda de nuevos biomarcadores capaces de permitir la discriminación y detección del uso de sustancias o métodos dopantes. Debido al criterio tan estricto en la inclusión de biomarcadores en el seguimiento longitudinal del atleta, actualmente se disponen de muy pocos biomarcadores y variables capaces de ser estudiadas e interpretadas a lo largo del tiempo establemente. La mayoría de posibles marcadores están relacionadas con el metabolismo del hierro, clave en el transporte del oxígeno por los glóbulos rojos (Robinson et al., 2017).

6.2. Proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro

La eritropoyesis y producción de glóbulos rojos se encuentra muy unida al metabolismo de hierro. Esto se debe a que el hierro es un elemento esencial para la síntesis de hemoglobina, la proliferación de los eritrocitos y el propio transporte de oxígeno (Weiss et al., 1997). Por tanto, la administración y uso de rEPO u otros AREs afectan a diferentes moléculas y variables relacionadas con el hierro y su metabolismo.

Transferrina y ferritina

La transferrina (Tf), junto a la ferritina, son las principales proteínas involucradas en el metabolismo del hierro. La transferrina es responsable de su transportación en sangre, mientras que la ferritina se encarga de su almacenaje intracelular. Cuando los eritroblastos, células precursoras de los eritrocitos, necesitan captar hierro para sintetizar la hemoglobina, lo realizan a través del receptor de transferrina (RTf). De esta forma, la cantidad total de la forma soluble de RTf en sangre (sRTf) refleja y representa el nivel de actividad de eritropoyesis del organismo. La administración de rEPO u otro ARE provoca un aumento de los niveles de sRTf en sangre al activar la proteína de respuesta al hierro (IRP-1) (Salamin et al., 2016).

El efecto contrario ocurre con la ferritina, donde al administrar rEPO los niveles de ferritina en sangre disminuyen, por lo que la monitorización y seguimiento de estos dos parámetros pueden ayudar a la detección e identificación del uso de rEPO y AEEs (Onuma et al., 2015; Salamin et al., 2016).

Hepcidina y eritroferrona

Más allá de estas dos proteínas, nuevas proteínas relacionadas con el hierro han sido estudiadas como posibles biomarcadores recientemente. Estas proteínas son la eritroferrona y la hepcidina, dos proteínas claves en la regulación del hierro y su disponibilidad, sensibles y alteradas por la actividad eritropoyética (Kautz et al., 2014; Park et al., 2001).

La hepcidina disminuye y limita la disponibilidad y absorción del hierro, además de su recirculación en sangre (Camaschella et al., 2020). Durante la eritropoyesis, debido a la necesidad de captación de hierro, la secreción y

síntesis de hepcidina en el hígado es disminuida drásticamente (Figura 7) (Liu et al., 2012). Por otro lado, la eritroferrona suprime la expresión de hepcidina, aumentando el nivel de hierro y su disponibilidad para los eritroblastos (Arezes et al., 2018). Al contrario que la hepcidina, al estimularse la eritropoyesis, se produce un aumento de los niveles de eritroferrona (Figura 7) (Kautz et al., 2014).

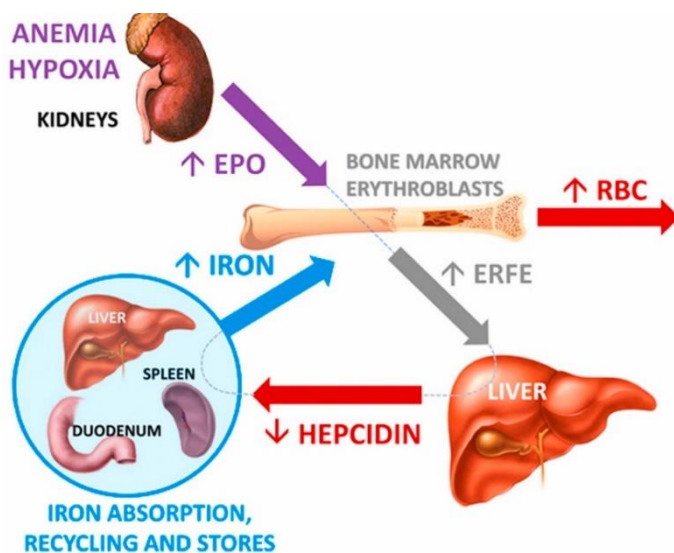


Figura 7. Regulación de los niveles de eritroferrona y hepcidina durante actividad eritropoyética. El aumento de EPO de forma endógena o exógena promueve la eritropoyesis, necesitando de la captación de Fe para la formación de la hemoglobina de los glóbulos rojos. Para aumentar los niveles de Fe disponibles, los niveles de eritroferrona aumentan inhibiendo la hepcidina. RBC: red blood cells (glóbulos rojos); ERFE: eritroferrona. Imagen adaptada de Ganz T. (2019). Erythropoietic regulators of iron metabolism. *Free radical biology & medicine*, 133, 69–74.

Honda et al., observó en un estudio con pacientes con hemólisis que la administración de rEPO disminuía los niveles de hepcidina en hasta un 90% 24 horas después de su administración (Honda et al., 2016; Onuma et al., 2015). Por otro lado, esta administración de rEPO, aumentaba los niveles de eritroferrona significativamente (Honda et al., 2016; Robach et al., 2021).

A partir de estos resultados, diversos nuevos estudios han sido publicados, analizando en profundidad la variación de hepcidina y eritroferrona durante la administración de rEPO y siendo propuestos como potenciales biomarcadores (Breenfeldt Andersen et al., 2022; Leuenberger et al., 2017; Ramirez Cuevas et al., 2020).

6.3. Transcriptómica

El uso de sustancias dopantes, al afectar el metabolismo u otros parámetros celulares, puede afectar la expresión de RNA. Por ello, diferentes estudios se han enfocado en la búsqueda e identificación de genes con un cambio

significativo de su expresión debido al uso de EPO recombinante, obteniéndose un gran número de mRNA con un patrón característico y alterado (Wang et al., 2017).

De todos los genes identificados como potenciales biomarcadores de RNA, destacan la anhidrasa carbónica 1 (CA1), *solute carrier family 4 member 1* (SLC4A1) y 5'aminolevulinato sintasa 2 (ALAS2) como candidatos para la detección de rEPO. Estos 3 genes y sus transcritos fueron monitorizados tras la administración de rEPO, observándose un gran aumento de la expresión de los mRNAs (Salamin et al., 2019). Específicamente, ALAS2 aumenta significativamente con dosis terapéuticas de rEPO, pese a las variaciones intra e interpersonales, independientemente de otros factores externos como la hipoxia o la altitud, a diferencia de los otros dos. Su análisis, tanto del RNA circular como lineal es una vía de investigación de mucho interés como potencial biomarcador en el contexto del antidopaje (Loria et al., 2022).

Wang et al, estudió la expresión génica y los perfiles transcriptómicos de 18 personas deportistas al administrarse rEPO durante 4 semanas (Wang et al., 2021). Utilizando 4 plataformas analíticas para el estudio de los resultados génicos obtenidos, se obtuvieron 119 genes destacados con una expresión diferencial y potencialmente relevante en la detección de rEPO. La mayoría de los genes se encuentran involucrados en la biosíntesis y catabolismo del grupo hemo y del intercambio oxígeno-carbono en los eritrocitos.

Por otro lado, los miRNA también han sido objeto de estudio, especialmente el miR-144, muy vinculado con la eritropoyesis. Los niveles de miR-144 son incrementados con el aumento de rEPO en sangre en pacientes con enfermedades renales (Gasparello et al., 2019; Leuenberger & Saugy, 2015). Un gran número de miRNA están siendo estudiados y analizados en el estudio de rEPO y otros AREs, con el objetivo de encontrar potenciales biomarcadores (Gasparello et al., 2019; Haile et al., 2019; Marchand et al., 2019).

7. Discusión

En la última década se ha realizado un gran avance en la optimización y mejora de los métodos electroforéticos utilizados para la detección de la administración de micro dosis de rEPO en atletas. La implementación de la biotinación de los anticuerpos AE7E5, junto al desarrollo de nuevos protocolos de inmunopurificación, ha permitido un aumento en la sensibilidad y selectividad de la detección de rEPO, además de disminuir coste y tiempo (Martin et al., 2021; Reichel et al., 2023).

Si bien se ha producido un aumento de la ventana de detección de administración de micro dosis de rEPO, el alto coste y tiempo que requieren las técnicas electroforéticas limita la frecuencia de análisis y un control exhaustivo del uso de rEPO a lo largo del año. Este punto es clave debido a que el aumento aeróbico que proporciona la rEPO no es de efecto inmediato precompetición, sino que es producido en el largo término por su continua administración y acumulación (Breenfeldt Andersen et al., 2023; Haider et al., 2020).

EPO WGA MAIIA, entre los diferentes métodos alternativos, es la opción actual más factible y viable de ser incluida a corto-medio plazo como método analítico complementario. Las principales razones son su rapidez y sencillez, capaz de realizar un análisis rápido de un conjunto de 15 muestras en una hora (Mørkeberg et al., 2014). Además, ha sido analizado y comparado de forma conjunta con los métodos electroforéticos (no optimizados), obteniéndose una gran sensibilidad, pese a que su ventana de detección es un punto por mejorar.

Métodos analíticos como LC-MS o SERS, además de ser costosos, lentos y laboriosos, tienen unos límites de detección muy altos, necesitando de mejores procesos de preparación y purificación de la muestra, sobre todo para la diferenciación eficaz entre EPO endógena y rEPO.

Por otro lado, pese a también presentar un límite de detección mayor a los métodos de referencia actuales, los sensores electroquímicos más avanzados y *Western capillary electrophoresis system* son dos tipos de modelos de detección con potencial como pruebas iniciales de screening. Los principales puntos a favor son el bajo coste y rapidez del primero, y la completa automatización del

segundo. Sin embargo, por ahora es más fiable el uso de kit ELISA por la reproducibilidad (Desharnais et al., 2018; Hassanain et al., 2018).

El módulo hematológico PBA es probablemente el método con mayor potencial en la detección de micro dosis de rEPO, debido al control y seguimiento continuo del atleta, tanto fuera de competición como durante. Sin embargo, los pobres resultados obtenidos recientemente señalan la necesidad de implementaciones y mejoras.

La Tabla 1 resume de forma sencilla y esquemática los principales puntos fuertes y débiles de cada tipo de método. Debido a que son estudios no estandarizados entre ellos, donde se han utilizado y analizado diferentes materiales de referencia y variables (diferente isoforma de rEPO y diferentes matrices biológicas, estudio de la ventana de detección...), es una tabla orientativa sobre las características más destacables y los factores limitantes de cada técnica.

Tabla 1. Comparación de los diferentes métodos de detección directos de rEPO vigentes y en desarrollo con sus características más notables y sus principales limitaciones. Verde: representa un punto fuerte y destacable; Amarillo: representa un nivel intermedio, con capacidad de mejora, pero no limitante; Naranja: representa un factor limitante y necesidad de mejora. (***): indica nivel/valor alto; (**): indica nivel/valor intermedio; (*): indica nivel/valor bajo. (-): falta de información/datos en el estudio

Método	Sensibilidad	Ventana de detección	Coste	Tiempo necesario	Dificultad-requerimientos técnicos	Reproducibilidad	Referencia
IEF-PAGE	**	**	***	***	*	***	(Martin et al., 2021) (Reichel et al., 2023)
SDS-/SAR-PAGE	***	***	***	***	*	***	(Martin et al., 2021) (Reichel et al., 2023)
EPO WGA MAIIA	**	*	*	*	*	**	(Dehnes et al., 2013) (Mørkeberg et al., 2014)
nanoLC-HRMS	*	-	***	***	***	*	(Seo et al., 2023)
WCES	*	-	*	*	**	*	(Desharnais et al., 2018)
Sensor electroquímico	**	-	*	*	***	**	(Hassanain et al., 2018)
Sensor óptico	**	-	*	*	**	**	(Gholami, Theiss, et al., 2020)
SERS	**	-	*	*	***	**	(Hassanain et al., 2022)

8. Perspectivas de futuro

Métodos alternativos

Los métodos electroforéticos actuales necesitan de una continua optimización, sobre todo para la reducción de costes y tiempo. Respecto a los métodos alternativos directos, es importante continuar el desarrollo de métodos rápidos y poco costosos como son el EPO WGA MAIIA, sensores electroquímicos o incluso SERS. El principal objetivo es su uso como ITP. De forma que los métodos electroforéticos sean solo necesarios como CP. Sin embargo, se necesitan estudios más detallados y estandarizados respecto a su detección de micro dosis de rEPO en atletas o pacientes, sobre todo enfocados en su sensibilidad, reproducibilidad y ventana de detección.

Matrices biológicas

Otra de las vías de mejora para el aumento de pruebas antidopaje durante el año es el uso de matrices biológicas más sencillas y cómodas como son los *Dried Blood Spots* (DBSs). Los DBSs son una prueba de sangre seca que solo requiere de unas pequeñas gotas de sangre, normalmente por un pinchazo en el dedo, siendo aplicadas a un tipo especial de soporte absorbente como es el papel. (WADA, 2021).

Los DBSs han sido estudiados como matriz para la detección de un gran nombre de sustancias dopantes, entre ellas la rEPO. (Reverter-Branchat et al., 2018. Recientemente Heiland et al. con únicamente 60 µL de DBSs, consiguió detectar los 4 AREs principales por SAR-PAGE con límites de detección decentes teniendo en cuenta el volumen de muestra, y sin ningún problema de estabilidad de los analitos durante el proceso (Heiland et al., 2022).

En 2021 la WADA aprobó el análisis de DBSs, siendo aplicado por primera vez en los juegos de invierno de Beijing (WADA, 2021). Por tanto, su uso como matriz complementaria de la orina supondría una gran mejora en todo el proceso logístico y analítico involucrado en el manejo de muestras sanguíneas.

Desarrollo del PBA

Respecto al módulo hematológico del PBA, nuevas variables hematológicas y biomarcadores fiables son necesarios para un seguimiento y control más

preciso. Tal y como se ha mencionado, una potencial opción son las proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro entre las cuales destacan la transferrina y la ferritina, junto a la hepcidina y eritroferrona. La monitorización de biomarcadores de mRNA o miRNA con una gran sensibilidad a cambios eritropoyéticos son otra vía de investigación a largo plazo.

Tal y como se ha comentado, una recolección, transporte y almacenaje de las muestras eficaz, barato y sencillo es muy importante debido a la gran cantidad de análisis que requiere el PBA durante el año. Además de DBSs, la recolección de sangre capilar utilizando un dispositivo micro volumétrico ha sido propuesta como posible matriz (Goodrum et al., 2022). Estas alternativas podrían mejorar la actual recolección de muestras de sangre convencional por extracción venosa, la cual puede llegar a ser cara, invasiva e incómoda tanto en su recolección como en su transporte y análisis.

Por otro lado, la aplicación de inteligencia artificial para el análisis y procesamiento de datos ha sido sujeto de estudio durante los últimos años en el antidopaje (Manfredini et al., 2011; Montagna & Hopker, 2018). Su uso podría ser una gran oportunidad de futuro en el seguimiento del módulo hematológico del PBA (Hopker et al., 2020; Rahman et al., 2022).

Nuevas sustancias y métodos dopantes

Nuevos AEEs son sintetizados y diseñados cada año por las farmacéuticas para ser ensayados y probados en el tratamiento de la anemia, pudiendo ser utilizadas con objetivos dopantes. Un ejemplo son el *Luspatercept* y *Sotatercept*, los cuales han sido incluidos en la lista de sustancias prohibidas de la WADA recientemente. Estas dos sustancias sintéticas son capaces de actuar sinérgicamente con rEPO, potenciando la estimulación de eritrocitos con una menor dosis de rEPO (Desharnais & Naud, 2022; Marchand et al., 2022).

El avance en la manipulación del ADN ha abierto puertas en la terapia génica. Diferentes estudios han investigado el uso de terapia génica del gen Epo en pacientes con anemia crónica (Jelkmann & Lundby, 2011). Estas estrategias podrían ser adoptadas y empleadas en un futuro en prácticas dopantes. De hecho, diferentes métodos de detección de dopaje génico de EPO han sido

propuestos y estudiados para su prevención(Marchand et al., 2021; Sugasawa et al., 2021).

En definitiva, el continuo desarrollo de métodos de detección es muy importante no sólo para la detección de rEPO sino también por la aparición de nuevas metodologías y sustancias dopantes.

9. Conclusiones

Los métodos actuales tienen una gran sensibilidad y selectividad, pero su corta ventana de detección y el alto coste y tiempo necesario impide un control fiable y eficaz de la administración de micro dosis de rEPO a lo largo del año.

Por otro lado, la mayoría de los métodos alternativos directos presentados, pese a ser más rápidos y accesibles, tienen una sensibilidad y selectividad menor, por lo que se deben continuar desarrollando y optimizando estas técnicas analíticas. Además, nuevos estudios de métodos directos con una misma isoforma de rEPO, cantidad y administración, e incluso matriz y sujetos, son necesarios para una mejor comparación de parámetros y características, como la sensibilidad o la ventana de detección, entre otros.

Los métodos indirectos como el PBA tienen un gran potencial en el antidopaje por micro dosis de rEPO. Sin embargo, continúa siendo muy impreciso, necesitando de nuevos biomarcadores y variables hematológicas fiables y certeras.

En conclusión, a pesar del gran número de tipos de métodos y sus vías de desarrollo mencionados en este trabajo, continúa habiendo una falta de métodos precisos y accesibles que permitan un control y seguimiento exhaustivo del uso de rEPO durante todo el año.

10. Referencias bibliográficas

- Anti-Doping Testing Figures Report | World Anti Doping Agency*. Retrieved June 12, 2023, from <https://www.wada-ama.org/en/resources/anti-doping-stats/anti-doping-testing-figures-report>
- Arezes, J., Foy, N., McHugh, K., Sawant, A., Quinkert, D., Terraube, V., Brinth, A., Tam, M., LaVallie, E. R., Taylor, S., Armitage, A. E., Pasricha, S. R., Cunningham, O., Lambert, M., Draper, S. J., Jasuja, R., & Drakesmith, H. (2018). Erythroferrone inhibits the induction of hepcidin by BMP6. *Blood*, *132*(14), 1473–1477.
- Astolfi, T., Crettaz von Roten, F., Kayser, B., Saugy, M., & Faiss, R. (2021). The Influence of Training Load on Hematological Athlete Biological Passport Variables in Elite Cyclists. *Frontiers in Sports and Active Living*, *3*, 618285.
- Athlete Biological Passport (ABP) Operating Guidelines | World Anti Doping Agency*. Retrieved June 5, 2023, from <https://www.wada-ama.org/en/resources/world-anti-doping-program/athlete-biological-passport-abp-operating-guidelines>
- Bahadir, E. B., & Sezgintürk, M. K. (2015). Electrochemical biosensors for hormone analyses. *Biosensors and Bioelectronics*, *68*, 62–71.
- Bornø, A., Aachmann-Andersen, N. J., Munch-Andersen, T., Hulston, C. J., & Lundby, C. (2010). Screening for recombinant human erythropoietin using [Hb], reticulocytes, the OFF(hr score), OFF(z score) and Hb(z score): status of the Blood Passport. *European Journal of Applied Physiology*, *109*(3), 537–543.
- Breenfeldt Andersen, A., Bejder, J., Bonne, T. C., Sørensen, H., Sørensen, H., Jung, G., Ganz, T., Nemeth, E., Secher, N. H., Johansson, P. I., & Nordsborg, N. B. (2022). Hepcidin and Erythroferrone Complement the Athlete Biological Passport in the Detection of Autologous Blood Transfusion. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *54*(9), 1604–1616.
- Breenfeldt Andersen, A., Graae, J., Bejder, J., Bonne, T. C., Seier, S., Debertin, M., Eibye, K., Hostrup, M., & Nordsborg, N. B. (2023). Microdoses of Recombinant Human Erythropoietin Enhance Time Trial Performance in Trained Males and Females. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *55*(2), 311–321.
- Camaschella, C., Nai, A., & Silvestri, L. (2020). Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. *Haematologica*, *105*(2), 260–272.
- Coffman, K. E., Mitchell, K. M., Salgado, R. M., Miller, G. D., Kenefick, R. W., & Chevront, S. N. (2020). Potential for dehydration to impact the athlete biological passport. *Drug Testing and Analysis*, *12*(8), 1206–1211.
- Coyne, D. W., Goldsmith, D., & Macdougall, I. C. (2017). New options for the anemia of chronic kidney disease. *Kidney International Supplements*, *7*(3), 157–163.
- de Frutos, M., Cifuentes, A., & Diez-Masa, J. C. (2003). Differences in capillary electrophoresis profiles of urinary and recombinant erythropoietin. *Electrophoresis*, *24*(4), 678–680.
- Dehnes, Y., Lamon, S., & Lönnberg, M. (2010). Erythropoietin (EPO) immunoaffinity columns—A powerful tool for purifying EPO and its recombinant analogues. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *53*(4), 1028–1032.
- Dehnes, Y., Miller, G., Naud, J., Martin, L., Reihlen, P., & Reichel, C. (2020). *Inter-laboratory validation of biotinylated clone AE7A5EPO-antibody for EPO detection by single blotting of urine and blood samples* (p. 194). Sportverlag Strauß. <https://fis.dshs-koeln.de/en/publications/inter-laboratory-validation-of-biotinylated-clone-ae7a5epo-antibo>
- Dehnes, Y., Shalina, A., & Myrvold, L. (2013). Detection of recombinant EPO in blood and urine samples with EPO WGA MAIIA, IEF and SAR-PAGE after microdose injections. *Drug Testing and Analysis*, *5*(11–12), 861–869.
- Desharnais, P., & Naud, J. F. (2022). Detection of activin receptor type IIA and IIB-Fc fusion proteins by automated capillary immunoassay. *Drug Testing and Analysis*, *14*(11–12), 1938–1951.
- Desharnais, P., Naud, J. F., & Ayotte, C. (2017). Immunomagnetic beads-based isolation of erythropoietins from urine and blood for sports anti-doping control. *Drug Testing and Analysis*, *9*(11–12), 1744–1752.
- Desharnais, P., Naud, J. F., & Ayotte, C. (2018). Detection of erythropoiesis stimulating agents in urine samples using a capillary Western system. *Drug Testing and Analysis*, *10*(11–12), 1698–1707.
- Dhurjad, P., Jaiswal, P., Gupta, K., Wanjari, P., & Sonti, R. (2022). *Mass spectrometry: A key tool in anti-doping*.
- Dou, P., Liu, Z., He, J., Xu, J. J., & Chen, H. Y. (2008). Rapid and high-resolution glycoform profiling of recombinant human erythropoietin by capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection. *Journal of Chromatography. A*, *1190*(1–2), 372–376.
- Eklblom, B., Goldbarg, A. N., & Gullbring, B. (1972). Response to exercise after blood loss and reinfusion. <https://doi.org/10.1152/Jappl.1972.33.2.175>, 33(2), 175–180.

- Equey, T., Sletten, C., Dehnes, Y., D'Onofrio, G., Brugnara, C., Baume, N., & Aikin, R. (2022). Standardization of reticulocyte counts in the athlete biological passport: A practical update. *International Journal of Laboratory Hematology*, *44*(1), 112–117.
- Franz, S. E. (2009). Erythropoiesis-stimulating agents: development, detection and dangers. *Drug Testing and Analysis*, *1*(6), 245–249.
- Furst, A. L., Muren, N. B., Hill, M. G., & Barton, J. K. (2014). Label-free electrochemical detection of human methyltransferase from tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(42), 14985–14989.
- Gasparello, J., Lamberti, N., Papi, C., Lampronti, I., Cosenza, L. C., Fabbri, E., Bianchi, N., Zambon, C., Dalla Corte, F., Govoni, M., Reverberi, R., Manfredini, F., Gambari, R., & Finotti, A. (2019). Altered erythroid-related miRNA levels as a possible novel biomarker for detection of autologous blood transfusion misuse in sport. *Transfusion*, *59*(8), 2709–2721.
- Gholami, M. D., Sonar, P., Ayoko, G. A., & Izake, E. L. (2020). A highly sensitive SERS quenching nanosensor for the determination of tumor necrosis factor alpha in blood. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *310*, 127867.
- Gholami, M. D., Theiss, F., Sonar, P., Ayoko, G. A., & Izake, E. L. (2020). Rapid and selective detection of recombinant human erythropoietin in human blood plasma by a sensitive optical sensor. *Analyst*, *145*(16), 5508–5515.
- Goodrum, J. M., Lewis, L. A., Fedoruk, M. N., Eichner, D., & Miller, G. D. (2022). Feasibility of microvolumetric capillary whole blood collections for usage in Athlete Biological Passport analysis. *Drug Testing and Analysis*, *14*(7), 1291–1299.
- Guan, Y., Zhang, M., Gaikwad, M., Voss, H., Fazel, R., Ansari, S., Shen, H., Wang, J., & Schlüter, H. (2021). An Integrated Strategy Reveals Complex Glycosylation of Erythropoietin Using Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*, *20*(7), 3654–3663.
- Haider, T., Diaz, V., Albert, J., Alvarez-Sanchez, M., Thiersch, M., Maggiorini, M., Hilty, M. P., Spengler, C. M., & Gassmann, M. (2020). A Single 60.000 IU Dose of Erythropoietin Does Not Improve Short-Term Aerobic Exercise Performance in Healthy Subjects: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Crossover Trial. *Frontiers in Physiology*, *11*, 537389.
- Haile, D. W., Durussel, J., Mekonen, W., Ongaro, N., Anjila, E., Mooses, M., Daskalaki, E., Mooses, K., McClure, J. D., Sutehall, S., & Pitsiladis, Y. P. (2019). Effects of EPO on Blood Parameters and Running Performance in Kenyan Athletes. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *51*(2), 299–307.
- Hassanain, W. A., Sivanesan, A., Izake, E. L., & Ayoko, G. A. (2018). An electrochemical biosensor for the rapid detection of erythropoietin in blood. *Talanta*, *189*, 636–640.
- Hassanain, W. A., Theiss, F. L., & Izake, E. L. (2022). Label-free identification of Erythropoietin isoforms by surface enhanced Raman spectroscopy. *Talanta*, *236*, 122879.
- Heiland, C. E., Ericsson, M., Pohanka, A., Ekström, L., & Marchand, A. (2022). Optimizing detection of erythropoietin receptor agonists from dried blood spots for anti-doping application. *Drug Testing and Analysis*, *14*(8), 1377–1386.
- Heiland, C. E., Masquelier, M., Bhuiyan, H., & Ericsson, M. (2019). A simple method to immunopurify erythropoiesis stimulating agents from urine, aiming to optimize erythropoietin screening by SAR-PAGE. *Drug Testing and Analysis*, *11*(11–12), 1666–1674.
- Heiland, C. E., Schickel, Y., Lehtihet, M., Börjesson, A., & Ekström, L. (2023). Supra-physiological doses of anabolic androgenic steroids impact erythropoietin and blood parameters. *Drug Testing and Analysis*, *15*(6).
- Honda, H., Kobayashi, Y., Onuma, S., Shibagaki, K., Yuza, T., Hirao, K., Yamamoto, T., Tomosugi, N., & Shibata, T. (2016). Associations among Erythroferrone and Biomarkers of Erythropoiesis and Iron Metabolism, and Treatment with Long-Term Erythropoiesis-Stimulating Agents in Patients on Hemodialysis. *PLOS ONE*, *11*(3), e0151601.
- Hopker, J., Griffin, J., Brookhouse, J., Peters, J., Schumacher, Y. O., & Iljukov, S. (2020). Performance profiling as an intelligence-led approach to antidoping in sports. *Drug Testing and Analysis*, *12*(3), 402–409.
- Jelkmann, W. (2012). Biosimilar recombinant human erythropoietins (“epoetins”) and future erythropoiesis-stimulating treatments. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *12*(5), 581–592.
- Jelkmann, W., & Jelkmann, W. (2011). Regulation of erythropoietin production. *The Journal of Physiology*, *589*(6), 1251–1258.
- Jelkmann, W., & Lundby, C. (2011). Blood doping and its detection. *Blood*, *118*(9), 2395–2404.
- Jeppesen, J. S., Breenfeldt Andersen, A., Bonne, T. C., Thomassen, M., Sørensen, H., Nordsborg, N. B., Olsen, N. V., Huertas, J. R., & Bejder, J. (2021). Immature reticulocytes are sensitive and specific to low-dose erythropoietin treatment at sea level and altitude. *Drug Testing and Analysis*, *13*(7), 1331–1340.

- Jin, L., Wang, J., & Wu, L. (2023). ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR FOR ERYTHROPOIETIN DETECTION IN ATHLETES. *Revista Brasileira de Medicina Do Esporte*, 29, e2022_0419.
- Kautz, L., Jung, G., Valore, E. V., Rivella, S., Nemeth, E., & Ganz, T. (2014). Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nature Genetics*, 46(7), 678–684.
- Kohler, M., Ayotte, C., Desharnais, P., Flenker, U., Lüdke, S., Thevis, M., Völker-Schänzer, E., & Schänzer, W. (2008). Discrimination of recombinant and endogenous urinary erythropoietin by calculating relative mobility values from SDS gels. *International Journal of Sports Medicine*, 29(1), 1–6.
- Lasne, F., & De Ceaurriz, J. (2000). Recombinant erythropoietin in urine. *Nature* 2000 405:6787, 405(6787), 635–635.
- Lasne, F., Martin, L., Martin, J. A., & de Ceaurriz, J. (2007). Isoelectric profiles of human erythropoietin are different in serum and urine. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41(3), 354–357.
- Leuenberger, N., Bulla, E., Salamin, O., Nicoli, R., Robinson, N., Baume, N., & Saugy, M. (2017). Hepcidin as a potential biomarker for blood doping. *Drug Testing and Analysis*, 9(7), 1093–1097.
- Leuenberger, N., & Saugy, M. (2015). Circulating microRNAs: The future of biomarkers in anti-doping field. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 888, 401–408.
- Liu, Q., Davidoff, O., Niss, K., & Haase, V. H. (2012). Hypoxia-inducible factor regulates hepcidin via erythropoietin-induced erythropoiesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(12), 4635–4644.
- Lönnerberg, M., Andrén, M., Birgegrd, G., Drevin, M., Garle, M., & Carlsson, J. (2012). Rapid detection of erythropoiesis-stimulating agents in urine and serum. *Analytical Biochemistry*, 420(2), 101–114.
- Lönnerberg, M., Dehnes, Y., Drevin, M., Garle, M., Lamon, S., Leuenberger, N., Quach, T., & Carlsson, J. (2010). Rapid affinity purification of erythropoietin from biological samples using disposable monoliths. *Journal of Chromatography. A*, 1217(45), 7031–7037.
- Loria, F., Cox, H. D., Voss, S. C., Rocca, A., Miller, G. D., Townsend, N., Georgakopoulos, C., Eichner, D., Kuuranne, T., & Leuenberger, N. (2022). The use of RNA-based 5'-aminolevulinatase 2 biomarkers in dried blood spots to detect recombinant human erythropoietin microdoses. *Drug Testing and Analysis*, 14(5), 826–832.
- Macdougall, I. C., Matcham, J., Gray, S. J., Bargman, J., Barre, P., Coles, G. A., Gokal, R., Jindal, K., Maxwell, A. P., Mignon, F., Richardson, R., Tomson, C., Walls, J., & Winearls, C. (2003). Correction of anaemia with darbepoetin alfa in patients with chronic kidney disease receiving dialysis. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 18(3), 576–581.
- Manfredini, A. F., Malagoni, A. M., Litmanen, H., Zhukovskaja, L., Jeannier, P., Dal Follo, D., Felisatti, M., Besseberg, A., Geistlinger, M., Bayer, P., & Carrabre, J. E. (2011). Performance and blood monitoring in sports: the artificial intelligence evoking target testing in antidoping (AR.I.E.T.T.A.) project. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 51(1), 153–159. <https://europepmc.org/article/med/21297575>
- Marchand, A., Miller, G., Martin, L., Gobbo, C., Crouch, A. K., Eichner, D., & Ericsson, M. (2022). Detection of erythropoiesis stimulating agent Luspatercept after administration to healthy volunteers for antidoping purposes. *Drug Testing and Analysis*, 14(11–12), 1952–1961.
- Marchand, A., Roulland, I., Semence, F., & Ericsson, M. (2021). EPO transgene detection in dried blood spots for antidoping application. *Drug Testing and Analysis*, 13(11–12), 1888–1896.
- Marchand, A., Roulland, I., Semence, F., Schröder, K., Domergue, V., & Audran, M. (2019). Detection of Hypoxia-Regulated MicroRNAs in Blood as Potential Biomarkers of HIF Stabilizer Molidustat. *MicroRNA*, 8(3), 189–197.
- Martin, L., Ashenden, M., Bejder, J., Hoffmann, M., Nordsborg, N., Karstoft, K., Morkeberg, J., Sharpe, K., Lasne, F., & Marchand, A. (2016). New insights for identification of doping with recombinant human erythropoietin micro-doses after high hydration. *Drug Testing and Analysis*, 8(11–12), 1119–1130.
- Martin, L., Martin, J. A., Collot, D., Hoang, O., Audran, M., Ericsson, M., & Marchand, A. (2021). Improved detection methods significantly increase the detection window for EPO microdoses. *Drug Testing and Analysis*, 13(1), 101–112.
- Miller, G. D., Husk, J., Crouch, A. K., & Eichner, D. (2022). EPO and the athlete biological passport: Hematological results from a placebo-controlled, boosting and microdose EPO administration in male recreational athletes. *Drug Testing and Analysis*, 14(11–12), 1962–1973.
- Montagna, S., & Hopker, J. (2018). A bayesian approach for the use of athlete performance data within anti-doping. *Frontiers in Physiology*, 9(JUL), 355950.
- Mørkeberg, J., Sharpe, K., Karstoft, K., & Ashenden, M. J. (2014). Detection of microdoses of rhEPO with the MAIIA test. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 24(4), 634–641.
- Nadim, A. H., Abd El-Aal, M. A., Al-Ghobashy, M. A., & El-Saharty, Y. S. (2021). Facile imprinted polymer for label-free highly selective potentiometric sensing of proteins: case of recombinant human erythropoietin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(14), 3611–3623.

- Okano, M., Sato, M., & Kageyama, S. (2014). Identification of the long-acting erythropoiesis-stimulating agent darbepoetin alfa in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(5), 1317–1329.
- Onuma, S., Honda, H., Kobayashi, Y., Yamamoto, T., Michihata, T., Shibagaki, K., Yuza, T., Hirao, K., Tomosugi, N., & Shibata, T. (2015). Effects of Long-Term Erythropoiesis-Stimulating Agents on Iron Metabolism in Patients on Hemodialysis. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 19(6), 582–589.
- Paleček, E., Tkáč, J., Bartošík, M., Bertók, T., Ostatná, V., & Paleček, J. (2015). Electrochemistry of nonconjugated proteins and glycoproteins. Toward sensors for biomedicine and glycomics. *Chemical Reviews*, 115(5), 2045–2108.
- Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J., & Ganz, T. (2001). Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 7806–7810.
- Peng, C., Ji, H., & Wang, Z. (2022). ELECTROCHEMICAL SCIENCE An Electrochemical Biosensor Based on Gold Nanoparticles/Carbon Nanotubes Hybrid for Determination of recombinant human erythropoietin in human blood plasma. *International Journal of Int. J. Electrochem. Sci*, 17, 221127–221129.
- Postnikov, P., Krotov, G., Mesonzhnik, N., Efimova, Y., & Rodchenkov, G. (2015). Fc-fragment removal allows the EPO-Fc fusion protein to be detected in blood samples by IEF-PAGE. *Drug Testing and Analysis*, 7(11–12), 999–1008.
- Rahman, M. R., Bejder, J., Bonne, T. C., Andersen, A. B., Huertas, J. R., Aikin, R., Nordsborg, N. B., & Maaß, W. (2022). AI-based approach for improving the detection of blood doping in sports. <https://arxiv.org/abs/2203.00001v1>
- Ramirez Cuevas, K., Schobinger, C., Gottardo, E., Voss, S. C., Kuuranne, T., Tissot, J. D., Favrat, B., Townsend, N., & Leuenberger, N. (2020). Erythroferrone as a sensitive biomarker to detect stimulation of erythropoiesis. *Drug Testing and Analysis*, 12(2), 261–267.
- Reichel, C., Erceg, D., Lorenc, B., Scheiblhofer, V., Farmer, L., Zanitzer, K., Geisendorfer, T., Gmeiner, G., & Thevis, M. (2023). Data from a microdosed recombinant human erythropoietin administration study applying the new biotinylated clone AE7A5 antibody and a further optimized sarcosyl polyacrylamide gel electrophoresis protocol. *Drug Testing and Analysis*, 15(2), 163–172.
- Reichel, C., Gmeiner, G., Reihlen, P., Thevis, M., & Schänzer, W. (2019). SARCOSYL-PAGE: Optimized Protocols for the Separation and Immunological Detection of PEGylated Proteins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1855, 131–149.
- Reihlen, P., Blobel, M., Kempkes, R., Reichel, C., Völker Schänzer, E., Majer, B., & Schänzer, W. (2015). Optimizing SAR-PAGE. *Drug Testing and Analysis*, 7(11–12), 1014–1016.
- Reverter-Branchat, G., Ventura, R., Ezzel Din, M., Mateus, J., Pedro, C., & Segura, J. (2018). Detection of erythropoiesis-stimulating agents in a single dried blood spot. *Drug Testing and Analysis*, 10(10), 1496–1507.
- Robach, P., Gammella, E., Recalcati, S., Girelli, D., Castagna, A., Roustit, M., Lundby, C., Lundby, A. K., Bouzat, P., Vergès, S., Séchaud, G., Banco, P., Uhr, M., Cornu, C., Sallet, P., & Cairo, G. (2021). Induction of erythroferrone in healthy humans by micro-dose recombinant erythropoietin or high-altitude exposure. *Haematologica*, 106(2), 384–390.
- Robinson, N., Sottas, P. E., & Schumacher, Y. O. (2017). The Athlete Biological Passport: How to Personalize Anti-Doping Testing across an Athlete's Career? *Medicine and Sport Science*, 62, 107–118.
- Salamin, O., De Angelis, S., Tissot, J. D., Saugy, M., & Leuenberger, N. (2016). Autologous Blood Transfusion in Sports: Emerging Biomarkers. *Transfusion Medicine Reviews*, 30(3), 109–115.
- Salamin, O., Gottardo, E., Schobinger, C., Reverter-Branchat, G., Segura, J., Saugy, M., Kuuranne, T., Tissot, J. D., Favrat, B., & Leuenberger, N. (2019). Detection of Stimulated Erythropoiesis by the RNA-Based 5'-Aminolevulinic Synthase 2 Biomarker in Dried Blood Spot Samples. *Clinical Chemistry*, 65(12), 1563–1571.
- Saugy, J. J., Schmoutz, T., & Botrè, F. (2022). Altitude and Erythropoietin: Comparative Evaluation of Their Impact on Key Parameters of the Athlete Biological Passport: A Review. *Frontiers in Sports and Active Living*, 4, 864532.
- Saugy, M., Lundby, C., & Robinson, N. (2014). Monitoring of biological markers indicative of doping: the athlete biological passport. *British Journal of Sports Medicine*, 48(10), 827–832.
- Selbes, Y. S., Caglayan, M. G., Eryilmaz, M., Boyaci, I. H., Saglam, N., Basaran, A. A., & Tamer, U. (2016). Surface-enhanced Raman probe for rapid nanoextraction and detection of erythropoietin in urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(29), 8447–8456.
- Seo, Y., Park, J., Lee, H. J., Kim, M., Kang, I., Son, J., Oh, M. K., & Min, H. (2023). Development and validation of a method for analyzing the sialylated glycopeptides of recombinant erythropoietin in urine using LC–HRMS. *Scientific Reports 2023 13:1*, 13(1), 1–10.

- Skibeli, V., Nissen-Lie, G., & Torjesen, P. (2001). Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood*, *98*(13), 3626–3634.
- Smith, W. B., Dowell, J. A., & Pratt, R. D. (2007). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of epoetin delta in two studies in healthy volunteers and two studies in patients with chronic kidney disease. *Clinical Therapeutics*, *29*(7), 1368–1380.
- Sottas, P. E., Robinson, N., Rabin, O., & Saugy, M. (2011). The athlete biological passport. *Clinical Chemistry*, *57*(7), 969–976.
- Sugasawa, T., Nakano, T., Fujita, S. I., Matsumoto, Y., Ishihara, G., Aoki, K., Yanazawa, K., Ono, S., Tamai, S., Manevich, L., Ueda, H., Ishibashi, N., Tamai, K., Kanki, Y., Yoshida, Y., Watanabe, K., Takemasa, T., Kawakami, Y., & Takekoshi, K. (2021). Proof of gene doping in a mouse model with a human erythropoietin gene transferred using an adenoviral vector. *Genes*, *12*(8), 1249.
- TD2022EPO | World Anti Doping Agency. (n.d.). Retrieved June 18, 2023, from <https://www.wada-ama.org/en/resources/lab-documents/td2022epo>
- Verneq, A. R. (2014). The Athlete Biological Passport: an integral element of innovative strategies in antidoping. *British Journal of Sports Medicine*, *48*(10), 817–819.
- Vogel, M., Blobel, M., Thomas, A., Walpurgis, K., Schänzer, W., Reichel, C., & Thevis, M. (2014). Isolation, enrichment, and analysis of erythropoietins in anti-doping analysis by receptor-coated magnetic beads and liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, *86*(24), 12014–12021.
- Vogel, M., Thomas, A., Schänzer, W., & Thevis, M. (2015). EPOR-Based Purification and Analysis of Erythropoietin Mimetic Peptides from Human Urine by Cys-Specific Cleavage and LC/MS/MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *26*(9), 1617–1625.
- Voss, S. C., Orié, N. N., El-Saftawy, W., Saghbazarian, S., Al-Kaabi, A., Georgakopoulos, C., Athanasiadou, I., Mohamed-Ali, V., & Al-Maadheed, M. (2021). Horseradish-peroxidase-conjugated anti-erythropoietin antibodies for direct recombinant human erythropoietin detection: Proof of concept. *Drug Testing and Analysis*, *13*(3), 529–538.
- Wang, G., Durussel, J., Shurlock, J., Moores, M., Fuku, N., Bruinvels, G., Pedlar, C., Burden, R., Murray, A., Yee, B., Keenan, A., McClure, J. D., Sottas, P. E., & Pitsiladis, Y. P. (2017). Validation of whole-blood transcriptome signature during microdose recombinant human erythropoietin (rHuEpo) administration. *BMC Genomics*, *18*(8), 67–80.
- Wang, G., Kitaoka, T., Crawford, A., Mao, Q., Hesketh, A., Guppy, F. M., Ash, G. I., Liu, J., Gerstein, M. B., & Pitsiladis, Y. P. (2021). Cross-platform transcriptomic profiling of the response to recombinant human erythropoietin. *Scientific Reports 2021 11:1*, *11*(1), 1–14.
- Weiss, G., Houston, T., Kastner, S., Jöhrer, K., Grünewald, K., & Brock, J. H. (1997). Regulation of Cellular Iron Metabolism by Erythropoietin: Activation of Iron-Regulatory Protein and Upregulation of Transferrin Receptor Expression in Erythroid Cells. *Blood*, *89*(2), 680–687.
- With dried blood spot analysis, anti-doping science is pushing the boundaries at Beijing 2022 and beyond | World Anti Doping Agency. (n.d.). Retrieved June 3, 2023, from <https://www.wada-ama.org/en/news/dried-blood-spot-analysis-anti-doping-science-pushing-boundaries-beijing-2022-and-beyond>
- Yasuoka, Y., Fukuyama, T., Izumi, Y., Yamashita, T., Nakayama, Y., Inoue, H., Yanagita, K., Oshima, T., Yamazaki, T., Uematsu, T., Kobayashi, N., Shimada, Y., Nagaba, Y., Mukoyama, M., Sato, Y., Sands, J. M., Kawahara, K., & Nonoguchi, H. (2020). Differentiation of endogenous erythropoietin and exogenous ESAs by Western blotting. *Heliyon*, *6*(11), e05389.
- Zheng, X. S., Jahn, I. J., Weber, K., Cialla-May, D., & Popp, J. (2018). Label-free SERS in biological and biomedical applications: Recent progress, current challenges and opportunities. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *197*, 56–77.
- Zhou, X., He, S., Zhang, L., Shen, L., & He, C. (2020). Research on spiking rat EPO as internal standard in doping control samples for detection of EPO using SAR-PAGE analysis with biotinylated primary antibody. *Drug Testing and Analysis*, *12*(8), 1054–1064.
- Zhou, X., Zhang, L., He, S., Shen, L., & He, C. (2020). Comparison and optimization of SAR-PAGE tests for erythropoietins in doping analysis. *Drug Testing and Analysis*, *12*(1), 109–118.