

**Detección cromatográfica del péptido liberador de la hormona de crecimiento 6 y
curcuminoides en muestras biológicas y su aplicación en el deporte**

Ruben Adolfo Guerrero Rodriguez

Universidad Nacional Abierta y a Distancia
Escuela De Ciencias Básicas, Tecnología E Ingeniería
Programa De Química
CEAD De Bucaramanga
Diciembre 2021

**Detección cromatográfica del péptido liberador de la hormona de crecimiento 6 y curcuminoides
en muestras biológicas y su aplicación en el deporte**

Ruben Adolfo Guerrero Rodriguez

Monografía presentada como requisito parcial para obtener el título de Químico

Director:

Leonardo Bonilla Ramirez, Ph.D

Universidad Nacional Abierta y a Distancia -UNAD-
Escuela De Ciencias Básicas, Tecnología E Ingeniería -ECBTI-
Programa De Química
CEAD De Bucaramanga
Diciembre 2021

Dedicatoria

Lleno de esperanza, dedico esta tesis, a cada uno de mis seres queridos, quienes han sido mis pilares para seguir adelante. Es para mí una gran satisfacción poder dedicarles a ellos, que con mucho esfuerzo, esmero y trabajo me lo he ganado.

A mis padres, porque ellos son la motivación de mi vida.

A mis hermanas, porque son la razón de sentirme tan orgulloso de culminar mi meta, gracias a ellos por confiar siempre en mí.

A mi esposa que ha sido el impulso, el pilar principal, con su apoyo constante, mi amiga y mi compañera inseparable fuente de sabiduría, calma y consejera en todo momento en la culminación de mi carrera y en especial a mi bebé que viene en camino iluminando mi vida.

A mi asesor de tesis, Leonardo Bonilla, por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, por la dedicación, la paciencia del mundo y el apoyo brindado durante el desarrollo de este trabajo. Al proyecto PIEECBTI00272019.

A la Escuela de Ciencias Básicas Tecnología e Ingeniería.

A la Universidad Nacional Abierta y Distancia.

Resumen

Este trabajo fue desarrollado para evaluar los reportes de la aplicación de métodos cromatográficos para detectar compuestos de interés en el área del deporte como la hormona GHRP 6 en dopaje y compuestos antioxidantes como curcuminoides en la recuperación muscular de los deportistas. Estas sustancias generan una serie de beneficios en el desempeño físico de las personas y ha sido prescrito para superar condiciones de pacientes que presentan deficiencias en su proceso de crecimiento y en otros aspectos de su evolución física, por lo que han sido empleados por atletas que intentan superar las crecientes exigencias del deporte de altacompetencia y recuperar su estado físico posterior a competencias.

El trabajo muestra la aplicación de las técnicas cromatográficas, para la identificación de compuestos de alto interés en el área del deporte de alto rendimiento y evidencia la importancia del uso de estas técnicas de química analítica e instrumental para el desarrollo y evolución de áreas del ser humano, en aras de mejorar la ética del deporte.

Palabras claves: cromatografía, hormona GHRP 6, dopaje, curcumina.

Abstract

This work was developed to evaluate the reports of the application of chromatographic methods to detect compounds of interest in the area of sports such as the hormone GHRP 6 in doping and antioxidant compounds such as curcuminoids in the muscle recovery of athletes. These substances generate a series of benefits in the physical performance of people and have been prescribed to overcome conditions of patients who have deficiencies in their growth process and in other aspects of their physical evolution, for which they have been used by athletes who try overcome the increasing demands of highly competitive sport and regain their physical condition after competitions.

The work on the application of chromatographic techniques for the identification of compounds of high interest in the area of high performance sports and shows the importance of using these analytical and instrumental chemistry techniques for the development and evolution of areas of the human being. for the sake of improving the ethics of sport.

Keywords: chromatography, GHRP 6 hormone, doping, curcumin.

Tabla de Contenido

Introducción.....	10
Planteamiento del problema	12
Justificación.....	13
Objetivos.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos.....	15
Diseño metodológico.....	16
Método.....	16
Criterios de inclusión.....	17
Criterios de exclusión.....	18
Control de calidad de las fuentes secundarias.....	18
Técnica para la recolección de la información.....	21
Procesamiento de la información.....	22
Resultados.....	23
Estructura y función de las moléculas GHRP-6 y Curcuminoides.....	23
Péptido liberador de la hormona de crecimiento: GHRP-6.....	23
Curcumina y curcuminoides.....	28
Metabolismo de la GHRP-6 y curcuminoides en el organismo.....	30
Metabolismo de la GHRP-6.....	30
Metabolismo de la curcumina y curcuminoides.....	37
Importancia de la GHRP-6 y los antioxidantes en el deporte.....	39

Lista de tablas

Tabla1. Descriptores empleados para la búsqueda de publicaciones.....	16
Tabla 2. Evaluación de calidad	19
Tabla 3. Estructuras primarias de péptidos con actividad de secretagogo de hormona de crecimiento.....	27

Lista de figuras

Figura 1. Proceso general de selección	21
Figura 2. Estructura secundaria GH.....	24
Figura 3. Localización y organización estructural de la familia de genes Hgh	25
Figura 4. Estructura de la curcumina y curcuminoides.....	29
Figura 5. Datos de la Hormona del Crecimiento.....	31
Figura 6. Secreción episódica de GH en lapso de 24 horas	32
Figura 7. Eliminación de GH	33

Introducción

Las actividades deportivas individuales y colectivas cumplen un papel crucial en el desarrollo de una sociedad, hoy en día, despiertan pasiones de grandes grupos humanos. Con ello, los deportistas han ido incrementando el desarrollo de sus capacidades físicas, lo que les permite imponer nuevas marcas en diferentes deportes, en parte gracias a la evolución de los equipos basados en nuevos materiales químicos, más flexibles, más ligeros y más fuertes que permiten llegar más lejos, más alto y con mayor velocidad. Sin embargo, ha traído consigo con mayor recurrencia el uso de sustancias o métodos prohibidos en el deporte con la finalidad de obtener mejor rendimiento, fenómeno denominado dopaje. Por otro parte, el uso de antioxidantes como agentes para recuperación intramuscular como barredores del estrés oxidativo generado por el esfuerzo físico, también ha favorecido el rendimiento deportivo.

Una de las moléculas empleadas como método de dopaje es el péptido liberador de la hormona de crecimiento 6 (GHRP-6), el mejoramiento de las técnicas cromatográficas que se emplean en la detección de la hormona GHRP-6 es un desafío para la química nacional relacionada con el deporte y moléculas con capacidad antioxidante como los curcuminoides han cobrado gran interés dada su alta capacidad para eliminar el estrés oxidativo. Ante esta situación, se busca ampliar el conocimiento disponible sobre las técnicas requeridas para la separación y detección del péptido GHRP-6. Con el fin de dar respuesta al siguiente interrogante, que encierra el problema objeto de investigación ¿cuáles son las mejores condiciones del método de detección del péptido GHRP-6 y curcuminoides y su aplicación en el campo del deporte de acuerdo con los reportes actuales de la literatura?

El método que se emplea para el desarrollo de este trabajo es la revisión sistemática de literatura. Se utiliza una estrategia de búsqueda inclusiva para encontrar documentos, tesis, disertaciones, informes y tablas estadísticas, así como sitios web oficiales relacionados con el tema. Se busca que los artículos o documentos resultantes sean heterogéneos con respecto a la selección de datos y la clasificación de casos, y no sean metodológicamente comparables, es decir, que empleen diferentes métodos a través de los cuales se llega a conclusiones que enriquecen el conocimiento sobre el tema.

Problema de investigation

Planteamiento del problema

La química ha hecho diferentes contribuciones al desarrollo del deporte. Por la aplicación de diferentes técnicas de laboratorio que se utilizan para la identificación de sustancias que favorecen o afectan el desempeño del cuerpo humano, como la GHRP-6 y los compuestos antioxidantes tales como los curcuminoides.

Actualmente, Colombia muestra una mejora en el desempeño internacional de jóvenes atletas en diferentes modalidades del deporte como el ciclismo, el boxeo, el tenis, el futbol, entre otras, el mejoramiento de las técnicas cromatográficas que se emplean en la separación y detección de la hormona GHRP 6 es un desafío para la química nacional (Puentes & Rodríguez, 2017) así como en la identificación de sustancias para la recuperación del tejido muscular del deportista.

La Agencia Mundial Antidopaje (más conocida por su sigla en inglés World Anti-Doping Agency, WADA), cuenta con una serie de laboratorios certificados, cada uno de los cuales está calificado para identificar determinados niveles mínimos de las sustancias prohibidas.

Ante la situación descrita, el presente trabajo busca ampliar el conocimiento disponible sobre las técnicas requeridas para la detección de la hormona GHRP 6 y curcuminoides, con el fin de identificar los mejores métodos de detección para estas moléculas en muestras biológicas.

Justificación

La realización de este trabajo busca atender necesidades que se generan desde diferentes terrenos. En primer lugar, desde la perspectiva del deporte, el hecho de que a nivel internacional se destaquen exitosos deportistas colombianos motiva a las nuevas generaciones no solo a practicar deportes como aficionados, sino a muchos otros a dedicar su vida a esta actividad. Sin embargo, como en todas las profesiones, no todos tienen el mismo nivel de éxito y eso conduce a que algunos deportistas en Colombia acudan, ya sea por decisión propia, por descuido, ignorancia o por recomendación de terceros, al uso del doping; se hace entonces necesario que las autoridades deportivas refuercen sus controles para asegurar que las competencias se presenten en condiciones de equidad y para evitar que se presenten situaciones que a nivel internacional empañen la buena imagen que con tanto esfuerzo han logrado otros. Esta es la primera razón que motiva la realización de este trabajo, en la medida que su desarrollo contribuirá a mejorar el conocimiento de las técnicas necesarias para poder detectar la hormona GHRP 6. En este mismo sentido la identificación de moléculas que favorecen la recuperación muscular posterior al esfuerzo físico, favorece el desarrollo de las capacidades deportivas en los profesionales del deporte.

En segundo lugar, desde el punto de vista de ciencia química, el péptido liberador de la hormona del crecimiento 6 es un péptido sintético de seis aminoácidos. Originalmente fue descrito como un agente intestinal que estimula fuertemente la liberación de la hormona del crecimiento en diferentes especies de mamíferos, también en humanos. El GHRP 6 y sus análogos sintéticos se utilizan actualmente para el diagnóstico clínico de diferentes formas de enanismo (Berlanga, 2015). Hasta la fecha, sus efectos citoprotectores descritos estaban

relacionados con la prevención de la disfunción isquémica cardíaca y con sus acciones neuro-protectoras mediadas por el eje hormonal. Sin embargo, el conocimiento actual sobre GHRP 6 y péptidos análogos apunta hacia diferentes estructuras diana y diferentes vías de señalización intracelular, y su combinación específica depende del contexto biológico donde se evalúa el péptido dado. Esta es la explicación de los efectos farmacológicos versátiles recientemente descritos para esta molécula.

De igual manera la curcumina y los curcuminoides son un grupo de moléculas pertenecientes a los polifenoles, con amplio uso a nivel alimenticio, estas moléculas son reconocidas por su gran capacidad antioxidante y diversas propiedades benéficas en diferentes enfermedades, sin embargo con un complejo inconveniente de biodisponibilidad, lo cual es un reto en búsqueda de optimizar su utilización para lo cual se hace necesario establecer técnicas analíticas que permitan el estudio de su farmacodinamia.

Por otro lado, de acuerdo con (Ferro et al., 2017), se han desarrollado varios métodos para la detección de GHRP 6 en muestras de orina. Los secretagogos de la hormona del crecimiento son moléculas pequeñas activas y constituyen una familia compleja y heterogénea de compuestos que sigue creciendo en número. Adicionalmente, el uso creciente y frecuente de estos compuestos por parte de los atletas se debe a que se pueden comprar fácilmente en el mercado negro o a través de Internet, mientras que su detección es compleja porque si se hace a través de la muestra de orina, el protocolo tarda tres días en completarse. La detección se basa en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, y se presentan diferencias en los sistemas de ionización y los analizadores. Adicionalmente, existen variaciones en las condiciones de preparación de las muestras y el corrido cromatográfico. Es decir que se trata de unas técnicas de laboratorio cuya práctica es compleja y que ameritan su comprensión. Así

mismo, es necesario saber si cada una de las técnicas existentes se emplea en una condición específica o si esa decisión se debe basar en los costos, los recursos disponibles o en criterios diferentes.

En la medida en que se pueda dar respuesta a la pregunta de investigación planteada, se podrá saber con precisión no solamente cuáles son las técnicas requeridas para detectar la hormona GHRP 6, sino los requerimientos técnicos en términos de equipos, instalaciones, cuidados y demás especificaciones para la realización de los análisis y el tratamiento de las muestras desde que son tomadas hasta que se obtienen los resultados definitivos.

Objetivos

Objetivo general.

Identificar la aplicación de las técnicas cromatográficas para la detección de compuestos como la hormona GHRP 6 y antioxidantes curcuminoides de interés en el campo deportivo.

Objetivos específicos.

1. Analizar la literatura internacional disponible sobre las condiciones a emplear para la detección de la hormona GHRP 6 y curcuminoides.
2. Establecer los criterios que definen las condiciones apropiadas para la detección cromatográfica de la hormona GHRP-6 y curcuminoides.

Diseño metodológico

Método

El método que se emplea para el desarrollo de este trabajo es la revisión sistemática de literatura. Se utiliza una estrategia de búsqueda inclusiva para encontrar documentos, tesis, disertaciones, informes y tablas estadísticas, así como sitios web oficiales relacionados con el tema. Se definen los criterios de inclusión y exclusión que guían el proceso de búsqueda y selección. Se busca que los artículos o documentos resultantes sean heterogéneos con respecto a la selección de datos y la clasificación de casos, y no sean metodológicamente comparables, es decir, que empleen diferentes métodos a través de los cuales se llega a conclusiones que enriquecen el conocimiento sobre el tema. (Liao, Deschamps, Loures, & Ramos, 2017).

Los descriptores o palabras claves empleados para la búsqueda de información se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Descriptores empleados para la búsqueda de publicaciones

Español	Inglés
Dopaje	Doping
Hormona de crecimiento	Growth hormone
Detección	Detection
Curcuminoides	Curcuminoids
Orina	Urine
Sangre	Blood

GHRP 6	GHRP 6
Efectos	Effects
Estudio de laboratorio	Laboratory study
Deporte	Sport

Fuente: *elaboración propia.*

Dado que se busca garantizar la rigurosidad científica del trabajo, se consultarán solamente artículos publicados en bases de datos reconocidas como son PUBMED, Proquest, Science-Direct, Scopus, Ovid, Ebsco e ISI en idiomas inglés y español, considerando que la mayoría de la literatura científica disponible se encuentra publicada en estos dos idiomas. Con el propósito de emplear información actualizada se toma el período de cinco años comprendido entre enero de 2010 y diciembre de 2019.

Tamaño de la muestra

Aunque necesariamente se hará una selección que se estima en 70 u 80 documentos, la muestra final será mínimo de 50 publicaciones hechas en diferentes países, tanto es español como en inglés, sobre la detección de la hormona GHRP 6, curcuminoides y sus técnicas de análisis.

Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión empleados fueron la rigurosidad, la pertinencia y la metodología de cada artículo; la rigurosidad se evaluó de manera implícita al tener en cuenta solamente artículos que hubieran cumplido las exigencias definidas por las publicaciones indexadas cuyas bases de datos fueron consultadas. A su vez la pertinencia se refirió a que

incluyeran información métodos de detección de la hormona GHRP 6 y curcuminoides, es decir, que no solamente se refirieran a estudios antidoping en general, sino que además aportaran posibles criterios a tener en cuenta al momento de establecer los métodos de detección.

Por último, con respecto al criterio relacionado con la metodología se consideraron elegibles las publicaciones que se hubieran realizado basadas en investigaciones apoyadas en fuentes primarias, sobre la detección de esta hormona y curcuminoides en diferentes países. Los trabajos deberían describir la metodología empleada para su elaboración, el sustento teórico con base en el cual se definió la metodología, la población incluida en cada trabajo, los resultados obtenidos y las conclusiones y recomendaciones generadas. Además, se analizaron estudios de caso, trabajos tanto de corte cualitativo como cuantitativo, de origen académico, oficial o gremial.

Criterios de exclusión

Como criterios de exclusión se fijaron la fecha de publicación de los artículos y las fuentes empleadas. Se descartarán publicaciones anteriores a 2010 y solamente se admitirán publicaciones anteriores a 2010 cuando su relevancia justifique dicha decisión. En cuanto a las fuentes, el criterio se refirió a no utilizar trabajos basados en fuentes secundarias, con el fin de asegurarse que el trabajo final refleje hallazgos de trabajos hechos directamente con fuentes primarias o directas.

Control de calidad de las fuentes secundarias

Las publicaciones que cumplieron con los criterios de selección se sometieron a una evaluación de calidad basada en cuatro criterios, como se presenta en la Tabla 2. A cada estudio

se le asignó un puntaje de 1 o 0 según cumplieron o no los criterios que se describen en esta tabla.

Tabla 2. Evaluación de calidad

Criterio	Descripción	Puntaje	Cuando
Rigurosidad	El estudio ha sido publicado por bases de datos seleccionadas	N. A.	Criterio de selección
Pertinencia	El estudio se relaciona con la detección de la hormona GHRP 6 y curcuminoides	N. A.	Criterio de selección
Metodología	El estudio describe la metodología empleada, el sustento teórico, la población incluida, los resultados y las conclusiones y recomendaciones	N. A.	Criterio de selección
Bases del estudio	El estudio se basa en información obtenida a partir de fuentes primarias	1	El estudio se basa en fuentes primarias
		0	El estudio se basa en fuentes secundarias

Aplicación del estudio	Los resultados del estudio ya fueron aplicados y probados	1	Sí fueron aplicados y probados
		0	No han sido aplicados y probados
Sustento teórico	El estudio contiene el sustento teórico correspondiente	1	Sí contiene el sustento teórico
		0	No contiene el sustento teórico
		0	Los resultados del estudio han sido probados en un solo escenario

Fuente: *elaboración propia*

Una vez calificadas las diferentes publicaciones y asignadas las puntuaciones correspondientes, se seleccionaron aquellos que obtuvieron el mayor puntaje. La secuencia del proceso de selección se ilustra en la Figura 1.

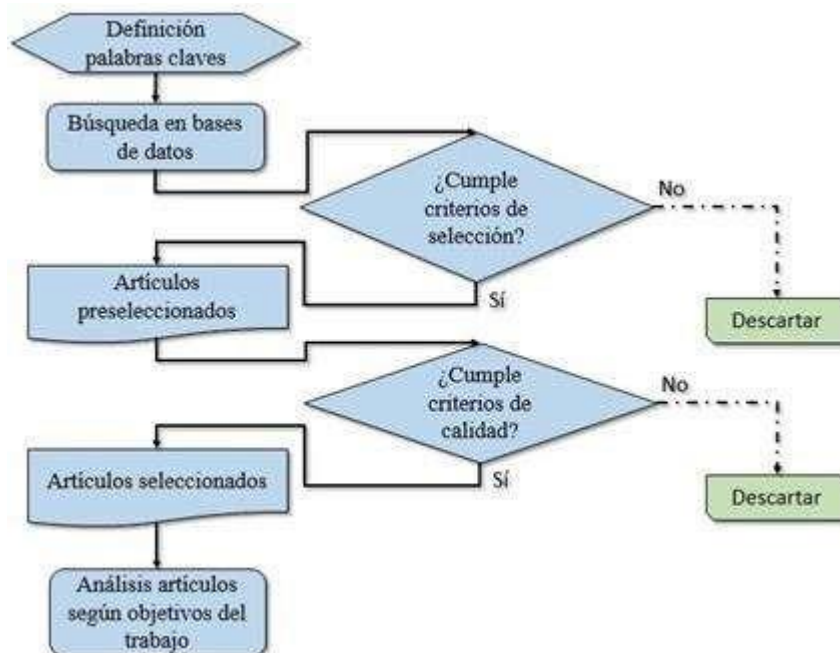


Figura 1. Proceso general de selección

Fuente: elaboración propia.

Técnica para la recolección de la información

Los artículos seleccionados se analizan con el propósito de establecer los aportes que cada uno de ellos podría hacer para dar cumplimiento al objetivo planteado en este trabajo de investigación de acuerdo con los reportes actuales de la literatura.

En el análisis se tuvo en cuenta que cada artículo podría contener desde un fragmento relativamente corto de información útil y relevante, hasta resultados más extensos igualmente necesarios para los propósitos del trabajo; los fragmentos de información podrían estar relacionados, por ejemplo, con el alcance y significado de los conceptos teóricos empleados en los procesos de análisis realizados en los artículos seleccionados, mientras que los fragmentos

más extensos podrían ser, también a manera de ejemplo, los que se refirieran a los resultados de los estudios contenidos en los mismos artículos.

Este proceso de análisis también buscó identificar evidencia que confirmara o controvirtiera los planteamientos y las conclusiones de los trabajos seleccionados, con lo cual se buscó enriquecer el aporte científico del presente trabajo.

Procesamiento de la información

La información seleccionada se organizó por subtemas, como se muestra en el siguiente capítulo.

Resultados

Estructura y función de las moléculas GHRP-6 y Curcuminoides.

Péptido liberador de la hormona de crecimiento: GHRP-6

La estructura química que posee la hormona del crecimiento (GH) viene dada por una cadena peptídica conformada por 191 aminoácidos con un peso molecular de 22.650D. También representa una proteína de 20.269D (GH-22KD) que no cuenta con los aminoácidos situados entre las ubicaciones 32 y 46. De igual forma, hay otras variantes de la hormona GH que se producen por procesos químicos como lo son la acetilación, la agregación, etc., variantes que muestran un nivel superior de acidez, y cuentan con una actividad biológica más marcada que la molécula base.

La variante 22KD está conformada por dos puentes disulfuro intracatenarios que fusionan las cisteínas que tienen las posiciones 53 y 182 con las ubicadas en las posiciones 165 y 189 respectivamente. Los puentes disulfuro son esenciales para el sostenimiento de la conformación activa de la hormona. En la Figura 2 a continuación se puede observar la estructura secundaria de la hormona GH.

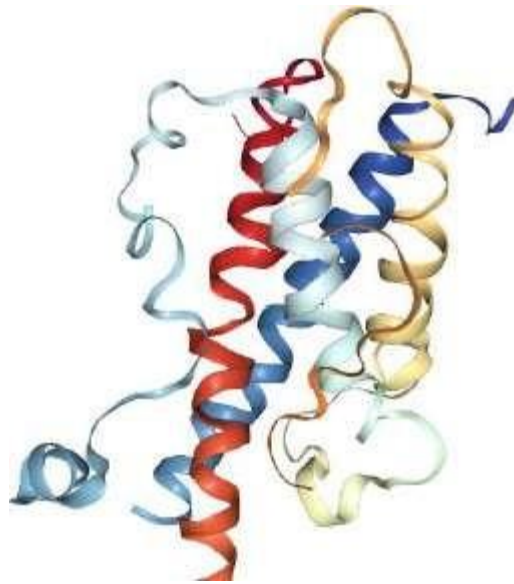


Figura 2. Estructura secundaria GH

Fuente: Salamanca (2018)

En la molécula se resalta la existencia de 4 hélices alfa las cuales se encuentran dispuestas de manera que las dos primeras están paralelas entre sí, pero están ubicadas de manera anti paralelas con relación a las otras dos. Ubicación que es esencial al momento en que se genere la unión de la GH a su receptor, la cual se produce en relación 1:2, es decir, una molécula GH por dos moléculas de receptor. En cada una de las moléculas de la hormona hay dos epítomos de reconocimiento del receptor, que se encuentran ubicados en los extremos opuestos del núcleo de hélices alfa, sitio I y sitio II. Con relación a la variante de la hormona del crecimiento de 20KD no se tiene clara la estructura terciaria, sin embargo, según Arce, Tresguerres y Deversa (2000) la pequeña afinidad que existe entre el receptor de la forma de 22KD indica que en ella se generan transformaciones conformacionales que afectan a los epítomos de reconocimiento.

La hormona del crecimiento se encuentra estructurada por un único gen, ubicado en el brazo largo del cromosoma 17, conformado por una unidad de cinco genes vinculados entre ellos que representan el clúster de genes GH, y conforma el gen Hgh-N (Human Growth

Hormone-Normal) o gen HGH-1, el gen Hcs-L (human Chorionic Somatomammotropin-Like o gen Hpl-1M, el gen hCS-A (Human Chorionic Somatommatropin-A), o gen Hpl-4, el GEN Hgh-V (Human Growth Hormone-Variant) o gen Hgh-2 y el gen Hcs-b (Human Chorionic Sommmotropin-B) o gen Hpl-3. Como se puede observar en la Figura 3.

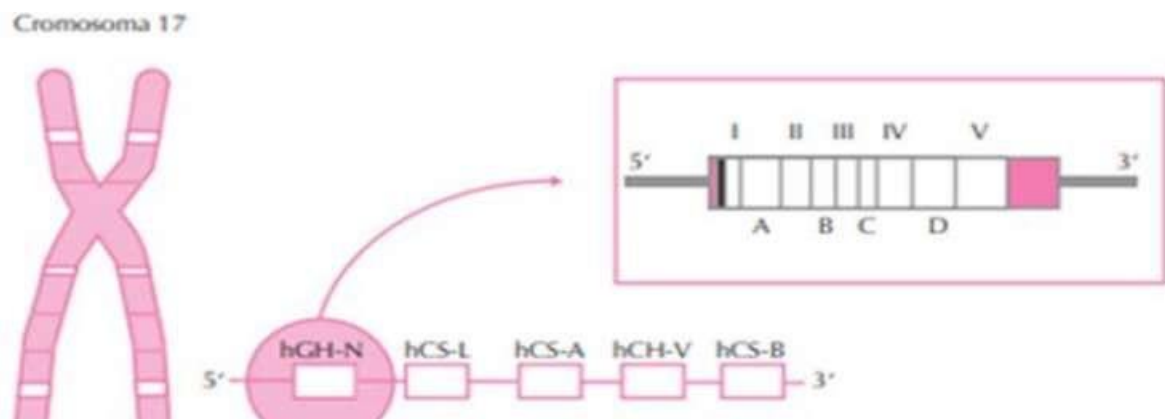


Figura 3. Localización y organización estructural de la familia de genes hGH
Fuente: Salamanca (2018)

En todos estos genes hay una localización típica con cinco exones (I-IV) codificantes, que están divididos por cuatro intrones (A-D) no codificantes. El que se encarga de codificar la hormona de crecimiento hipofisaria, leucocitaria, y factiblemente se encarga de sintetizar la glándula mamaria, es el gen Hgh-N, el resto que conforma el clúster se manifiesta en las células del sincitiotrofoblasto, y además se encarga de codificar las somatotropinas placentarias. Estos genes poseen una gran secuencia nucleotídica y poseen particularidades semejantes, como, por ejemplo, en cuanto a su disposición con 5 regiones codificantes o exones, que se encuentran desligadas entre sí por 4 zonas no codificantes o intrones. También tiene trascendencia el gen GH-V placentario que conforma el crecimiento del feto.

Los laboratorios de análisis de drogas se concentran no solo en drogas tradicionales que mejoran el rendimiento, como estimulantes y esteroides anabólicos androgénicos, sino también en terapias desarrolladas recientemente, incluidas aquellas que aún no han obtenido la aprobación reglamentaria (Domínguez, García, & Molina, 2015). Las hormonas peptídicas idénticas o modificadas a partir de análogos naturales, así como los nuevos medicamentos de bajo peso molecular, han ampliado la cartera de compuestos que poseen un gran potencial para el mal uso en los deportes. Por lo tanto, se requieren nuevos ensayos o procedimientos de detección de rutina extendidos con enfoques convencionales para hacer cumplir las actividades de pruebas de drogas deportivas. (Blasco, 2017).

Ya en 1977 la primera síntesis de péptidos liberadores de hormona de crecimiento (en adelante GH) inició un nuevo campo de investigación con el objetivo de dilucidar los mecanismos subyacentes a la generación, liberación y modo de acción de GH, así como la posibilidad de estimular artificialmente la secreción de GH (Sandoval, 2015). Sobre la base del conocimiento de la relación directa entre el crecimiento, el envejecimiento y el anabolismo con el eje del factor de crecimiento 1 similar a la insulina / GH (IGF-1), se realizaron numerosos estudios sobre la síntesis de compuestos capaces de desencadenar la liberación de GH en animales y humanos. Momany y Bowers (1984) prepararon análogos de péptidos de encefalinas Leu- y Met que eran capaces de estimular células cerebrales de ratas aisladas para secretar GH. Estas síntesis produjeron, entre otros, el péptido liberador de GH 6 (GHRP-6, ver Tabla 3) que se ha convertido en un compuesto de referencia para la comparación con nuevos candidatos de GHS.

Debido al beneficio clínico potencial de tales compuestos, en particular para el tratamiento de niños y adultos con deficiencia de GH, así como sus propiedades para mejorar la

composición corporal en sujetos de edad avanzada, el SGA ha recibido considerable atención. (Corripio et al., 2019) informaron la síntesis de las primeras GHS no peptídicas, que parieron de la identificación y caracterización del receptor endógeno (GHS-R) para el GHS sintético, así como la vía de transducción de señal correspondiente. La elucidación estructural del receptor reveló una nueva especie acoplada a la proteína G. Como se puede observar en la tabla 3.

Tabla 3. Estructuras primarias de péptidos con actividad de secretagogo de hormona de crecimiento

Compuesto	Secuencia
GHRP-1	Ala-His-D-βNal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂
GHRP-2	D-Ala-D-βNal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂
GHRP-6	His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂
Hexarelin	His-D-Mrp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂
Ipamorelin	Aib-His-D-2-Nal-D-Phe-Lys-NH ₂
Alexamorelin	Ala-His-D-Mrp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂

Fuente: Timms y Schänzer (2018)

Se descubrió una segunda variante de ARNm (GHS-R-Ib) que codifica una proteína que comprende solo 5 dominios transmembrana. El conocimiento de la estructura GHS-R permitió la identificación de su agonista endógeno natural, y recientemente se ha publicado una revisión exhaustiva sobre la composición y activación del receptor de Ghrelin. (Timms & Schänzer, 2018).

Varios candidatos a fármacos GHS con uso potencial para el tratamiento de una variedad de patologías han avanzado a ensayos clínicos. Se esperan efectos beneficiosos de las terapias basadas en GHS en el tratamiento de las deficiencias de GH en niños y adultos suponiendo una unidad hipotálamo-hipofisaria disfuncional (Argente, 2018); el tratamiento de los estados catabólicos y la fragilidad relacionada con la edad es otra aplicación prometedora. El rejuvenecimiento del eje GH / IGF-1 por GHS se ha descrito donde los sujetos de 70-90 años produjeron niveles de IGF-1 en suero y amplitudes de pulso de GH que generalmente se observan en personas sanas menores de 30 años. Se han informado mejoras en la composición corporal, la fuerza y la densidad ósea, así como se mantienen niveles elevados de IGF-1 durante más de 12 meses (López, Segura, & Maldonado, 2015).

Se han resumido posibles beneficios adicionales en una revisión reciente, que incluye efectos positivos sobre el metabolismo, que resultan en un aumento de la masa corporal magra y una reducción de la deposición de grasa, en el tejido del músculo esquelético, en el envejecimiento del cerebro y en el envejecimiento del sistema inmunológico. Es probable que estos resultados alienten a los atletas a (mal) usar esta clase emergente de drogas y mejorar su constitución física y el rendimiento deportivo resultante.

Curcumina y curcuminoides

La curcumina (Figura 4) pertenece a la familia de los curcuminoides, pigmentos polifenólicos presentes en los rizomas o tallos subterráneos de la planta tropical Cúrcuma (*Curcuma longa* L, Zingiberaceae), es una planta nativa del sur y sudeste del Asia tropical que pertenece a la familia del jengibre. Sus múltiples aplicaciones incluyen dar sabor a los alimentos, teñir telas de color amarillo-naranja y como remedio para aliviar diferentes trastornos de la salud. La cúrcuma es una planta es de tallo largo (cerca de un metro de longitud) y sus

flores son de color blanco. El rizoma de la planta, donde se encuentran los pigmentos curcuminoides, tiene unas dimensiones de aproximadamente 7 cm de largo por 2,5 cm de ancho.

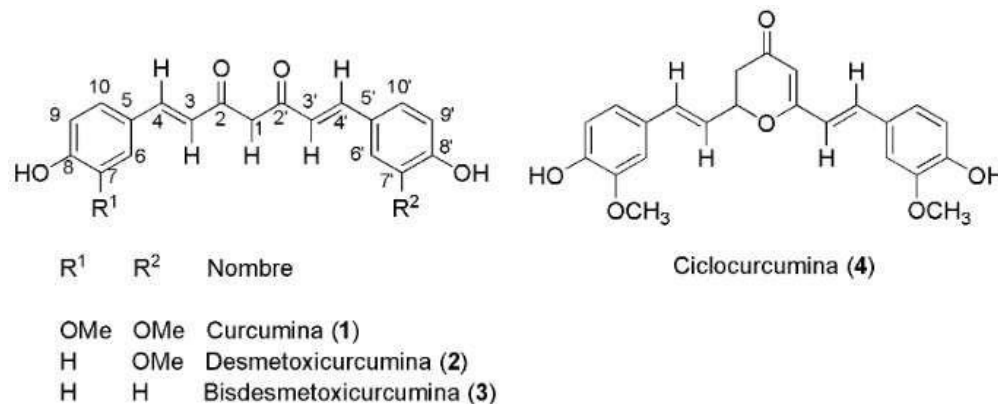


Figura 4: Estructura de la curcumina y curcuminoides.
Fuente: Lin et al (2013)

La curcumina cuya fórmula molecular es $C_{21}H_{20}O_6$ fue aislada por primera vez en 1815, es el principal polifenol curcuminóide encontrado en la cúrcuma y el principal responsable de las propiedades medicinales y farmacológicas de la misma. Está presente junto con la desmetoxicurcumina (curcumina II, 2), la bisdesmetoxicurcumina (curcumina III, 3) y la más recientemente descubierta ciclocurcumina (curcumina IV, 4) (que se muestran en la figura 4. También han sido descritos otros productos naturales tales como las terpecurcuminas o curcuminoides conjugados con terpenos (Lin et al.,2013).

La curcumina, 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, al igual que los curcuminoides, presenta un esqueleto hidroxicarbonado dicetónico con varios grupos funcionales, diferentes según el derivado curcuminóide, dotando a la molécula de un comportamiento químico característico, sensible tanto al entorno químico adyacente, como a la propia reactividad de dichos grupos funcionales resultando en las propiedades medicinales y farmacológicas reportadas. Estructuralmente se clasifica dentro de la familia de los

diarilheptanoides, productos naturales cuyas estructuras poseen dos restos arilo, hidroxilo u oxo sustituidos unidos entre sí a través de una cadena carbonada de 7 átomos que posee una función 1,3-dicarbonílica y diversas insaturaciones. El esqueleto hidroxicarbonado dicetónico es una estructura simétrica sin centros estereogénicos, cuyo esqueleto está formado por dos anillos fenólicos conectados entre sí por un puente dicetónico α,β - insaturado de 7 carbonos con el grupo hidroxilo en posición para.

Metabolismo de la GHRP-6 y curcuminoides en el organismo

Metabolismo de la GHRP-6

De acuerdo con Salamanca (2018), la síntesis y la secreción de la GH que realiza la hipófisis está controlada por el hipotálamo por medio de dos neurohormonas que poseen tareas contradictorias, de un lado posee el carácter estimulador y su función es la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH Growth Hormone- Releasing Hormone), y de otra parte está la neurohormona de índole inhibitoria que es la somatostatina u hormona inhibidora de la liberación de la hormona del crecimiento (SS o SRIF, Sommmotropin Release-inhibiting Factor), ambas se regulan por un diverso número de neurotransmisores, hormonas y señales metabólicas. La liberación de estas neurohormonas a la circulación portal hipotálamo-hipofisaria se presenta de manera acompasada y turnada, lo que genera que la secreción de la Hormona del Crecimiento sea episódica. La secreción pulsátil se produce a causa del vertido acompasado y turnado, con un desfase de 180° , de GHRH y SS a la circulación portal, cada secreción se genera por un aumento en la liberación de la GHRH que va acorde a una reducción de liberación de SS, conforme se puede observar en la figura 5 a continuación.

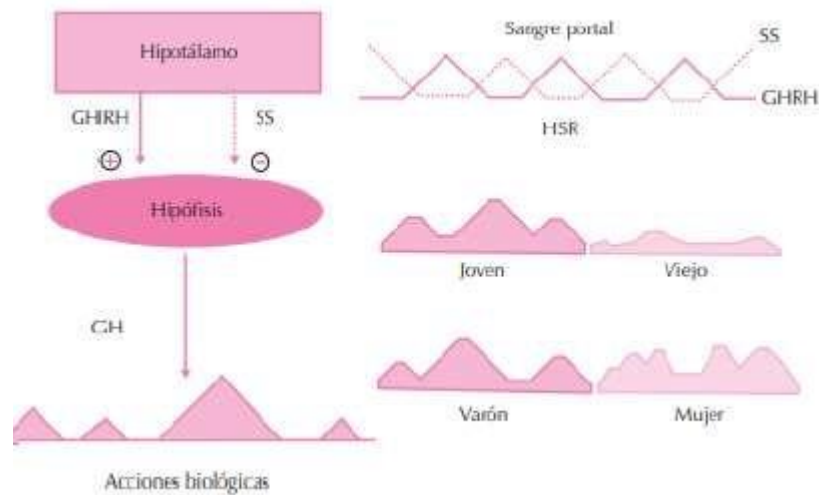


Figura 5. Datos de la Hormona del Crecimiento

Fuente: Salamanca (2018)

De esta manera se instaura un ritmo hipotálamo-somatótropo (HSR), de máxima amplitud durante el sueño con ondas lentas, que se modifica con relación a la intensidad y la frecuencia de los episodios secretores, teniendo en cuenta la edad y el género de la persona.

La particularidad de mayor importancia en la secreción de la hormona de crecimiento es que se genera de manera episódica, lo que significa que se ejecuta a través de fases de liberación repentina, divididas entre sí por fases donde no se genera secreción. Fuera de la existencia de estas neurohormonas, hay unos factores hipotalámicos y periféricos comprometidos en el control de la secreción de la Hormona del Crecimiento como lo que sucede con los péptidos denominados genéricamente GHRP (Growth Hormone Releasing Peptides), específicamente del factor gástrico ghrelin.

A continuación, en la Figura 6 se puede observar la forma en que se genera la secreción episódica GH en el transcurso de un tiempo de 24 horas.



Figura 6. Secreción episódica de GH en lapso de 24 horas
Fuente: Salamanca (2018)

En la figura 6 los picos de mayor amplitud que se observan se consiguen entre 1/3 y 1 hora con posterioridad al haber iniciado el sueño, coincidiendo con la fase del sueño de ondas lentas. El proceso de secreción pulsátil es trascendental para impedir sucesos de que no exista sensibilización en las células diana. Cuando existe normalidad en el proceso, la mayor liberación de la hormona del crecimiento se genera en la primera etapa de ondas lentas del sueño, se presentan picos con menos amplitud que tienen que ver con fases posteriores de ondas lentas.

De acuerdo con Salamanca (2018) la hormona del crecimiento en el plasma está fusionada a proteínas transportadoras (GHBP Growth Hormone Binding Proteins), que pueden existir de dos clases: De alta y baja afinidad (HA-BP, High Affinity BP y LA-BP Low Affinity –BP) La proteína de alta afinidad está conformada por una glucoproteína de cadena simple que cuenta con puesto molecular cercano a los 60KD y posee una reducida capacidad de transporte y se fusiona preferentemente a la variante de 22KD. Mientras que la proteína transportadora de baja afinidad posee una gran capacidad de transporte, se fusiona preferentemente a la variante de 20KD, y por el contrario esta proteína no posee ningún vínculo con el receptor del crecimiento.

La hormona de crecimiento circulante se expulsa principalmente por el riñón, pero solamente se efectúa este proceso a través de las moléculas que transitan libremente, como se puede observar en la Figura 6, se ilustra que la GH que se secreta al plasma circula unida a proteínas específicas de las que se disocia para ser eliminada por el riñón, según la descripción de Salamanca (2018).

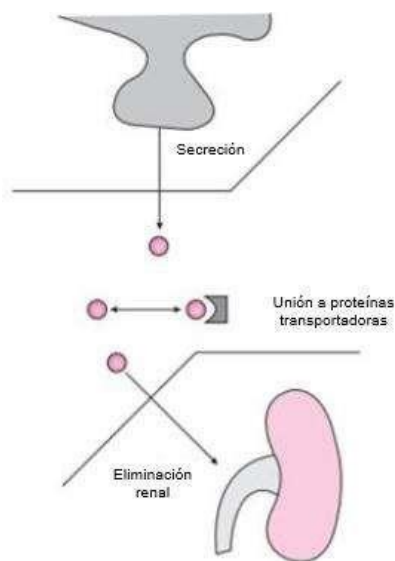


Figura 7. Eliminación de GH
Fuente: Salamanca (2018)

La hormona de crecimiento que se secreta al plasma, circula junto con proteínas concretas de las que se aparta para ser expulsada por el riñón. Las formas oligoméricas se eliminan de manera más despaciosa a causa de que son más grandes, generando una dificultad en la filtración glomerular, y se eliminan también lentamente a causa de que es menor la afinidad con el receptor de GH. Dentro de las formas monoméricas, y por su afinidad más reducida con el recepto de GH, GH-20 KD se expulsa más despacio que la GH-22KD que las formas acídicas.

Según Salamanca (2018), la regulación de la secreción de la hormona de crecimiento está conformada por un grupo de péptidos cerebros intestinales que están totalmente distribuidos

por el cuerpo. La manera que tiene el trabajado de regular la secreción hipofisaria de la hormona del crecimiento se recopila en el núcleo arcuato hipotalámico. La GHRH posee una vida cercana a los 2 minutos, puesto que se encuentra hidrolizada por proteasas circulantes y se encuentra codificada por un solo gen (cromosoma 20), y se sintetiza en forma de un precursor de 108 aminoácidos –que abarca el péptido señal- que se procesa de manera proteólica, generándose de esta manera la molécula GHRH madura, unido a un péptido C-terminal de 31 aminoácidos que posee una labor que no se conoce. Las terminaciones nerviosas que son liberadas por la GHRH, y que se logra a través del sistema adenohipófisis, donde se fusiona con receptores concretos ubicados en la membrana de las células somatotropas. En la hipófisis, la GHRH estimula la liberación de la hormona del crecimiento, incrementa la transcripción del gen de la hormona e induce al desarrollo de las células somatotropas.

Dentro de los efectos biológicos que se generan por el papel que desempeña la GH según Salamanca (2018) es que en la etapa de desarrollo de la persona posee efectos importantes en el metabolismo de las proteínas, lípidos e hidratos de carbono. La hormona del crecimiento articula la distinción del tejido adiposo, lo cual la relaciona con la reducción de los depósitos grasos, e igualmente en el aumento de la masa corporal magra. De igual forma, tiene injerencia en los hepatocitos y lipoproteínas que trabajan para que el corazón funcione, también se relaciona con el metabolismo óseo y la fuerza muscular. Según Kim, Hong, Chung et al., (2014), se debe señalar que cuando existe deficiencia de la hormona de crecimiento puede generar acumulación de grasa en el abdomen, reducción de la masa muscular, dislipidemias, se aumenta el riesgo cardiovascular, se incrementa el nivel por fallecimientos a causa de la reducción de esta hormona puesto que se reduce de manera trascendental la calidad de vida de los pacientes que tienen afectaciones a causa del déficit por esta hormona.

Según Salamanca (2018) la GH no trabaja concretamente en un específico órgano diana, sino que realiza su tarea en todo el organismo, es trascendental en el sistema esquelético que permite el sostenimiento de un desarrollo corporal equilibrado y en últimas lograr una talla adulta normal. Todos los impactos que tiene el buen desarrollo de esta hormona tienen que ver con la acción que realiza la GH sobre los tejidos y a causa del aumento de la síntesis IGF-1, esencialmente en el hígado y los huesos. Aunque la función biológica fundamental de la hormona del crecimiento se genera en el metabolismo intermediario, a través de sus actuaciones a nivel anabolizante, lipolítica y diabetógena, que se llevan de manera integral, terminando en un efecto fundamental dentro del crecimiento, o para trabajar sobre las regulaciones del metabolismo y la nutrición del cuerpo, cuando se termina la etapa de crecimiento.

Así mismo, esta hormona es fundamental dentro del sistema inmune y la hematopoyesis, el sistema cardiovascular, la estabilidad hidrosalina, las gónadas, la glándula mamaria y ciertos procesos de cognición; de igual manera, hay una síntesis de una hormona de crecimiento igual a la hipofisaria en múltiples tejidos extrahipofisarios, principalmente en las células hemáticas y la glándula mamaria, que tienen que ver con el mecanismo de control local del crecimiento y la muerte celular (Salamanca, 2018).

Después de la secreción, GH se asocia rápidamente con dos proteínas de unión a GH circulantes (GHBP). La unión al GHBP principal de alta afinidad es fácilmente reversible y sigue un equilibrio dinámico. La GHBP de alta afinidad es el ectodominio de la GHR, generada a partir de la GHR por la acción de la enzima convertidora de metaloproteinasas (Lu, Flanagan, Langley, Hay, & Perry, 2019).

Se ha demostrado que la GHBP de baja afinidad corresponde a la forma transformada de 2-macroglobulina. En condiciones basales, la fracción de GH unida al GHBP de alta afinidad disminuye debido a la saturación del GHBP. La GHBP protege a GH del aclaramiento renal y la degradación; los complejos sirven como un grupo circulante de GH, prolongando su biodisponibilidad. Además, GHBP compite con GHR por la unión de GH y puede inhibir la señalización, modulando así la bioactividad de GH. El GHBP de alta afinidad puede interferir con la medición de GH en suero (Björnsson, Einarsdottir, Johansson, & Gong, 2018). Los niveles séricos de GH se informan convencionalmente como GH total. Fluctúan ampliamente, lo que refleja la secreción pulsátil de la pituitaria.

En el estado basal (niveles interpulso), los niveles de GH oscilan entre 0.01 y 1 ng/ml. Después de un pulso secretor, pueden oscilar entre 1 y 100 ng/ml. El límite entre un nivel basal y un pulso pequeño es arbitrario. Los picos más altos de GH en suero se observan típicamente en la noche durante el sueño de onda lenta y generalmente residen en el rango de 10-20 ng/ml. Ocasionalmente, los picos pueden ser considerablemente más altos. Durante el día, los picos de GH son típicamente más pequeños, en el rango de 2 a 10 ng/ml.

La edad, el sexo, el índice de masa corporal / adiposidad, la actividad física, el estrés, la hora del día y el estado nutricional y metabólico influyen en la secreción de GH. La mayoría de los inmunoensayos de GH no discriminan completamente entre las isoformas de GH, pero pueden diferir parcialmente en su reconocimiento de las isoformas; esto tiene implicaciones para la medición de GH por inmunoensayo.

La cantidad de GH excretada en la orina es muy variable, tanto entre sujetos como dentro del mismo individuo de día a día, con coeficientes de variación intraindividual del 40 al

60% (Martinez & Kannan, 2019). La excreción urinaria de GH aumenta después de la administración de GH exógena, aunque existe información limitada y es probable que se solapen con las tasas de excreción normales. La cantidad de GH excretada en sujetos normales en un período de 24 h oscila entre 0.3 y 80 ng, es decir, un rango superior a 100 veces, con la mayoría de los valores entre 2 y 15 ng por 24 h. Las cantidades excretadas varían ampliamente entre los sujetos por razones poco conocidas. Sobre una base poblacional, la excreción urinaria de GH sigue aproximadamente las tendencias de la GH plasmática (por ejemplo, los valores son más bajos en hipopituitarismo, altos durante la pubertad, más altos en acromegalia, etc.), pero hay una superposición sustancial entre estas categorías.

Entre los individuos, no existe una correlación entre los niveles de GH plasmática integrada de 24 h y la excreción urinaria de GH. No se encuentra correlación entre la excreción urinaria de GH y las mediciones auxológicas en niños. La variación diaria en la excreción hace que la interpretación de una sola medición no sea confiable. La variabilidad intra e intersujeto supera con creces la que puede atribuirse a la imprecisión analítica y las disparidades entre los ensayos. Las mediciones individuales de GH en orina son demasiado variables para ser útiles como herramienta para el diagnóstico clínico, incluso en condiciones extremas del espectro de secreción de GH.

Metabolismo de la curcumina y curcuminoides

El hígado está indicado como el sitio principal de metabolismo de la curcumina, junto con el intestino y la microbiota intestinal. Los dobles enlaces de la curcumina se reducen posteriormente en los enterocitos y hepatocitos por una reductasa a dihidrocurcumina, tetrahidrocurcumina, hexahidrocurcumina y octahidrocurcumina. Además, el metabolismo biliar

secundario a ácido dihidro-ferúlico y el ácido ferúlico. El metabolismo de fase II es bastante activo, en el citosol intestinal y hepático, tanto en la curcumina como en sus metabolitos de fase I, especialmente por conjugación con ácido glucurónico y sulfato en el sitio fenólico. La curcumina es sulfatada por SULT en el citosol, principalmente SULT1A1 y SULT1A3, mientras que las UGT catalizan la glucuronidación de curcumina en los microsomas intestinales y hepáticos. La dihidrocurcumina, la tetrahydrocurcumina y la hexahydrocurcumina existen en ambas formas libres o como glucuronidos.

La curcumina también sufre un metabolismo alternativo por la microbiota intestinal como *Escherichia coli* y *Blautia* sp. Se encontró que *Escherichia coli* es activa por una reductasa dependiente de NADPH en una vía de reducción de dos pasos de curcumina a dihidrocurcumina y luego a tetrahydrocurcumina. *Blautia* sp. produce la desmetilación de la curcumina en dos derivados: desmetilcurcumina y bis-desmetilcurcumina.

Dei Cas et al., (2019), reportan que el pico sérico de curcumina se encuentra entre 1 y 2 h después de la ingesta oral. Este pico sérico disminuye gradualmente dentro de las 12 h siguientes a la ingesta. Las concentraciones séricas promedio después de tomar 4, 6 y 8 g de curcumina fueron $0.51 \pm 0.11 \mu\text{M}$, $0.63 \pm 0.06 \mu\text{M}$ y $1.77 \pm 1.87 \mu\text{M}$, respectivamente. En otro estudio 24 voluntarios sanos se les administró una dosis única en dosis desde 0,5 a 12 g.

A los voluntarios sanos ($n = 24$) se les administró una dosis única de extracto en polvo estandarizado de curcumina con dosis que iban de 0,5 a 12 g. y se encontró en un nivel en plasma de aproximadamente 30 (1 h), 40 (2 h) y 50 (4 h) ng / mL después de una dosis de 10 g, mientras que el nivel de aproximadamente 30 (1 h), 60 (2 h) y 50 (4 h) ng / mL después de una dosis de 12 g (Dei Cas y col, 2019).

Importancia de la GHRP-6 y los antioxidantes en el deporte.

Dentro de las sustancias que forman parte de los extraños compuestos que están integrando el mundo del dopaje están los péptidos, y dentro de ellos está el GHRP-6 que forma parte de los péptidos liberadores de hormonas, que constituye la manera para alcanzar efectos anabolizantes, es decir, generación de músculo, a través de métodos indirectos; los motivos por los cuales las personas utilizan esta clase de sustancias, es que con ellas se logra incrementar los niveles de la hormona del crecimiento, generándose el incremento de la fuerza muscular. Este péptido conforma uno de los que integran el grupo fundamental del nuevo estilo de dopaje, los cuales liberan hormonas en un número elevado y se usan en el deporte para fines de dopaje.

Según AEPSAD (2018), el GHRP-6 se utiliza para reducir la masa corporal, generar músculo y acelerar la restauración de las lesiones, ya que con esta sustancia se consigue elevar los niveles de la hormona de crecimiento en la sangre y quienes se lanzan al uso de esta clase de sustancias buscan alcanzar beneficios deportivos, con la probabilidad de que no sean detectados, además de que tienen una vida media bastante corta, y en muchas ocasiones desaparecen rápidamente y no se manifiestan con mucha facilidad.

Para aquellos entrenadores que no tienen reparos en la realización de su labor, según AEPSAD (2018) la seducción que tiene esta hormona es que es catalogada como la “droga de los campeones”, puesto que no se detectaba aún, pero su valor superaba a otros anabolizantes, y es usada en la preparación de los deportistas, e igualmente se hace más seductora puesto que la vida media de dicha hormona es bastante reducida, ya que muchos anabolizantes requieren semanas para ser eliminados totalmente, esta hormona inicia su desaparición minutos después de

que es absorbida y eliminada totalmente a las 48 horas de su uso (Agencia Española de Protección de la Salud en el Deporte, 2018).

De acuerdo con Regalado, Mendoza y Pineda (2015), las hormonas son estimadas como un mecanismo antiguo para el proceso de medicación y dictamen de distintas patologías, aunque para la disciplina deportiva han generado nuevos panoramas de expansión en la actualidad.

Dentro de las funciones fundamentales de las hormonas dentro del control del metabolismo es conformar la autorregulación celular y respaldar la total movilidad de los recursos que acopia dentro del cuerpo del hombre, ya que, sin contar con esta facultad el ser humano no podría usar totalmente toda la potencia de sus capacidades.

De acuerdo con lo anterior, según Regalado, Mendoza y Pineda (2015), el poder lograr toda la capacidad en los ejercicios se supedita al efecto que poseen las hormonas en los procesos del metabolismo, lo que genera la capacidad de respuesta hormonal al realizar ejercicios, abarcando el logro en las competencias, lo cual permite saber la forma en que se generan los movimientos de recursos metabólicos. La definición en concentración hormonal puede brindar información acerca del acoplamiento a determinados rangos de energía y durabilidad en la realización de los ejercicios, al igual que poder determinar las dificultades de acomodación, abarcando la debilidad en cuanto al acoplamiento del organismo y lo que puede suceder por el sobre entrenamiento.

Por otra parte, se han reportado efectos deletéreos del estrés oxidativo en el ejercicio físico lo cual ha permitido identificar la necesidad de adicionar compuestos antioxidantes en la dieta de los deportistas, de forma que retarden, prevengan o eliminen la oxidación de las moléculas diana, por medio de reacciones que generen radicales menos activos o interfiriendo en

la reacción oxidativa que promueve el daño de las biomoléculas. Una de las controversias más grandes que se encuentran en el tema es la falta del requerimiento diario de antioxidantes establecido para un grupo de individuos, por lo que la cantidad en relación con la eficacia debe comprobarse a partir de estudios clínicos o estudios previamente realizados. Simioni (2018) reporta entre las especies antioxidantes comúnmente conocidas y utilizadas en el ejercicio físico se encuentran los tocoferoles (Vitamina E), ácido ascórbico (Vitamina C), carotenoides (β -Carotenos), ubiquinona y polifenoles como flavonoides (Quercetina, Luteolina, Naringenina, Cianidina y Genisteína), y no flavonoides como Cumarina y Resveratrol.

Separación cromatográfica de la hormona GHRP-6 y curcuminoides en el deporte

A causa de los progresos en los desarrollos farmacológicos y biotecnológicos, y con la llegada de novedosas entidades químicas y biológicas con potencial para el dopaje en el deporte, este hecho se puede detectar en la lista que posee la Agencia Mundial Antidopaje (AMA) sobre sustancias que han sido prohibidas, la cual evoluciona todos los años, fundamentalmente en las que tienen que ver con hormonas peptídicas, factores de crecimiento, sustancias relacionadas y miméticos donde se han concretado adiciones permanentes en las revisiones que se han efectuado recientemente.

El análisis de esta clase de GHRP se ha realizado de forma obligatoria para todos los deportes y federaciones a partir del 2015, y la cantidad de muestras analizadas para estos análisis varía, según el riesgo estimado en los distintos deportes. De acuerdo con el “documento técnico para el deporte de la AMA Análisis específico” (TDSSA), este porcentaje varía entre un 5% y un 30% del total de las muestras para la mayoría de las disciplinas. Aspecto que hace que todos los laboratorios antidopaje deben contar con la preparación para detectar la presencia de

compuestos que conforman esta clase de farmacológicos de la hormona del crecimiento por liberación de péptidos, los cuales generalmente son tratados como GHS.

De acuerdo con el desarrollo farmacéutico, últimamente se han desarrollado métodos de orientación antidopaje usando el método de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) para cribado, de aquellos compuestos del grupo GHS, compuestos que se tiene el conocimiento que están siendo distribuidos por internet y que están siendo comercializados hasta el momento únicamente GHRP-2 para fines de diagnóstico en Japón (Thevis & Schänzer, 2014). Aunque, conforma un amplio campo de acción para diversas compañías farmacéuticas, y a causa de ello no se sabe con exactitud los medicamentos que existen en el mercado que posean un efecto similar, pero se puede estimar que por lo menos los compuestos están en procesos de evolución y podrían ser potenciales objetivos para el uso y el abuso de éstos a futuro (Ejskjaer, Wo, Esfandyari, & et. al., 2013).

El péptido liberador de hormona del crecimiento 6 tiene un peso molecular de 872,44 Da es un potente secretagogo de la hormona del crecimiento que exhibe un efecto citoprotector, manteniendo la viabilidad del tejido durante Episodios agudos de isquemia / reperfusión en diferentes órganos como intestino delgado, hígado y riñones. (Gil et al 2012) desarrolló y validó completamente un método cuantitativo para analizar GHRP-6 en plasma humano siguiendo las pautas de la FDA. El método utiliza un estándar interno (IS) de GHRP-6 con alanina marcada con ^{13}C para la cuantificación. El procesamiento de la muestra incluye un paso de precipitación con acetona fría para eliminar las proteínas plasmáticas más abundantes, recuperando el péptido GHRP-6 con un alto rendimiento. La cuantificación se logró mediante LC-MS en modo de barrido completo positivo en un espectrómetro de masas Q-Tof. Se evaluó la sensibilidad del método, estableciendo el límite inferior de cuantificación en 5 ng / mL y un rango para la curva

de calibración de 5 ng / mL a 50 ng / mL. Así mismo, (Timms et al 2014) presenta un método que incluye derivatización y detección de GHRPs de orina equina y humana. Este método aprovecha una extracción en fase sólida altamente específica combinada con un nuevo método de derivatización para mejorar la cromatografía de péptidos básicos. El método fue validado con respecto a linealidad, repetibilidad, precisión intermedia, especificidad, límites de detección, límites de confirmación, supresión de iones y estabilidad. Como prueba de principio, los ocho GHRP o sus metabolitos podrían detectarse en la orina recolectada después de la administración intravenosa.

Otro estudio reportado por Kwok et al., (2013), se empleó un cartucho de extracción de fase sólida de intercambio aniónico de modo mixto simple para la extracción de siete péptidos diana (GHRP-1, GHRP-2, GHRP-6, ipamorelina, hexarelina, CJC-1295 y N-acetilado LKKTETQ (ingrediente activo de TB-500)) y sus metabolitos in vitro del plasma de caballo. El extracto final se sometió a separación por cromatografía líquida de ultra alto rendimiento y se analizó con un espectrómetro de masas híbrido de alta resolución. Se estimó que los límites de detección de los siete péptidos eran inferiores a 50 pg / ml. La validación del método se realizó con respecto a la especificidad, precisión y recuperación

Con el aumento constante de la sensibilidad y la robustez de los instrumentos basados en cromatografía líquida-espectrometría de masas combinados con una reproducibilidad mejorada, así como la precisión y resolución de masas, LC-MS (/ MS) se ha convertido en una parte integral de los programas de pruebas de drogas deportivas, particularmente en relación con la detección de hormonas peptídicas (Thevis, Thomas, & Schänzer, 2014). Aunque varios de los medicamentos peptídicos relevantes como las insulinas (Humalog LisPro, Novolog Aspart, etc.),

péptidos liberadores de la hormona del crecimiento (GHRP, por ejemplo, GHRP-2, GHRP-6, Hexarelin, etc.) y factores de crecimiento similares a la insulina (por ejemplo, IGF-1, IGF-2, long-R3-IGF-1) se analizan actualmente utilizando procedimientos analíticos de arriba hacia abajo dedicados. Se emplean procedimientos de preparación de muestras específicamente diseñados, seguidos de mediciones específicas de LC-MS (/ MS) centradas en analitos intactos y se han establecido los primeros enfoques hacia los métodos multianalitos (Thevis & Schaänzer, 2017). Estos procedimientos permiten la determinación de las sustancias prohibidas en muestras de control de dopaje en sangre y orina después de aplicaciones terapéuticas.

Además, el uso de nuevos dispositivos complementarios como los analizadores de movilidad iónica, por ejemplo, en espectrómetros de masas híbridos, arroja datos prometedores para la diferenciación de las insulinas isobáricas, lo que describe el potencial para acelerar aún más y multiplexar los métodos analíticos de control de dopaje para satisfacer las demandas en constante aumento de métodos de prueba rápidos e inequívocos (Okano M., Sato, Ikekita, & Kageyama, 2014). Además, se ha demostrado el potencial de LC-MS / MS para apuntar a las hormonas peptídicas recombinantes, como la hormona del crecimiento humano utilizando enfoques ascendentes, apuntando a péptidos proteotípicos que diferencian inequívocamente la molécula recombinante del análogo producido de forma natural y endógena. (Kay et al., 2014)

La cromatografía líquida (espectrometría de masas en tándem) se ha convertido en una herramienta central e invaluable en los modernos laboratorios de pruebas de drogas deportivas. Después de haber sido una instrumentación establecida para varios compuestos de baja masa molecular durante más de una década, aún no se ha adoptado por completo su capacidad única para permitir la detección sensible y específica y también la cuantificación de las hormonas peptídicas.

Las razones principales para que no se haya adoptado podrían ser los esfuerzos y los costos para el análisis de la hormona peptídica por LC – MS (/ MS), que comúnmente son más altos que para los analitos de baja masa molecular, y que los instrumentos generalmente se dedican al análisis de la hormona peptídica y rara vez se usan en combinación para pequeños y grandes mediciones de moléculas. Sin embargo, los primeros procedimientos dirigidos a clases seleccionadas de hormonas peptídicas tales como insulinas, GHRP, IGF, etc. se han implementado con éxito y están disponibles para controles de dopaje de rutina (Popot, Woolfitt, Garcia, & Tabet, 2016).

Además, se han desarrollado los primeros métodos integrales de detección que se convertirán en una parte integral de futuras aplicaciones, respaldados por métodos dedicados y específicamente sensibles que abordan esas diferencias menores entre las drogas peptídicas naturales y recombinantes que permiten la revelación del abuso de drogas.

De acuerdo con la investigación de Semenistaya et al., (2015), los péptidos liberadores de la hormona del crecimiento (GHRP) estimulan la secreción de la hormona del crecimiento endógena; para desarrollar un método eficaz para el control antidopaje de GHRP, investigaron los metabolitos de GHRP-1, GHRP-2, GHRP-6, Hexarelin e Ipamorelin en orina después de la administración nasal. Cada compuesto fue administrado a un voluntario.

Las muestras se recogieron durante 2 días después de la administración, se procesaron mediante extracción en fase sólida en cartuchos de intercambio catiónico débiles y se analizaron mediante cromatografía de nano-líquido - espectrometría de masas de alta resolución. Se identificaron seis metabolitos de GHRP-1. No se detectó GHRP-1 en la forma primaria. El ácido libre GHRP-1. (Semenistaya et al.,2015). (2-4) se detectó en la orina hasta 27 h. GHRP-2, ácido

libre GHRP-2 y ácido libre GHRP-2 (1-3) se detectaron en la orina hasta 47 h después de la administración. GHRP-6 se excretó principalmente sin cambios y se detectó en la orina 23 h después de la administración, sus metabolitos fueron detectables solo durante 12 h

Hexarelin e Ipamorelin se metabolizaron intensamente y se excretaron como un conjunto de compuestos parentales con metabolitos. El ácido libre de hexarelin (1-3) y el ácido libre de ipamorelina (1-4) se detectaron en muestras de orina después de la extracción completa de las sustancias parentales. Los GHRP y sus metabolitos más prominentes se incluyeron en el procedimiento de rutina de cromatografía líquida de ultrapresión y espectrometría de masas en tándem. El método fue completamente validado, se obtuvieron curvas de calibración de analitos específicos y se trazaron curvas de excreción de GHRP y sus metabolitos. Los resultados confirman que la ventana de detección después de la administración de GHRP depende del metabolismo individual, la forma de preparación del fármaco y la forma de administración. (Semenistaya et al., 2015).

Por su parte, Thomas, Walpurgis, Krug, Schänzer y Thevis, (2016), desarrollaron un ensayo de detección que comprendió 11 péptidos prohibidos que están suficientemente purificados de la orina utilizando un intercambio de cationes débil con la determinación posterior de todas las sustancias por medio de separación nanoUHPLC acoplada a espectrometría de masas en tándem de alta resolución. Estos péptidos incluyeron Gonadorelina (LH-RH), Desmopresina y 9 péptidos liberadores de hormona de crecimiento (GHRP-1, -2, -4, -5, -6, Hexarelin, Alexamorelin, Ipamorelin y un metabolito GHRP-2). El método fue validado con un enfoque principal en la interpretación de resultados cualitativos considerando la especificidad de los parámetros, linealidad, recuperación, precisión, límites de detección,

robustez y supresión de iones. La prueba de principio se demostró analizando muestras de orina de estudio de excreción para LHRH, Desmopresina y GHRP-2.

A su vez, Judák, Grainger, Goebel, Van Eenoo y Deventer (2017), reportan que el aditivo de fase móvil (DMSO) se ha descrito como una herramienta útil para mejorar la ionización por electropulverización (ESI) de péptidos y proteínas. Hasta ahora, esta técnica se ha utilizado principalmente en la investigación proteómica / peptídica, y aún no se ha descrito su aplicabilidad en un entorno de laboratorio clínico de rutina, es decir, análisis de control de dopaje. La investigación de esos autores proporciona un método de detección simple y fácil de implementar para la detección de péptidos pequeños relevantes para dopaje (GHRP, GnRH, GHS y análogos de vasopresina) con un peso molecular inferior a 2 kDa aplicando DMSO en la fase móvil.

La ganancia en sensibilidad fue suficiente para inyectar las muestras de orina después de un paso de dilución de dos veces, omitiendo una preparación de muestra que consume mucho tiempo. El procedimiento analítico empleado fue validado para la determinación cualitativa de 36 compuestos, incluidos 13 metabolitos. Los límites de detección oscilaron entre 50 y 1000 pg. / ml y cumplían con el nivel de detección mínimo de 2 ng / ml requerido por la Agencia Mundial Antidopaje (AMA) para todos los péptidos objetivos. Para demostrar la viabilidad del trabajo, se analizaron muestras de orina obtenidas de pacientes que han sido tratados con desmopresina o leuprolida y muestras de orina declaradas como hallazgos analíticos adversos.

Judák, Grainger, Goebel, Van Eenoo y Deventer (2017), concluyeron que la adición del reactivo DMSO a la fase móvil mejora la ionización de péptidos y permite aplicar una estrategia de diluir y disparar. Los principales beneficios de la estrategia de diluir y disparar radican en el

ahorro de tiempo y costos por la omisión del paso de preparación de la muestra. Teniendo en cuenta el aumento progresivo de la sensibilidad de los espectrómetros de masas recientes, se espera alcanzar límites de detección aún más bajos en el futuro cercano utilizando una estrategia LC-MS de diluir y disparar.

En los curcuminoides, la HPLC se ha utilizado como un método rápido y sencillo para la separación y cuantificación simultánea de curcumina y piperina. Para este método se utilizó una columna C18 (250 X 4,6 mm) mediante elución isocrática con 50 mM de ortofosfato de dihidrógeno potásico (pH 3,5): acetonitrilo (40:60) y detección a 424 nm y 340 nm utilizando un detector de matriz de fotodiodos para curcumina y piperina respectivamente. La gráfica de calibración fue lineal sobre el rango estudiado (Curcumina: 100 - 3200ng / mL; Piperina: 200 - 7000ng / mL) con una correlación de 0.999. El método también fue validado por la precisión y recuperación (Nagappan, 2009).

Otros autores reportan un método único de cromatografía líquida / espectrometría de masas en tándem (LC-MS / MS) para cuantificar curcumina, DMC, BDMC, COG, COS y THC simultáneamente en plasma humano. Estos compuestos se extrajeron con acetato de etilo de plasma humano, se separaron en una columna BetaBasic-8 y se controlaron en un espectrómetro de masas triple cuádruple acoplado con electropulverización API en modo de iones negativos. La linealidad de estos respectivos curcuminoides y metabolitos de la curcumina se mostró en el rango de 2 a 1000 ng / ml con una precisión de 85 a 115% y una precisión de $\leq 20\%$ en plasma humano. Este método fue validado de acuerdo con los criterios analíticos GLP de la FDA de EE. UU. Y se aplicó para caracterizar la farmacocinética de la curcumina, COG y COS en plasma humano después de una dosis oral de curcumina biodisponible (Cao, 2014).

Aunque los métodos de cromatografía acoplados a espectrometría de masas son bastante sensibles para la detección de curcumina y curcuminoides su costo es elevado, por este motivo diversos investigadores se han dedicado a evaluar técnicas cromatográficas que permitan su separación y detección con menor costo, así, Antuness, 2020 reporta un método analítico por HPLC-FLD para la evaluación de curcumina en plasma de deportistas suplementados empleando una columna Luna (C18; 150 × 4 mm; 3 µm), acetonitrilo: ácido acético pH 3.2 (45:55 a 60:40) como fase móvil, caudal de 1 mL min⁻¹, excitación a 429/285 nm y emisión a 529 nm e inyección de 10 µl fueron las condiciones cromatográficas utilizadas.

Por su parte, Amanolahi et al., (2017), reportan un método simple, sensible y rápido para la determinación de curcumina en muestras farmacéuticas y tenía suficiente sensibilidad para detectar el producto de degradación de la curcumina producido bajo condiciones de estrés por fotólisis e hidrólisis. Los investigadores optimizaron el método con elución isocrática con acetonitrilo: acetato de amonio (45:55, v / v, pH 3,5), columna C18 (150 mm × 4,6 mm × 5 µm de tamaño de partícula) y un caudal de 1 ml / min en condiciones ambientales y tiempo de retención total de 17 min. El volumen de inyección se fijó en 20 µl y la detección se registró a 425 nm. La solidez del método se examinó cambiando la composición de la fase móvil, el pH de la fase móvil y el caudal.

Conclusiones

Las actividades deportivas individuales y colectivas cumplen un papel crucial en el desarrollo de una sociedad, hoy en día, despiertan pasiones de grandes grupos humanos. Con ello, los deportistas han ido incrementando el desarrollo de sus capacidades físicas, lo que les permite imponer nuevas marcas en diferentes deportes, en parte gracias a la evolución de los equipos basados en nuevos materiales químicos, más flexibles, más ligeros y más fuertes que permiten llegar más lejos, más alto y con mayor velocidad. Sin embargo, ha traído consigo con mayor frecuencia el uso de sustancias o métodos prohibidos en el deporte con la finalidad de obtener mejor rendimiento, fenómeno denominado dopaje.

Una de las moléculas empleadas como método de dopaje es el péptido liberador de la hormona de crecimiento 6 (GHRP-6), el mejoramiento de las técnicas cromatográficas que se emplean en la separación de la hormona GHRP-6 y posterior detección por técnicas acopladas es un desafío para la química nacional relacionada con el deporte. Ante esta situación, se buscó ampliar el conocimiento disponible sobre las técnicas requeridas para la separación del péptido GHRP-6. Sin embargo, lo que se observa es que, en los reportes literarios, poco se hace referencia a las condiciones cromatográficas específicas para la separación de péptidos como la GHRP-6, centrándose principalmente en la literatura en las técnicas de detección a través de espectrometría de masas. De esta manera, continúa abierta la investigación sobre las condiciones óptimas para la separación cromatográfica de muestras biológicas teniendo en cuenta que la separación adecuada en este tipo de péptidos podría mejorar la detección de estas.

La curcumina, sustancia derivada del rizoma de la planta *Curcuma longa* (cúrcuma) con efecto antioxidante 8 veces mayor que la vitamina E, ha llamado la atención de los científicos

por su potente acción antioxidante, ya que, en deportistas sometidos a ejercicio intenso, los mecanismos endógenos de neutralización de especies reactivas están saturados. Sin embargo, las características farmacocinéticas de la curcumina no favorecen su uso medicinal debido a su baja absorción, metabolismo acelerado y rápida eliminación sistémica. Por tanto, la determinación de los niveles plasmáticos en pacientes suplementados es un paso crucial en su evaluación farmacodinámica.

Finalmente, el reto en la separación cromatográfica de moléculas como la GHRP-6 y posterior detección, son la corta vida media en plasma de estos compuestos y su rápida eliminación del organismo. En este sentido la búsqueda continua de la mejora y especificidad en los métodos analíticos es un área de gran importancia en la lucha antidopaje en todas las disciplinas deportivas.

Referencias bibliográficas

AEPSAD. (2018). *Memoria 2018*. Madrid: AEPSAD.

<https://aepsad.culturaydeporte.gob.es/dam/jcr:380864b6-b5ab-443f-83e9-7a51715ba358/memoriaanual2018.pdf>

Agencia Española de Protección de la Salud en el Deporte. (2018). *Los extraños péptidos, el dopaje que ya está aquí y es difícil de detectar*.

<http://deportelimpio.com/media/2568/20180726-bolet%C3%ADn-digital.pdf>

Agis, D., & Castillo, A. (2016). El deporte actual y el problema ético del dopaje. *El Catoblepas*, (175), 5-11.

Alisson A, Flávia F, João M, Mariângela S, Ana K, Kênnia R. (2020). Bioanalytical method by HPLC-FLD for curcumin analysis in supplemented athletes. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 28(5)599-606

Allen, H., Backhouse, S., Hull, J., & Price, O. (2019). Anti-doping Policy, Therapeutic Use Exemption and Medication Use in Athletes with Asthma: A Narrative Review and Critical Appraisal of Current Regulations. *Sports Medicine*, 49(5), 659-668.

Amanolahi, F., Mohammadi, A., Kazemi Oskuee, R., Nassirli, H., & Malaekheh-Nikouei, B. (2017). A simple, sensitive and rapid isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography method for determination and stability study of curcumin in pharmaceutical samples. *Avicenna journal of phytomedicine*, 7(5), 444–453.

Anawalt, B. (2018). Detection of anabolic androgenic steroid use by elite athletes and by members of the general public. *Molecular and cellular endocrinology*, 464, 21-27.

- Arce, V., Tresguerres, J., & Deversa, J. (2000). Hormona de crecimiento. *Humana* (847).
- Arévalo, H., & Peña, Y. (2017). Dopaje en el ciclismo: metodos, sustancias y controles. una mirada actual. *Revista digital: Actividad Física y Deporte*.
- Argente, J. (2018). Hormona de crecimiento. *Revista Española de Medicina Pediràtrica*, 54-56.
- Arquez, L., & Rodríguez, J. (2018). Economía en la era tecnológica de la neurocirugía. *Neurociencias Journal*, 25(1), 46-52.
- Backeljauw, P., & Hwa, V. (2016). Growth hormone physiology. *Growth hormone deficiency*, 7-20.
- Baron, D., Martin, D., & Magd, S. (2017). Doping in sports and its spread to at-risk populations: an international review. *World Psychiatry*, 6(2), 92-118.
- Berlanga, J. (2015). GHRP-6: Un candidato novedoso para la prevención y tratamiento de desórdenes fibróticos. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*, 17-23.
- Björnsson, B., Einarsdottir, I., Johansson, M., & Gong, N. (2018). The Impact of Initial Energy Reserves on Growth Hormone Resistance and Plasma Growth Hormone-Binding Protein Levels in Rainbow Trout Under Feeding and Fasting Conditions. *Frontiers in endocrinology*, 18-29.
- Blasco, R. (2017). Dopaje genético. ¿Estamos dispuestos a arriesgar? *Campa d*, 25-46.
- Bowers, C., & Momany, G. (1984). On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology* 114.5, 1537-1545.

- Cao, Y., Xu, R. X., & Liu, Z. (2014). A high-throughput quantification method of curcuminoids and curcumin metabolites in human plasma via high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 949, 70-78.
- Collado, J., & Sánchez, M. (2017). El proceso de llegar a ser excelente en el deporte: el caso de Pau Gasol. *Cuadernos de Psicología del Deporte*, 17(3), 231-238.
- Constanzer, M., Chavez, C., & Matuszewski, B. (1997). Determination of a novel growth hormone secretagogue (MK-677) in human plasma at picogram levels by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci Appl.*, 131-137.
- Corripio, R., Giménez, O., Ibáñez, M., Krauel, R., Rivero, M., Giménez, O., . . . Vela, F. (2019). Controversias del tratamiento con hormona de crecimiento en pacientes con síndrome de Prader-Willi. *Acta pediátrica española* 77.1, 6-11.
- Cox, H., Hughes, C., & Eichner, D. (2015). Detection of GHRP-2 and GHRP-6 in urine samples from athletes. *Drug Testing and Analysis*, 1-6.
- Cuervo, D., Loli, C., Fernández, M., Muñoz, G., & Carreras, D. (2017). Determination of doping peptides via solid-phase microelution and accurate mass quadrupole time-of-flight LC–MS. *Journal of Chromatography B*, 134-144.
- de Albuquerque, C., Rodríguez, L., Dos Santos, L., & et al. (2018). Non targeted acquisition strategy for screening doping compounds based on GC-ESI hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometry a focus on exogenous anabolic steroids. *Drug Test Anal*, 10, 507-517.

- Domínguez, J. C., García, J. f., & Molina, A. (2015). *Detección de sustancias dopantes en orina mediante cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de tiempo de vuelo*. Londres: Universidad de Jaén.
- Ejskjaer, N., Wo, J., Esfandyari, T., & et. al. (2013). Aphase 2a, randomized, double-blind 28-day study of TZP-102 a ghrelin receptor agonist for diabetic gastroparesis. *Neurogastrocenterol. Motil*, 40-50.
- Esposito, S. (2015). *Doping control analysis of small peptide hormones*. Bélgica: Universiteit Gent.
- Esquivel, A., Pozo, O., Garrotas, L., & et al. (2017). LC-MS/MS detection of unaltered glucoronoconjugated metabolites of metandienone. *Drug Test Anal*, 9, 534-544.
- Fard, A., Rhadfi, T., Mckay, G., Al-marri, M., Abdala, A., Hilal, N., & Hussien, M. (2016). Enhancing oil removal from water using ferric oxide nanoparticles doped carbon nanotubes adsorbents. *Chemical Engineering Journal*, 293, 90-101.
- Ferro, P., Gutiérrez, R., Bosch, J., Farré, M., & Segura, J. (2015). Fit-for-Purpose Radio Receptor Assay for the Determination of Growth Hormone Secretagogues in Urine. *Journal of Biomolecular Screening*, 126812-76.
- Ferro, P., Krotov, G., Zvereva, I., Pérez, M., Mateus, J., & Segura, J. (2017). Detection of Growth Hormone Releasing Peptides in Serum by a Competitive Receptor Binding Assay. *J Chromatogr Sep Tech* 8.351, 1-5.

- Foster, K., Overduin, J., Prudom, C., & et al. (2008). Acyl and total ghrelin are suppressed strongly by ingested proteins, weakly by lipids and biphasically by carbohydrates. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*(5), 1971 -1979.
- Garthe, I., & Maughan, R. (2018). Athletes and supplements: prevalence and perspectives. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, 28(2), 126-138.
- Gerrard, D., & Pipe, A. (2017). Therapeutic use exemptions. *Acute Topics in Anti-Doping*, 62, 55-67.
- Gil, J., Cabrales, A., Reyes, O., Morera, V., Betancourt, L., Sánchez, A., & González, L. (2012). Development and validation of a bioanalytical LC–MS method for the quantification of GHRP-6 in human plasma. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 60, 19-25.
- Grobauer, J., JKosol, S., Shrank, E., & al., e. (2010). The peptide hormone ghrelin binds to membrane mimetics via its octanoyl chain and an adjacent phenylalanine. *Bioorg. Med. Chem*, 5483-5488.
- Honour, J., Conway, E., Hodgkinson, R., & Lam, F. (2018). The evolution of methods for urinary steroid metabolomics in clinical investigations particularly in childhood. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 181, 28-51.
- Jelkman, W., & Lundby, C. (2011). Blood doping and its detection. *Blood*, 118(9), 2394-404.
- Jiménez, J. (2018). *Desarrollo de técnicas espectroscópicas para el estudio y análisis de moléculas de interés biológico*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.

- Judák, P., Grainger, J., Goebel, C., Van Eenoo, P., & Deventer, K. (2017). DMSO assisted electrospray ionization for the detection of small peptide hormones in urine by dilute-and-shoot-liquid-chromatography-high resolution mass spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 28(8), 1657-1665.
- Kaklamanos, A., Rozman, J., Roulis, M., Karagianni, N., Armaka, M., Wu, M., & Rathkolb, B. (2017). Extensive phenotypic characterization of a new transgenic mouse reveals pleiotropic perturbations in physiology due to mesenchymal hGH minigene expressi. *Scientific reports*, 7(1), 23-97.
- Kay, R., Barton, C., Velloso, C., Brown, P., Bartlett, C., Blazeovich, A., . . . Creaser, C. (2014). High-throughput ultra-high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry quantitation of insulin-like growth factor-I and leucinerich alpha-2-glycoprotein in serum as biomarkers of recombinant human growth hormone administration. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 3173–3182.
- Kim, Y., Hong, W., Chung, Y., & et al. (2014). Efficacy and safety of sustained-release recombinant human growth hormone in Korean adults with growth hormone deficiency. *Yonsei Medica Journal*, 55(4), 1042-1048.
- Liao, Y., Deschamps, F., Loures, E., & Ramos, L. (2017). Past, present and future of Industry 4.0-a systematic literature review and research agenda proposal. *International journal of production research*, 55(12), 3609-3629.
- Lin X, Ji S, Qiao X, Hu H, Chen N, Dong Y, Huang Y, Guo D, Tu P, Ye M. Density functional theory calculations in stereochemical determination of terpecurcumins J-W, cytotoxic

terpene-conjugated curcuminoids from *Curcuma longa* L. *J Org Chem* 2013; 78: 11835-48.

Livingston, J. (2019). Competitive youth athletes: how do their families prioritize faith development while participating in sports? *International Journal of Children's Spirituality*, 24(3), 276-289.

López, M., Segura, P., & Maldonado, C. (2015). Protagonismo de la hormona del crecimiento en el proceso de envejecimiento. *Calidad de vida, cuidadores e intervención para la mejora de la salud en el envejecimiento*, 32-53.

Lu, M., Flanagan, J., Langley, R., Hay, M., & Perry, J. (2019). Targeting growth hormone function: strategies and therapeutic applications. *Signal transduction and targeted therapy*, 4(1), 41-52.

Martinez, M., & Kannan, K. (2019). How stable is oxidative stress level? An observational study of intra-and inter-individual variability in urinary oxidative stress biomarkers of DNA, proteins, and lipids in healthy individuals. *Environment international*, 382-389.

Mendoza, L., Caballero, S., Ormea, V., Salazar, G., Loayza, L., & Jauregui, A. (2017). La importancia del sueño en el aprendizaje: visos desde la perspectiva de la neurociencia. *Avances en Psicología*, 25(2), 129-137.

Milot, L. (2014). Ignorance, harm, and the regulation of performance-enhancing substances. *Harv. J. Sports & Ent. L.*, 91-106.

- Min, H., Han, B., Sung, C., Park, J., Lee, K., Kim, H., & Lee, J. (2016). LC-MS/MS Method for Simultaneous Analysis of Growth Hormone-Releasing Peptides and Secretagogues in Human Urine. *Mass Spectrometry Letters*, 7(3), 55-63.
- Missa, J.-N. (2015). Missa, Jean-Noël. "El deporte de competición, laboratorio de la medicina del mejoramiento: análisis ético y filosófico del problema del dopaje." *Revista Colombiana de Bioética* 10.2 (2015): 210-226. Missa, Jean-Noël. "El deporte de competición, laboratorio de la medicina del mejoramiento: análisis ético y filosófico del problema del dopaje." *Revista Colombiana de Bioética* 10.2 (2015): 210-226., 210-226.
- Nagappan, K. V., Meyyanathan, S. N., Raja, R. B., & Kannan, E. (2009). A liquid chromatography method for the simultaneous determination of curcumin and piperine in food products using diode array detection. *Asian Journal of Research in Chemistry*, 2(2), 115-118.
- Nakahara, K., Okame, R., Kayatama, T., & et al. (2010). Nutritional and environmental factors affecting plasma ghrelin and leptin levels in rats. *J. Endocrinol* (207), 95-103.
- Ocano, M., Nishitani, Y., Sato, M., Ikekita, A., & Kageyamna, S. (2010). Influence of intravenous administration of growth hormone releasing peptide-2 (GHRP-2) on detection of growth hormone doping: Growth hormone isoform profiles in Japanese male subjects. *Drug Test. Anal.*, 2-548.
- Okano, M., Sato, A., Ikekita, A., & Kageyama, S. (2010). Determination of growth hormone chromatography (electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid commun.Mass Spectrom.*, 2046-2056.

- Okano, M., Sato, Ikekita, a., & Kageyama, S. (2014). Determination of growth hormone secretagogue pralmorelin (GHRP-2) and its metabolite in human urine by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Mass Spectrom (24)*, 2046-2056.
- Otto, B., Cuntz, U., Fruehauf, E., & et al. (2001). Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur. J. Endocrino.*, 145(5), 669-673.
- Pacentino, D., Kotzalidis, G., Del Casale, A., Aromatario, M., Pomara, C., Girardi, P., & et al. (2015). Anabolic-androgenic steroid use and psychopathology in athletes. *A systematic review*, 101-121.
- Patrizio, P., Ghazal, S., Huirne, J., & Schats, R. (2017). The use of gonadotropin-releasing hormone agonists and the efficiency of in vitro fertilization. *Textbook of Assisted Reproductive Technique*, 163-172.
- Peña, E., González, H., Avendaño, L., Valenzuela, N., Pinelli, A., Muhlia, A., & Peña, E. (2019). Ácidos hidroxicinámicos en producción animal: farmacocinética, farmacodinamia y sus efectos como promotor de crecimiento. *Revisión. Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 391-415.
- Pinyot, A., Nikolovski, Z., Bosch, J., & et al. (2010). On the use of cells or membranes for receptor binding: Growth hormone secretagogues. *Anal. Biochem*, 399(2), 174-181.
- Pinyot, A., Nikolovski, Z., Bosch, J., & et al. (2012). Growth Hormone Secretagogues. Out of competition. *Anal. Biochem*, 1101-1108.

- Popot, M., Woolfitt, M., Garcia, P., & Tabet, J. (2016). Determination of IGF-I in horse plasma by LC electrospray ionisation mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 1843–1852.
- Porra, Y., & Torres, J. (2019). El dopaje deportivo como cuestión socialmente viva: una revisión bibliográfica. *Química Nova*, 42(8), 955-961.
- Pottgiesser, T., & Schumacher, Y. (2013). Current strategies of blood doping detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 9625-9639.
- Puentes, S., & Rodríguez, J. T. (2017). *Efecto e influencia de la inversión destinada al deporte en Colombia*. Bogotá: Universidad CESA.
- Regalado, J., Mendoza, E., & Pineda, C. (2015). *Caracterización del consumo de sustancias de crecimiento muscular en practicantes de levantamiento de pesas de 18 a 35 años, San Salvador, Junio-Julio, 2015*. San Salvador: Universidad de El Salvador. Obtenido de imd.inder.cu.
- Rivas, M., Gracia, R., Yturriaga, R., Sobradillo, B., Rodríguez-Arnan, M., Argente, J., Bueno, M., Ferrández, A., Fernández, J., López-Siguero, J., Vicens, E., Garagorri, J., & Del Valle, J. (1999). *Hipocrecimiento*.
- Rogol, A. (2018). rhGH Abuse for Sports Performance. *Pediatric endocrinology reviews: PER*, 16, 142-149.
- Rogol, A., Miller, G., & Eichner, D. (2019). Growth hormone, growth hormone secretagogues, and insulin-like growth factor-1 in sports: prohibited status, therapeutic use exemptions,

- and analytical detectability. *Current Opinion in Endocrine and Meta. Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 9, 8-13.
- Roldan, M., Herrera, L., & Serna, D. (2019). Dopaje en deportistas: Asunto de difícil manejo a nivel mundial. *revista avfit.co archivos venezolanos de farmacología y terapéutica*, 38(2), 1-7.
- Romero, Y., & Aguilar, J. L. (2017). La ética en la relación atleta-club en el deporte profesional: un análisis crítico desde la filosofía de la ética de Kant, Habermas y MacIntyre. *Visión Gerencial* 2, 336-350.
- Salamanca, A. (2018). *Hormona del crecimiento: Bioquímica y usos farmacológicos*. Madrid: Universidad Complutense.
- Salas, K., & Rojas, D. (2019). Actitud hacia el dopaje y perfeccionismo en atletas profesionales de fútbol, fútbol sala y baloncesto en Costa Rica. *MHSalud: Revista en Ciencias del Movimiento Humano y Salud*, 16(1), 1-17.
- Sandoval, J. A. (2015). *Diseño y caracterización de un sistema liposomal para la administración transdérmica de un péptido sintético con fines cosméticos*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Semenistaya, E., Zvereva, I., Thomas, A., Thevis, M., Krotova, G., & Rodchenkova, G. (2015). Determination of growth hormone releasing peptidesmetabolites in human urine after nasal administration of GHRP-1, GHRP-2, GHRP-6, Hexarelin, and Ipamorelin. *Drug Testing and Analysis*, 919-925.

- Staes, E., Absil, P., Lins, L., & et al. (2010). Acylated and unacylated Ghrelin binding to membranes and to ghrelin receptors: Towards a better understanding of the underlying mechanisms. *Biochem. Biophys.* 5483-5488.
- Sweeney, J., Patterson, C., Menzies, A., Niven, R., Mansur, A., Bucknall, & Heaney, L. (2016). Comorbidity in severe asthma requiring systemic corticosteroid therapy: cross-sectional data from the Optimum Patient Care Research Database and the British Thoracic Difficult Asthma Registry. *Thorax*, 71(4), 339-346.
- Teague, P. (2017). *Effect of dietary ractopamine hydrochloride (Paylean®) supplementation on growth feed efficiency and carcass traits of finisher gilts*. Pretoria, Suráfrica: University of Pretoria.
- Thevis, M. (2015). *Mass spectrometry in sports drug testing – characterization of prohibited substances and doping control analytical assays*. Hoboken, Estados Unidos: Wiley Publishing.
- Thevis, M., & Kuuranne, H. (2014). Annual banned-substance review: Analytical approaches in human sports drug testing. *Drug Test. Anal.* 164-184.
- Thevis, M., & Schänzer, W. (2017). Mass spectrometric identification of peptide hormones in doping control analysis. *Analyst* 132, 287-291.
- Thevis, M., & Schänzer, W. (2014). Analytical Approaches for the detection of emerging therapeutics and non-approved drugs in human doping controls. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 66-83.

- Thevis, M., Thomas, A., & Schänzer, W. (2014). Detecting peptidic drugs, drugs candidates and analogs in sports doping: Current status and future directions. *ExpertRev. Proteomics*, 663-673.
- Thevis, M., Thomas, A., & Schänzer, W. (2014). Doping control analysis of selected peptide hormones using LC–MS(/MS). *Forensic Science International*, 35-41.
- Thomas, A., Delahaut, P., Krug, O., Schänzer, W., & Thevis, M. (2012). Metabolism of growth hormone releasing peptides. *Anal. Chem*, 10252-10259.
- Thomas, A., Hoepfner, S., Greyer, H., Schänzer, W., Petrou, M., Kwiathpwska, D., . . . Trevis, M. (2011). Determination of growth hormone releasing peptides (GHRP) and their major metabolites in human urine for doping controls by means of liquid chromatography mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem*, 507-510.
- Thomas, A., Walpurgis, K., Krug, O., Schänzer, W., & Thevis, M. (2016). Determination of prohibited, small peptides in urine for sports drug testing by means of nano-liquid chromatography/benchtop quadrupole orbitrap tandem-mass spectrometry. *Journal of Chromatogr. A* 1259, 251-257.
- Timms, M., & Schänzer, W. (2018). An immuno polymerase chain reaction screen for the detection of CJC-1295 and other growth-hormone-releasing hormone analogs in equine plasma. *Drug testing and analysis* 11.6, 804-812.
- Timms, M., Hall, N., Levina, J., & Vine, R. (2014-). A high-throughput LCMS/MS screen for GHRP in equine and human urine, featuring peptide derivatization for improved chromatography. *Drug Test. Anal.*, 6-985.

- Tnevis, M., Kuuranne, T., & Geyer, H. (2018). Annual banned-substance review: Analytical approaches in human sports drug testing. *Drug Test Anal.*, 9-27.
- Ulrich, R., Pope, H., Cléret, L., Petróczi, A., Nepusz, T., Schaffer, J., & Simon, P. (2018). Doping in two elite athletics competitions assessed by randomized-response surveys. *Sports medicine*, 48(1), 211-219.
- Vanhee, G., Moens, E., & Deconinck, J. (2014). Characterization of peptide drugs in unknown pharmaceutical preparations seized by the Belgian authorities: Case report on AOD9604. *Drug Test Anal.*, 6-964.
- Viasus, M. L. (2019). *Implicaciones del dopaje deportivo como problema de salud pública: una propuesta de diseño curricular para incorporar la bioquímica a la facultad de Educación Física de la UPN*. Bogotá: Universidad Pedagógica de Colombia.
- World Anti-Doping Agency. (2015). *World Anti-Doping Code*. Obtenido de usada.org: <https://www.usada.org/wp-content/uploads/wada-2015-world-anti-doping-code.pdf>
- World anti-doping agency. (2018). *Minimum required performance levels for detection and identification of non-threshold substances*. Obtenido de wada-ama.org: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2018mrpl_v1_finaleng.pdf
- World Anti-Doping Agency. (n.d.). *Revisión “La Lucha contra el Dopaje en el Deporte : la Lista de Prohibiciones , los Laboratorios Agencia Mundial Antidopaje (AMA)*. 1–14.
- Yoshimoto, A., Mori, K., Sugawara, A., & et al. (2002). Plasma ghrelin and desacyl ghrelin concentrations in renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 13(11), 2748-2752.

Yuan, L. (2019). Sample Preparation for LC-MS Bioanalysis of Peptides. *Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis*, 284-303.

Zhao, T., Sakata, I., Li, R., & et al. (2010). Ghrelin secretion simulated by β -Adrenergic receptors in cultured ghrelinoma cells and in fasted mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 13(11), 15868-15873.

Zhao, X., Yang, S., Zhang, W., & et al. (2013). Fuzi, Lizhong pill compensates hypothyroid-Hypothermia via ghrelin release. *J. Ethnopharmacol.*, 149(3), 707-712.