

## RESEÑA ANALÍTICA

# Diferenciación de esteroides endógenos y exógenos mediante Cromatografía de Gases-Combustión-Espectrometría de Masas de Relaciones Isotópicas

**Rodny Montes de Oca Porto, Aristides Rosado Pérez\* y Margarita Teresa Correa Vidal.**

Instituto de Medicina del Deporte, Laboratorio Antidoping, Departamento Analítico, Calle 100 y Aldabó, Código Postal 10800, Ciudad de La Habana. Fax: (537)643 77 76. Correos electrónicos: antidop@inder.cu; rodnylad@yahoo.com \* Centro de Investigaciones Apícolas, El Cano, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 4 de mayo de 2006. Aceptado: 13 de febrero de 2007.

Palabras clave: doping, perfiles de esteroides urinarios, espectrometría de masas de relaciones isotópicas, esteroides endógenos, testosterona. Key words: doping, urinary steroids profile, isotope ratio mass spectrometry, endogenous steroids, testosterone.

**RESUMEN.** Los perfiles esteroidales urinarios son usados para controlar el abuso de esteroides endógenos tales como la testosterona y la dihidrotestosterona. La relación testosterona/epitestosterona, calculada mediante el empleo de la Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas, se utiliza para controlar la administración de testosterona, si dicha relación es mayor que 4, se sospecha el consumo de testosterona o sus precursores. Investigaciones recientes han demostrado la efectividad de la Espectrometría de Masas de Relaciones Isotópicas de carbono para detectar y confirmar la administración de esteroides endógenos. La relación de los dos isótopos estables de carbono  $^{13}\text{C}$  y  $^{12}\text{C}$  permite la diferenciación entre esteroides naturales y sintéticos debido a que los esteroides sintéticos tienen una menor abundancia de  $^{13}\text{C}$ . De hecho, las relaciones isotópicas de carbono pueden usarse para determinar la administración de esteroides endógenos incluso cuando la relación testosterona/epitestosterona se encuentra en el intervalo de valores normales. En el presente trabajo se discuten los aspectos más importantes relacionados con la diferenciación de esteroides endógenos y exógenos por medio de la Cromatografía de Gases-Combustión-Espectrometría de Masas de Relaciones Isotópicas. Además, este artículo proporciona una revisión acerca de los procedimientos de preparación y purificación de las muestras previo al análisis, así como los efectos de la dieta sobre la relación isotópica de carbono de los esteroides endógenos.

**ABSTRACT.** Urinary steroids profiles are used to control the misuse of endogenous steroids such as testosterone and dihydrotestosterone. The testosterone/epitestosterone ratio, measured by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, is used to control testosterone administration. When T/E ratio is higher than 4, consumption of testosterone or its precursors is suspected. Recent researches have demonstrated the effectiveness of Carbon Isotope Ratio Mass Spectrometry to detect and confirm endogenous steroids administration. The ratio of the two stable carbon isotopes  $^{13}\text{C}$  and  $^{12}\text{C}$  allows the differentiation of natural and synthetic steroids because synthetic steroids have lower  $^{13}\text{C}$  abundance. In fact, the carbon isotope ratios can be used to determine endogenous steroids administration even when testosterone/epitestosterone ratio is at its normal value. In the current work, some of the most important aspects related to differentiation of endogenous and exogenous steroids by means of Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry are discussed. Also, this article provides a review about the purification and sample preparation previous to the analysis, and diet effects on carbon isotope ratio of endogenous anabolic steroids is presented too.

## INTRODUCCIÓN

La detección de esteroides anabólicos en orina humana por medio de la Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas (CG-EM) ha ido mejorando en las últimas décadas. Uno de los retos más importantes ha sido la detección de la administración exógena de andrógenos sintéticos que tienen la misma estructura química que los compuestos endógenos, pues la técnica por excelencia (CG-EM) no ha sido capaz de distinguir entre preparaciones farmacéuticas y esteroides endógenos debido a que presentan idénticos espectros de masas.

La Comisión Médica del Comité Olímpico Internacional (COI) prohibió el uso de la testosterona en 1982 y adoptó el uso de la relación testosterona/epitestosterona ( $T/E > 6$ ) para detectar el abuso de ella. A partir del año 2004, la Agencia Mundial Antidopaje (AMA) sugirió que en los casos donde esa relación sea mayor que cuatro, se someta al individuo a futuras investigaciones en aras de esclarecer si el resultado es debido a condiciones patológicas, fisiológicas o como consecuencia del consumo de esteroides de origen exógeno.<sup>1</sup> No obstante, varios factores han demostrado la posibilidad de interferir en el perfil de esteroides endógenos llevando esta relación a valores por encima de 6. Entre estos factores, se pueden mencionar la administra-

ción de fármacos esteroidales o no esteroidales,<sup>2,3</sup> condiciones fisiológicas o patológicas,<sup>4</sup> orígenes étnicos<sup>5</sup> y el consumo de alcohol entre otros. Hatton y col.<sup>6</sup> y Donike y col.<sup>7</sup> concluyeron en estudios longitudinales realizados que la relación T/E normalmente fluctúa alrededor de la media en un 30 % y con un coeficiente de variación que no debe exceder el 30 %. Teniendo esto en cuenta, se pueden encontrar individuos con esa relación mayor que 6 y ser de origen endógeno. De igual modo, se pueden encontrar individuos con  $T/E < 6$  y haber consumido testosterona de origen sintético. Esto es debido a que por ejemplo las personas de raza oriental (asiáticos) presentan un rápido metabolismo de la testosterona y tienen una relación T/E entre 0,1 y 0,2 en condiciones fisiológicas normales sin el consumo de esteroides. Es por eso que una administración de testosterona exógena no es suficiente para sobrepasar el límite de positividad, lo que puede resultar un falso negativo.<sup>5</sup>

Recientemente, ha sido investigado el uso de la Espectrometría de Masas de Relaciones Isotópicas combinada con la Cromatografía de Gases para la confirmación del abuso de testosterona<sup>8-10</sup> y otros esteroides endógenos como dehidroepiandrosterona (DHEA), dihidrotestosterona (DHT)<sup>11,12</sup> y epitestosterona.<sup>13,14</sup> Esta técnica ha permitido con elevada precisión la medida de la composición isotópica de cada compuesto, pudiendo determinar cuál esteroide es exógeno o endógeno.<sup>15</sup>

Este trabajo tuvo como objetivo discutir los aspectos más importantes relacionados con la diferenciación de esteroides endógenos y exógenos por medio de la Cromatografía de Gases-Combustión-Espectrometría de Masas de Relaciones Isotópicas (CG-C-EMRI), así como proporcionar una revisión actualizada acerca de los procedimientos de preparación y purificación de las muestras previo al análisis. Además, son presentados los efectos de la dieta sobre la relación isotópica de carbono de los esteroides endógenos.

### MEDIDA DE LA RELACIÓN ISOTÓPICA DE CARBONO

Para la medida de las relaciones isotópicas, el analito debe ser convertido en un gas simple isotópicamente representativo de la muestra original antes de entrar en la fuente de un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas. Así, la

medida de  $^2\text{H}/^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  y  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$  son realizadas sobre los gases  $\text{H}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}$  y  $\text{SO}_2$ .<sup>16</sup> Mediante la CG-C-EMRI, los compuestos orgánicos separados por el cromatógrafo de gases son convertidos en un horno de combustión a  $\text{CO}_2$ ; posteriormente, este gas seco pasa al espectrómetro de masas de relaciones isotópicas donde se lleva a cabo el análisis de  $^{13}\text{CO}_2$  y  $^{12}\text{CO}_2$  que permite realizar el cálculo de la relación isotópica para cada compuesto.

La relación isotópica del carbono se expresa en por mil usando la notación delta ( $\delta^{13}\text{C}$  ‰) y está definida como la diferencia relativa en la relación isotópica entre la muestra y un estándar internacional que es una muestra de  $\text{CaCO}_3$  obtenida de la formación Pee Dee en el Sur de Carolina. (PDB o Pee Dee Belemnite).<sup>17</sup> Esta relación se calcula de la manera siguiente:

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = \left[ \frac{\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}_{\text{muestra}}}}{\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}_{\text{PDB}}}} - 1 \right] \cdot 10^3$$

Los esteroides son frecuentemente sintetizados a partir de fitosteroles provenientes de plantas como la soya, la cual presenta una menor cantidad de  $^{13}\text{C}$  que los esteroides endógenos. La principal fuente para la síntesis de esteroides en humanos es el colesterol adquirido durante la dieta diaria por lo que presentan un contenido de  $^{13}\text{C}$  relativamente mayor que los productos provenientes de la soya.<sup>18,19</sup> Así, la relación isotópica de carbono (RIC) de cada esteroide es idéntica a la de su material de partida y por lo tanto, los esteroides endógenos tienen un valor de  $\delta^{13}\text{C}$  mayor que los exógenos o sintéticos.

Para conocer la variación de la RIC del compuesto objeto de dudas, se compara con una sustancia endógena del mismo individuo cuyo valor  $\delta^{13}\text{C}$  no se afecte con el consumo de testosterona y sus precursores que se denomina compuesto endógeno de referencia (CER).

### COMPUESTOS ENDÓGENOS DE REFERENCIA

Para el análisis por CG-C-EMRI en que la variabilidad inter-individual y la calibración instrumental pueden influir significativamente en los resultados, se recomienda relacionar las diferencias de los valo-

res isotópicos de los esteroides con los de un CER. Para este propósito, el colesterol y el pregnandiol son usualmente usados como CER debido a que sus valores isotópicos no deben ser afectados por la administración de esteroides exógenos tales como testosterona,<sup>10,20</sup> DHEA,<sup>11</sup> DHT,<sup>14</sup> y androstendiona<sup>21</sup> (Fig. 1). No obstante, se han observado variaciones en la RIC del pregnandiol cuando se ha ingerido la pregnenolona,<sup>22</sup> lo que ha conducido a la búsqueda de nuevos CER.

En ese sentido, Saudan y col.<sup>23</sup> reportaron que el 16(5 $\alpha$ )-androsteno-3 $\alpha$ -ol (androsteno) podía ser utilizado también como compuesto endógeno de referencia, pues su punto de partida es la pregnenolona al igual que para el pregnandiol y tiene la ventaja de excretarse en mayor proporción en la orina. Ellos obtuvieron valores de -23,29 ‰ para el androsteno y -23,18 ‰ para el pregnandiol en muestras de hombres y de -23,69 y -23,71 ‰ en muestras de mujeres respectivamente, siendo estos resultados comparables con los valores de referencia de sujetos sanos europeos.

En este trabajo, se demostró además, que el consumo exógeno de pregnenolona afectó la RIC del pregnandiol de forma más marcada que para el androsteno; esta diferencia en la RIC entre los dos compuestos puede ser un indicio de administración exógena de pregnenolona. Después de una administración oral de pregnenolona la variación en la RIC del pregnandiol fue del 5,69 ‰, para el androsteno menores del 1 ‰ y los valores mínimos obtenidos para androsteno, etiocolanolona, 5 $\alpha$ -androstano-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol y 5 $\beta$ -androstano-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol fueron de -24,95; -26,00; -25,87 y -26,89 ‰ respectivamente. Las variaciones de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  para estos metabolitos de testosterona fueron menores del 3 ‰. La pregnenolona puede ser biotransformada a androsteno y a testosterona a través de vías que lleven a la formación de 16-eno esteroides y esteroides sexuales respectivamente. Los valores de la RIC obtenidos después de la administración oral de pregnenolona tienden a demostrar que existe una mayor conversión de pregnenolona a pregnandiol comparado con los metabolitos de testosterona y androsteno por lo que este diol puede ser usado como CER aún después de una ingestión de pregnenolona (Fig. 2).

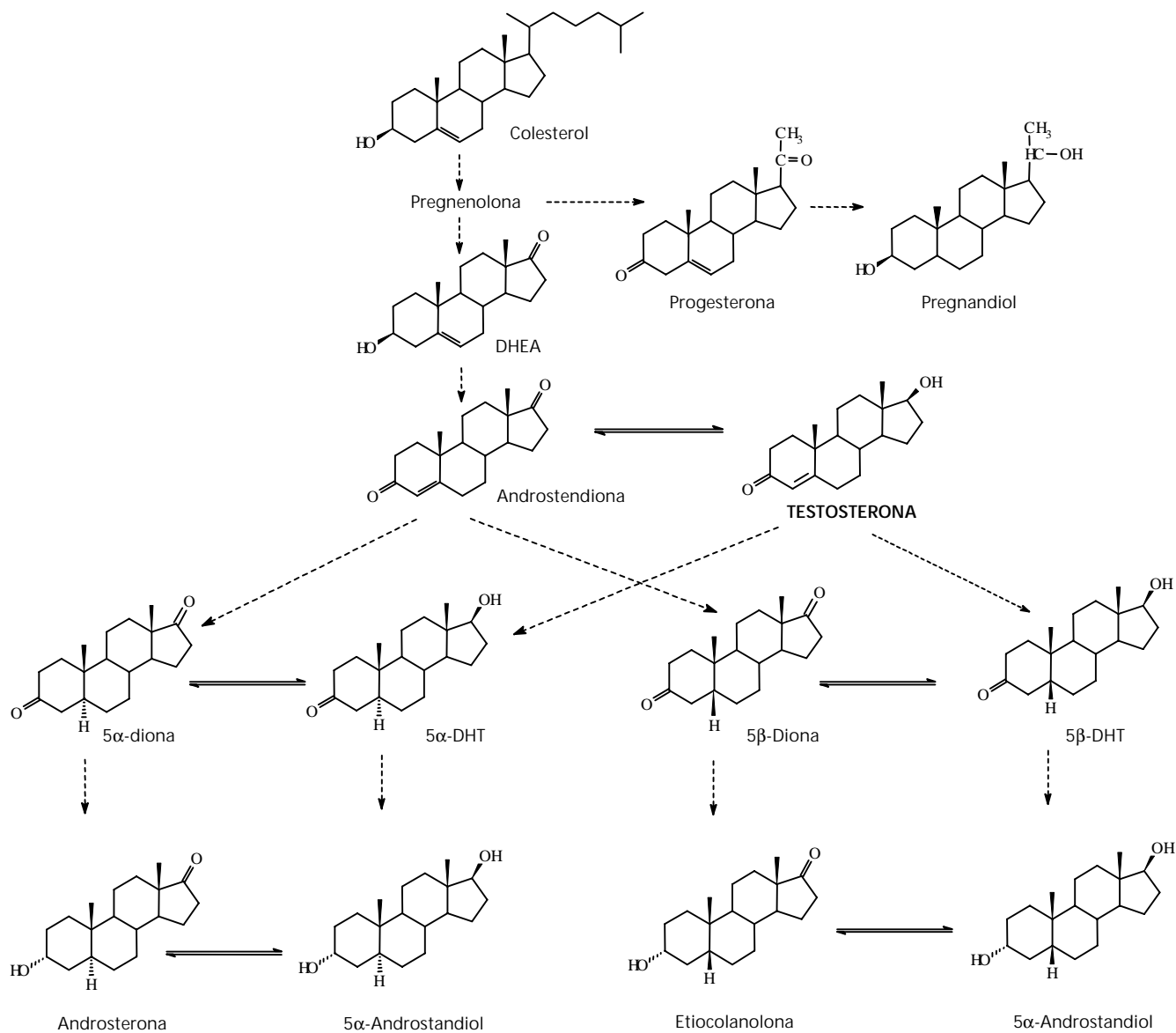


Fig. 1. Ruta metabólica para la síntesis de algunos esteroides endógenos a partir del colesterol.

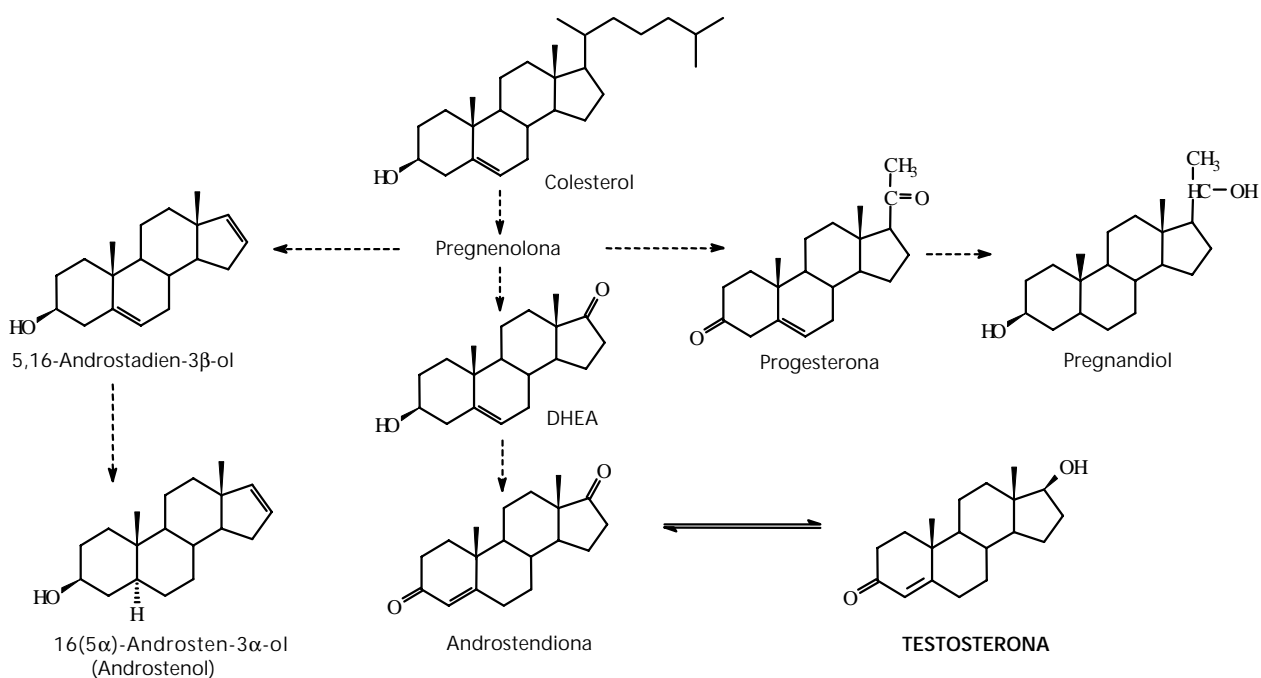


Fig. 2. Ruta metabólica para la síntesis del androstenediol y la testosterona.

## PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PREVIO AL ANÁLISIS POR CG-C-EMRI

Un paso importante para el análisis por CG-C-EMRI es la preparación de las muestras debido a que impurezas pueden afectar el valor de  $\delta^{13}\text{C}$  (‰). La resolución cromatográfica es otro parámetro crítico, pues la medida de la RIC del pico de interés puede ser alterada por coelución o poca separación de los picos cromatográficos.

Existen varios procedimientos para la preparación y purificación de las muestras previos al análisis mediante GC-C-IRMS, algunos de los cuales requieren un volumen relativamente grande de muestra. Los primeros reportes fueron realizados por Aguilera y cols.<sup>8</sup> El método requería aproximadamente 30 mL de orina y era relativamente lento debido al uso de CLAR en la purificación de la muestra. Este método tiene como ventaja que pueden extraerse de la orina varios esteroides para el análisis como por ejemplo: colesterol, DHEA, androst-5-en-3 $\alpha$ -17 $\beta$ -diol (precursor de T), testosterona, y los metabolitos de la testosterona 5 $\beta$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol y 5  $\beta$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol.

Se ha reportado además, el uso de la Inmunoafinidad Cromatográfica (IAC)<sup>24,25</sup> para la purificación de las muestras. El primer reporte lo realizaron Aguilera y cols.<sup>26</sup> en un estudio de comparación entre la IAC y la Cromatografía Líquida de Fase Reversa. Como resultados se obtuvo que ambos métodos de purificación aportan suficientes recobrados y adecuada pureza de testosterona. La cromatografía líquida presenta algunas ventajas sobre IAC tales como larga vida de la columna, acceso a varios esteroides en la orina y no necesita equipo especial ni preparación de anticuerpos. No obstante, la IAC presenta recobrados ligeramente mejores para bajas concentraciones de testosterona y no induce discriminación isotópica.

Con el tiempo, se hizo necesario desarrollar un método que fuera rápido, eficiente y confiable y el propio Aguilera en 1999, publicó un método de preparación de muestras que requería solo 10 mL de orina y no hacía uso de la técnica de CLAR, lo que evitaba además, el riesgo de fraccionamiento isotópico y proporcionaba cromatogramas con excelente separación de los compuestos de interés.<sup>10</sup> Este método se basaba en tres extracciones sucesivas en fase sólida en columnas  $\text{C}_{18}$ . En el primer

paso de extracción, los esteroides conjugados son eluidos con metanol y posterior a su hidrólisis son sometidos a un segundo paso de extracción en el que finalmente son acetilados para su análisis. Después, son purificados en la tercera extracción y los androstandioles y el pregnandiol son eluidos con acetronitrilo luego de un lavado con diferentes proporciones de una mezcla de acetonitrilo-agua.

Aguilera y cols. describieron un método rápido para la medida del valor  $\delta^{13}\text{C}$  de la androsterona y la etiolanolona como indicadores de administración de testosterona, DHT y DHEA.<sup>27</sup> En este método, se emplea un volumen de orina de 2 mL, a la cual se le adiciona  $\beta$ -glucuronidasa de *E. coli* y con posterioridad a la hidrólisis, la muestra se pasa por una columna de extracción en fase sólida y se eluye con acetonitrilo. Después de evaporar a sequedad, se procede a derivatizar con anhídrido acético y piridina para formar acetatos de androsterona y etiolanolona. Este método es mucho más rápido y simple que los otros reportados anteriormente y requiere de un pequeño volumen de muestra.

## DETERMINACIÓN DE TESTOSTERONA, DHEA, DHT Y EPITESTOSTERONA

Varios grupos de investigadores se han concentrado en la búsqueda de indicadores que puedan demostrar con certeza que ha ocurrido un consumo de esteroides endógenos de origen sintético, siendo estos los más importantes y aceptados:

- Absoluta RIC del compuesto de interés. (Bajo contenido de  $^{13}\text{C}$  es evidencia de dopaje).
- Diferencias significativas de la RIC entre el compuesto de interés y sus precursores (El resultado indica doping si el contenido de  $^{13}\text{C}$  del compuesto es relativamente menor que el de sus precursores o algún esteroide de referencia).
- Tendencias de la RIC del compuesto de interés a través de estudios longitudinales en muestras sospechosas (inestabilidad, rápido ascenso o descenso de la RIC del compuesto indica dopaje).<sup>28</sup>

La testosterona de origen natural excretada en orina humana ha presentado un gran contenido de  $^{13}\text{C}$  en relación con la de origen sintético y por consiguiente, difieren en la relación  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ . Por esta razón, la detección de modificaciones en esta relación  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  en la testosterona y sus metabolitos es una evidencia direc-

ta de la administración exógena de testosterona sintética, algún precursor o de sus correspondientes metabolitos. Se ha sugerido que valores de RIC de alrededor de -29 ‰ o menores para la testosterona y sus metabolitos son evidencias conclusivas de administración de testosterona exógena.<sup>8,9,12</sup>

Para la detección del abuso de testosterona, Shackleton<sup>20</sup> realizó el análisis de dos androstandioles 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol y 5 $\beta$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol y observó que la RIC decreció desde -26,-28 ‰ hasta -29,-30 ‰ tras la administración de testosterona de origen sintético. Los valores de los dioles estuvieron en concordancia con los reportados por Aguilera y cols. anteriormente.<sup>9</sup> La diferencia entre los métodos de Aguilera y Shackleton radica en el modo de preparación de las muestras; el del segundo tiene como ventaja que todos los analitos son medidos en el mismo cromatograma mientras que en el de Aguilera, se requieren al menos dos análisis por separado de CG-C-EMRI para la medición de la RIC para los dioles y su CER (colesterol). En este trabajo, se plantea además, el uso de la relación de  $\delta^{13}\text{C}$  de los androstandioles y el pregnandiol como una herramienta útil para la detección del abuso de testosterona con lo que resultan positivas las muestras cuya relación sobrepase el valor de 1,1.

Por otra parte, Ueki M. y cols.<sup>11</sup> presentaron un procedimiento detallado para la detección del consumo exógeno de DHEA. Durante la preparación de la muestra, se llevó a cabo un fraccionamiento de los esteroides en la orina en libres, glucuronidos y sulfo-conjugados. Para todas las muestras analizadas, 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, 5 $\beta$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol y el pregnandiol fueron los mayores dioles encontrados en la fracción glucuronida mientras que en la fracción sulfo-conjugada la DHEA mostró siempre el pico más intenso aunque hubo grandes variaciones interindividuos en cuanto a la concentración. Durante un estudio de administración controlada, observaron que el valor de  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) de la DHEA decreció entre 4 y 6 ‰ dentro de las primeras 8 h y retornó a su nivel inicial gradualmente en un tiempo cercano a las 72 h. Estos resultados sugieren que el contenido de  $^{13}\text{C}$  de los esteroides en términos de valores  $\delta^{13}\text{C}$  proporcionan un excelente indicador para detectar dopaje con esteroides sintéticos. Para las muestras negativas la rela-

ción dioles/pregnandiol se mantuvo por debajo de 1 para todos los casos. Por último, se concluyó que a pesar de la gran variabilidad de las concentraciones de DHEA por razones étnicas y de edad, los valores de la relación isotópica para este compuesto, se mantuvieron con pequeñas variaciones interindividuales, lo que hace de este método una herramienta potente para el diagnóstico del consumo de este esteroide y de otros relacionados.

Actualmente, las principales investigaciones están siendo centradas en la búsqueda de nuevos marcadores del consumo de esteroides de origen sintético. Recientemente, Cawley y cols.<sup>29</sup> descubrieron que podían utilizar un nuevo compuesto para detectar el abuso de DHEA, el 3 $\alpha$ ,5-ciclo-5 $\alpha$ -androstan-6 $\beta$ -ol-17-ona (3 $\alpha$ ,5-ciclo) (Fig. 3). Este compuesto es excretado en elevadas concentraciones en la orina y su concentración aumenta considerablemente tras la administración de DHEA. En este trabajo, se observó que tras una administración simple, la RIC del 3 $\alpha$ ,5-ciclo varió desde -24,3 ‰ a un mínimo de -31,1 ‰ y para una administración múltiple, el mínimo observado fue de -33,9 ‰ durante la fase de administración en contraste con el valor inicial de -24,2 ‰. Estos resultados hacen esperar que análogos de 3 $\alpha$ ,5-ciclo puedan ser usados como marcadores que indiquen la administración de otros  $\Delta^5$  esteroides que sean prohormonas prohibidas.

Por otra parte Cawley y col.<sup>30</sup> demostraron que la administración de DHEA produjo un incremento en la diferencia en la RIC entre la androsterona y la eticolanolona desde 1,6 ‰ en el momento de la administración hasta 5,1 ‰ a las 26 h de administrado el fármaco. Esto es una evidencia de que el metabolismo de la DHEA es preferencial para la formación de eticolanolona con relación a la androsterona. Durante una administración de dosis múltiple de DHEA los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  decrecieron durante el periodo de excreción para la eticolanolona (desde -31,7 hasta -34,6 ‰) y la androsterona (desde -31,4 hasta -33 ‰), siendo el de la DHEA administrada de -31,3 ‰.

La DHT presenta efectos anabólicos más potentes que la testosterona por lo que es estrechamente vigilada por los laboratorios antidoping. El consumo de DHT es controlado comparando las relaciones de dioles excretados en la orina, la 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (5 $\alpha$ AD) y 5 $\beta$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (5 $\beta$ AD). La

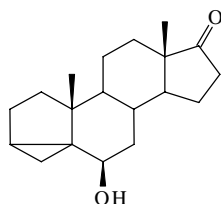


Fig. 3. Estructura del 5-ciclo-5 $\alpha$ -androstan-6 $\beta$ -ol-17-ona (3 $\alpha$ ,5-ciclo).

relación (5 $\alpha$ AD/5 $\beta$ AD) > 1,5 es usada como indicador de la administración de DHT en hombres. El metabolismo de DHT es diferente al de la testosterona, ya que solo se forman metabolitos 5 $\alpha$ , de ahí la importancia de la relación 5 $\alpha$ AD/5 $\beta$ AD. La medida de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  para los metabolitos 5 $\alpha$  (androsterona y 5 $\alpha$ AD) y 5 $\beta$  (etiocolanolona y 5 $\beta$ AD) permiten determinar la presencia de la administración exógena de DHT y testosterona y distinguir entre ellos. Los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  para la DHT fueron más negativos que los de la testosterona, pregnandiol y pregnantriol. Además, los metabolitos 5 $\alpha$  [androsterona (-32,8 ‰) y 5 $\alpha$ AD (-33,6 ‰)] fueron más negativos comparados con sus isómeros 5 $\beta$  [etiocolanolona (-23,6 ‰) y 5 $\beta$ AD (-22,6 ‰)].<sup>11</sup>

La epitestosterona es de gran interés en el campo del control antidoping pues esta es el denominador de la relación T/E, o sea, un marcador indirecto de la administración de testosterona, androstendiona y DHEA como ya se explicó anteriormente. Teniendo esto en cuenta, la epitestosterona puede ser consumida con el objetivo de disminuir esa relación, por lo que el COI la ha clasificado como un agente enmascarante en la orina y los laboratorios deben reportar los casos en los cuales su concentración exceda los 200  $\mu\text{g/L}$ . La epitestosterona no se vende en el mercado ni como medicamento ni como suplemento nutricional por no tener usos clínicos. Aguilera y cols.<sup>13</sup> investigaron la RIC de epitestosterona sintética y el valor de  $\delta^{13}\text{C}$  de la epitestosterona urinaria en muestras de orina obtenidas de voluntarios sanos y atletas. Los valores obtenidos de  $\delta^{13}\text{C}$  para la epitestosterona sintética fueron de -30,3 a -34,9 ‰, mientras que los valores obtenidos en orina fueron de -23,8 con un intervalo de -21,8 ‰ a -25,6 ‰, concluyendo que valores de epitestosterona por encima de 200  $\mu\text{g/L}$  y  $\delta^{13}\text{C}$  menores de -26 ‰ proporcionan evidencias convincentes de doping con epitestosterona.

## DETERMINACIÓN DE CORTICOSTEROIDES

Como se ha expuesto anteriormente, el uso de CG-C-EMRI no ha sido aplicado solamente en la detección del consumo de testosterona y en este sentido, Aguilera y col.<sup>31</sup> reportaron una evaluación preliminar en caballos de un método para diferenciar la hidrocortisona endógena de la preparación farmacéutica. El valor de  $\delta^{13}\text{C}$  de la hidrocortisona natural obtenido fue de -26,7 ‰ (CV = 1,7 ‰) mientras que los obtenidos a los 30 min de la administración fueron de -31,6 ‰ (CV = 3,4 ‰). Este método, sin embargo, no es capaz de detectar el consumo de la hormona corticotrófica, responsable de la inducción de la biosíntesis de hidrocortisona. Lógicamente las concentraciones urinarias de este compuesto se incrementarían con el consumo, pero la relación isotópica revelaría una producción natural.

Siguiendo los resultados alentadores obtenidos por Aguilera y col. para la detección de hidrocortisona en caballos, Bourgogne y col.<sup>32</sup> emprendieron una investigación similar sobre hidrocortisona (cortisol) y cortisona en humanos. Debido a que las concentraciones de cortisol y cortisona son relativamente bajas en orina para el análisis por CG-C-EMRI, el análisis se basó en sus mayores metabolitos, tetrahydrocortisol (THF) y tetrahydrocortisona (THE), respectivamente. Después de una extracción en fase sólida, procedieron a una oxidación con dicromato de potasio con el objetivo de convertir en grupos ceto las funciones hidroxilo en las posiciones 3,11 y 17 con la consecutiva pérdida de la cadena lateral en 17 $\beta$ . Por lo tanto, THF y THE fueron oxidadas a 5 $\beta$ -androstan-3,11,17-triona con el objetivo de obtener un producto final en concentración suficiente para ser analizado por CG-C-EMRI, ya que ambos THF y THE son influenciados por la administración de hidrocortisona y cortisona. Teniendo todo esto en cuenta, es utilizado entonces la 5 $\beta$ -androstan-3,11,17-triona como un buen marcador de la aplicación exógena de corticosteroides. Al evaluar varios corticosteroides de origen sintético, obtuvieron una media de  $\delta^{13}\text{C}$  de -27 ‰ y para la THE y THF en muestras blanco de orina de -23 ‰, por lo que proponen como criterio de positividad un valor de -26 ‰ para la 5 $\beta$ -androstan-3,11,17-triona.

## DETERMINACIÓN DE 19-NORESTEROIDES

En años recientes, se han presentado los primeros resultados relacionados con la determinación de la relación  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  de 19-noresteroides,<sup>24</sup> utilizando un procedimiento de purificación por IAC y por extracción en fase sólida. Durante este proceso de purificación, los rendimientos obtenidos fueron de 17 % para la 19-norandrosterona (19-NA) y del 3 % para la 19-noreticolanolona (19-NE). Estos rendimientos son insuficientes para los propósitos de un análisis de GC-C-EMRI. Con la extracción en fase sólida, se logra entre otras cosas, la eliminación de las grandes cantidades de eticolanolona, la cual puede interferir en el análisis isotópico. El recobrado de este método se comportó entre un 54 y 60 %. Los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  obtenidos para preparaciones farmacéuticas tuvieron un bajo contenido de  $^{13}\text{C}$  (-28,7 y -30,5 ‰) mientras que los valores de otros esteroides endógenos (androsterona, eticolanolona, androstendiolos) fueron entre -15 y -26 ‰. Como se sospecha que la nandrolona endógena se forma por demetilación de un precursor endógeno, su  $\delta^{13}\text{C}$  debe estar dentro del mismo intervalo de valores que el del precursor. Además, recientemente se ha demostrado la formación de 19-noresteroides en muestras de orina almacenadas por demetilación de esteroides endógenos.<sup>33</sup>

Estos autores<sup>24</sup> describen un método potencialmente útil para resolver los casos de doping con nandrolona; sin embargo, existen limitaciones serias respecto a su sensibilidad, ya que requiere concentraciones urinarias del 19-NA de alrededor de 60 ng/mL. Se plantea además que con este método, el mayor metabolito de la testosterona (androsterona) está presente en la fracción purificada conjuntamente con la 19-NA por lo que podría ser usado como compuesto endógeno de referencia.

Desroches M.C. y cols.<sup>25</sup> optimizaron un método de purificación para la 19-NA en orina humana mediante cromatografía de inmunoafinidad seguida de análisis por CG-C-EMRI y llegaron a la conclusión de que una cantidad de alrededor de 450 ng de 19-NA es necesaria para obtener un valor fiable de  $\delta^{13}\text{C}$ . Concluyeron que si bien se recomienda la acetilación para el análisis de 19-NA mediante CG-C-EMRI porque mejora el comportamiento cromatográfico e incrementa la sensibilidad, sus resultados fueron muy buenos sin emplear nin-

gún procedimiento de derivatización.

De acuerdo con estos últimos reportes relacionados con el análisis de 19-noresteroides por CG-C-EMRI, se deducen dos aspectos importantes: primero, que es imprescindible la aplicación de un procedimiento previo de purificación ya sea por inmunoafinidad o por CLAR y segundo, que existen limitaciones de sensibilidad inherentes a esta técnica, teniendo en cuenta que los metabolitos de nandrolona pudieran estar en concentraciones cercanas a los niveles de cortes establecidos por la AMA y el COI.

## INFLUENCIA DE LA DIETA SOBRE LA RELACIÓN ISOTÓPICA DE CARBONO

La abundancia natural de los isótopos estables en la Naturaleza no presenta un valor fijo y constante, de hecho, muestran un considerable grado de variación que está asociado entre otros factores, a las diferentes vías de asimilación y fijación de carbono.

En las plantas ocurre un proceso de discriminación isotópica durante el proceso de la fotosíntesis y existe un grupo de ellas en el que el proceso de fijación del  $\text{CO}_2$  resulta en la formación de 3-fosfoglicerato (3-PGA). Este tipo de planta es denominada  $\text{C}_3$  y este proceso de fijación del  $\text{CO}_2$  es conocido como ciclo de Calvin. No obstante, algunas plantas hacen uso de vías diferentes, pues la fijación de  $\text{CO}_2$  es el resultado de la formación de un ácido dicarboxílico  $\text{C}_4$ , el oxalacetato. Este tipo de planta es denominada  $\text{C}_4$  y este proceso de fijación del  $\text{CO}_2$  es conocido como ciclo de Hatch-Slack. Los productos de estas dos vías son caracterizados por sus diferencias en la abundancia de  $^{13}\text{C}$ . Por ejemplo, la glucosa derivada de plantas  $\text{C}_3$  (remolacha) tiene un valor de  $\delta^{13}\text{C}$  de alrededor de -25 ‰, mientras que la glucosa derivada de las  $\text{C}_4$  (caña de azúcar) exhibe valores más positivos de  $\delta^{13}\text{C}$  de alrededor de -11 ‰, indicando una discriminación isotópica en el proceso de fijación del  $\text{CO}_2$  durante el ciclo de Hatch-Slack.<sup>16</sup> La abundancia de  $^{13}\text{C}$  en los humanos es la consecuencia del consumo de plantas  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$  y carnes, pescado, etc., por lo que el contenido de  $\delta^{13}\text{C}$  en los esteroides endógenos es relativamente mayor que aquellos que son sintetizados a partir de productos como la soya ( $\text{C}_3$ ).<sup>28</sup>

La RIC de los esteroides endógenos varía entre individuos de diferentes países en dependencia de las

costumbres dietéticas que presenten y recientemente fue publicado un estudio en el que se compararon muestras provenientes de atletas de Australia, Nueva Zelanda, China y Kenia. Teniendo en cuenta los modelos dietéticos, era de esperar resultados similares entre Australia y Nueva Zelanda y diferentes a los de China y Kenia. En este trabajo se observó que la media de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  de cada país era diferente al de Kenia teniendo este los valores menos negativos de  $\delta^{13}\text{C}$ . Esto está de acuerdo con expectativas que relacionan una gran proporción de maíz ( $\text{C}_4$ ) en su dieta.<sup>34</sup>

Por otra parte, para corroborar la dependencia de la dieta sobre la RIC, un estudio demostró que cambios en los patrones de alimentación del ganado podrían conducir a cambios en los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  de los esteroides endógenos. Después de cambiar la alimentación de plantas  $\text{C}_4$  a  $\text{C}_3$ , importantes cambios en el  $\delta^{13}\text{C}$  fueron observados variando desde -19 y -23 ‰ hasta -24 y -32 ‰ para eticolanolona y epitestosterona respectivamente. Luego de un segundo cambio de  $\text{C}_3$  a  $\text{C}_4$  los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  se restablecieron a sus valores originales. Estos resultados muestran que en el caso de la alimentación con plantas  $\text{C}_3$ , los valores endógenos de  $\delta^{13}\text{C}$  pueden alcanzar los -32 ‰.<sup>35</sup>

Saudan y col.<sup>36</sup> estudiaron el comportamiento de la RIC de tres atletas, los cuales vivían en Suiza, pero pasaban entre uno y dos meses en países de África. Todos los esteroides urinarios seleccionados en este estudio son derivados del colesterol, pero producidos por vías metabólicas diferentes. Por lo tanto, diferencias significativas en el enriquecimiento de  $^{13}\text{C}$  de estos esteroides inducidos por intercambio de diferentes fuentes de carbono pueden tener lugar dentro de un corto período de tiempo después de los cambios en la dieta con ingredientes  $^{13}\text{C}$  enriquecidos. Esto produjo variaciones en la RIC de los esteroides endógenos de hasta 2,5 ‰ en un sujeto. No obstante, la diferencia de la RIC entre los metabolitos de la testosterona analizados (androsterona, eticolanolona y 5 $\beta$ -androstandiol) y los compuestos endógenos de referencia (androstenol y 5 $\beta$ -pregnandiol) fueron menores de 0,8; 0,7 y 0,9 ‰ para cada sujeto respectivamente. Por lo tanto, estos resultados no son indicativos de doping con testosterona o alguno de sus precursores. En contraste con los resultados obtenidos por CG-C-

EMRI, el perfil urinario de la relación T/E no se vio afectado por los cambios en la dieta.

## CONCLUSIONES

El creciente desarrollo tecnológico ha permitido la detección de agentes dopantes que además son producidos por el cuerpo humano. Mediante el uso de la CG-C-EMRI se puede calcular con elevada precisión y gran exactitud la relación isotópica atómica, lo que ha permitido la diferenciación entre esteroides endógenos y exógenos. Como ha quedado evidenciado en este trabajo, los compuestos obtenidos por síntesis químicas no son capaces de revelar una relación isotópica atómica similar a los producidos por el cuerpo humano, siendo esta diferencia el punto clave para su detección. Se ha demostrado además que modificaciones en la dieta desempeñan un papel importante en la relación isotópica de carbono de los esteroides endógenos, pero ellas no son capaces de sobrepasar los límites establecidos como indicio de dopaje. Por otra parte, las corrientes actuales van encaminadas a la búsqueda de nuevos marcadores del consumo de esteroides endógenos sintéticos y de nuevos compuestos endógenos de referencias, en aras de un mejor esclarecimiento en las sospechas de consumo de ellos. Sin embargo, es imprescindible continuar trabajando en la aplicación de procedimientos previos de purificación y aislamiento de los compuestos de interés con el objetivo de alcanzar una mayor sensibilidad y confiabilidad de los resultados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. The World Antidoping Code. List of Doping Classes and Method. 2006.
2. De la Torre X., Ortuño J., Segura J., Cabrer J. and Vilardell E. Stanozolol, metenolone and steroids profile. Recent advances in doping analysis. Donike *et al.* (eds.). Sport und Buch Straub., Koln, Germany, 69-83, 1994.
3. Kicman A.T., Oftebro H., Walker Ch., Norman N. and Cowan D.A. Potential use of ketoconazole in a dynamic endocrine test to differentiate between biological outliers and testosterone use in athlete. **Clinical Chemistry**, **39**, 1798,1993.
4. Ellis L. and Nyborg H. Racial/ethnic variations in male testosterone levels: a probable contributor to group differences in health. **Steroids**, **57**, 72, 1992.
5. De la Torre X., Segura J., Yang Z., Li Y. and Wu M. Testosterone detection in different ethnic groups. Recent advances in doping analysis, vol. 4. Schänzer *et al.* (eds). Sport und Buch Straub, Koln, Germany, 71-89, 1997.
6. Hatton C.K., Catlin D., Straus P.W. and Starcevic S.H. Urinary steroids profiles: a longitudinal study. Proc., 38th American Society for Mass Spectrometry Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June 3-8, Tucson, AZ, 1004-1005, 1990.
7. Donike M., Rauth S., Mareck-Engelke U., Geyer H. and Nitschke R. Evaluation of longitudinal studies, the determination of subject based reference ranges of testosterone/epitestosterone ratio. 11th Cologne Workshop on Dope Analysis, Sport und Buch Straub, Koln, Germany, 33-39, 1994.
8. Becchi M., Aguilera R., Farizon Y., Flament M.M., Casabianca H., and James P. Gas Chromatography/Combustion/Isotope-ratio Mass Spectrometry Analysis of urinary steroids to detect misuse of Testosterone in sport. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, **8**, 304, 1994.
9. Aguilera R., Becchi M., Casabianca H., Hatton C.K., Catlin D.H., Starcevic B., and Pope H.G Jr. Improved method of detection of testosterone abuse by Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry analysis of urinary steroids **Journal of Mass Spectrometry**, **31**,169, 1996.
10. Aguilera R., Catlin D.H., Becchi M., Phillips A., Wang C., Swerdloff R.S., Pope H.G. and Hatton C.K. Screening urine for exogenous testosterone by isotope ratio mass spectrometry analysis of one pregnandiol and to androstenediols **J. Chromatogr. B.**, **72**, 95, 1999.
11. Ueki M., and Okano M. Analysis of exogenous dehydroepiandrosterone excretion in urine by gas chromatography-Combustion-Isotope ratio Mass Spectrometry **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, **13**, 2237, 1999.
12. Horning S., Geyer H., Flenker U. and Schänzer W. Detection of Exogenous Steroids by  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Analysis. Recent advances in doping analysis, vol.5. Schänzer *et al.* (eds.). Sport und Buch Straub, Koln, Germany 135-148, 1997.
13. Aguilera R., Hatton C.K. and Catlin D. Detection of Epitestosterone doping by Isotope Ratio Mass Spectrometry. **Clinical Chemistry**, **48**, 629, 2002.
14. Shackleton C., Roitman E., Philips A. and Chang T. Androstenediol and 5-androstenediol profiling for detecting exogenously administered dihydrotestosterone, epitestosterone and dehydroepiandrosterone: Potential use in gas chromatography isotope ratio mass spectrometry. **Steroids**, **62**, 665, 1997.
15. Sifer J.A., Engel M.H., Macko S.A. and Jumeau E.J. Stable carbon isotope analysis of amino acid enantiomers by conventional isotope ratio mass spectrometry and combined gas chromatography isotope ratio mass spectrometry. **Anal. Chem.**, **63**, 370, 1991.
16. Meier-Augenstein W. Applied gas chromatographic coupled to isotope ratio mass spectrometry **J. Chromatogr. A.**, **842**, 351, 1999.
17. De la Torre X., González J.C., Pichini S., Pascual J. and Segura J.  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Isotope ratio MS analysis of testosterone, in chemical and pharmaceutical preparations. **J. Pharm. and Biom. Anal.**, **24**, 645, 2001.
18. Southan G., Mallat A., Jumeau J., Craig S., Poojara D. and Mitchel D. Programme and Abstracts of the Second International Symposium on Applied Mass Spectrometry in the health Sciences. Barcelona. 306, 1990.
19. Coopen J. Steroids: from plant to pills-the changing picture. **Trop. Sci.**, **21**, 125, 1979.
20. Shackleton C., Philips A., Chang T. and Li Y. Confirming testosterone administration by isotope ratio mass spectrometric analysis of urinary androstenediols. **Steroids**, **62**, 379, 1997.
21. Ayotte C., Gouldreault D., Lajeunesse A., Cleorux M., Richard Y., Charlebois A., Couture J. and Fakarian A. GC-C-IRMS and GC-MS in "Natural" Steroids testing. Recent advances in doping analysis. Vol. 9. Schänzer *et al.* (eds.). Sport und Buch Straub, Koln, Germany, 133-143, 2001.
22. Ferry M., Mathurin J., Becchi M. and de Ceauritz J. Influence of pregnenolone administration on IRMS analysis. Recent advances in doping analysis. Vol. 8. Schänzer *et al.* (eds.). Sport und Buch Straub, Koln, Germany, 209-213, 2000.
23. Saudan C., Baume N., Mangin P. and Saugy M. Urinary analysis of 16(5 $\alpha$ )-androst-3 $\alpha$ -ol by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry: implication in Anti-doping analysis. **J. Chromatogr. B.**, **810**,157, 2004.
24. Mathurin J., Herrou V., Bourgogne E., Pascaud L. and Ceaurritz J. Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry analysis of 19-norsteroids: Application to the detection of a nandrolone metabolite in urine **J. Chromatogr B.** **759**, 267, 2001.
25. Desroches M.C., Mathurin J.C., Richard Y., Delahaut P., and de Ceaurritz J. Urinary 19-norandrosterone purification by immunoaffinity chromatography: application to gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, **16**, 370, 2002.
26. Aguilera R., Becchi M., Grenot C., Casabianca H. and Hatton C.K. Detection of Testosterone misuse: comparison of two chromatography samples preparation methods for gas chromatographic-combustion-isotope ratio mass spectrometric analysis. **J. Chromatogr. B.**, **687**, 43, 1996.
27. Aguilera R., Chapman T. and Catlin D. A rapid screening assay for mea-

- suring urinary androsterone and ethiocholanolone  $\delta^{13}\text{C}$  values by gas chromatographic-combustion-isotope ratio mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, **14**, 2294, 2000.
28. Ueki M. and Okano M. Doping with natural steroids. **J. Toxicol. Toxin Reviews.** **18**, 177, 1999.
29. Cawley A. T., Hine E.R., Trout G.J., George A.V. and Kazlauskas R. Searching for new markers of endogenous steroids administration in athletes: "looking outside the metabolic box". **Forensic Science International**, **143**, 103, 2004.
30. Cawley A.T., Kazlauskas R., Trout G.J., Rogerson J.H. and George A.V. Isotopic fractionation of endogenous anabolic androgenic steroids and its relationship to doping control in sports. **J. Chromatogr. Sci.**, **43**, 32, 2005.
31. Aguilera R., Becchi M., Mateos L., Popot M.A., Bonnaire Y., Casabianca H. and Hatton C.K. Detection of exogenous hydrocortisone in horse urine by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry **J. Chromatogr. B.**, **702**, 85, 1997.
32. Bourgogne E., Herrou V., Mathurin J.C., Becchi M. and de Ceaurriz J. Detection of exogenous intake of natural corticosteroids by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry: application to misuse in sport. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, **14**, 2343, 2000.
33. Grosse J., Anielski P., Hemmersbach H., Lund H., Mueller R.K., Rautemberg C. and Thieme D. Formation of 19-norsteroids by in situ demethylation of endogenous steroids in stored urine samples. **Steroids**, **70**, 499, 2005.
34. Cawley A., Rogerson J., Rahman K., Trout G. and Kazlauskas, R. Preliminary results on the carbon isotope ratios of ketonic steroids in urine samples collected from different countries. Recent advances in doping analysis, vol. 11. Schänzer et al. (eds.). Sport und Buch Straub, Koln, Germany, 183-93, 2002.
35. Balizs G., Jainz A. and Horvatovich P. Investigation of the feeding effect on the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope ratio of the hormone in bovine urine using gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry **J. Chromatogr. A.**, **1067**, 323, 2005.
36. Christophe S., Matthias K., Giulia B., Neil R., Aurélien D., Patrice M. and Martial S. Longitudinal profiling of urinary steroids by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry: Diet change may result in carbon isotopic variations. **J. Chromatogr. B.**, **831**, 324, 2006.



## CONSERVACIÓN ESTRUCTURAL AL TRANSPORTE

# DUCAR

La conservación de los vehículos contra el deterioro es una práctica que emplean muchos países, incluyendo aquellos de un elevado desarrollo económico.

El Centro de Estudios Anticorrosivos y Tensoactivos oferta un nuevo servicio técnico sustentado en el empleo de productos desarrollados en sus propias instalaciones, que tiene como objetivo alargar la vida de la estructura de los vehículos automotores.

Actividades que incluye el servicio:

- ✓ Identificación y solución de los problemas de diseño anticorrosivo.
- ✓ Identificación y solución de los problemas de corrosión y protección de los recubrimientos de pintura y otros tipos de recubrimientos.
- ✓ Eliminación del óxido y de los puntos de corrosión.
- ✓ Protección a componentes huecos y áreas cerradas.
- ✓ Protección de partes inferiores del vehículo.
- ✓ Aplicación de recubrimiento impermeabilizante y abrillantador de pinturas con ceras nacionales.

Beneficios que brinda el servicio:

- ✓ Conservación adecuada de la carrocería de los vehículos.
- ✓ Alargamiento de la vida útil de la estructura y del vehículo.
- ✓ Garantía por 6 a 9 años.
- ✓ Empleo de una amplia variedad de productos anticorrosivos ofertados a los mejores precios.
- ✓ Rectificación de los errores de diseño anticorrosivos del vehículo.
- ✓ Servicio de postventa anual asegurado.
- ✓ Impermeabilización de las superficies pintadas. Mayor brillo y protección ¡GRATIS!
- ✓ Rapidez: el trabajo de protección y conservación solo toma unas horas.

Centro de Estudios Anticorrosivos y Tensoactivos, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos".

Autopista a Varadero km 3½, Teléfono: (45) 261 013 ext. 326; Correo electrónico: merca.ceat@umcc.edu