



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ASPECTOS GENERALES EN EL ANÁLISIS DE  
SUSTANCIAS PROHIBIDAS: LOS ESTEROIDES  
ANABÓLICOS”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA EN ALIMENTOS**

**P R E S E N T A**

**OLGA DULCE GONZÁLEZ CAMPOS**



**MÉXICO, D.F.**

**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente: Francisco Rojo callejas  
Vocal: Josefina Elizalde Torres  
Secretario: Antonio Hernández Martínez  
Primer suplente: Martín Daniel Trejo Valdez  
Segundo suplente: José Guadalupe De La Rosa Canales

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Ecología y Recursos  
Naturales  
Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Asesor:

---

M.en C. Antonio Hernández Martínez

Sustentante:

---

Olga Dulce González Campos

## **DEDICATORIAS**

*Le dedico este trabajo a todas las personas que me apoyaron en el transcurso de esta larga carrera, en especial a mi mamá que con su apoyo pude terminar esta etapa de mi vida, y a mi padre que aunque no está físicamente conmigo me estará viendo en algún lugar y me imagino que dirá: "por fin termino"*

*Con mucho cariño y agradecimiento a mi hermana Nurith.*

*Y a ti Alex te gracias por el apoyo que me brindaste aunque fue en la etapa final de este proceso con regaños y todo lo demás me sirvió para seguir adelante. Pero lo más importante y lo que te agradezco es ese amor que me has brindado día a día.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Química.*

*A mi asesor Antonio Hernández Martínez por la dirección de este trabajo, que me permitió desarrollar esta tesis.*

*Al Dr. Benjamín Velasco Bejarano (director del laboratorio nacional de prevención y control del dopaje-conade)*

*Al M. en C. Humberto Daniel Rosas Sánchez (Representante del colegio de Química Orgánica de la facultad de ciencias por las instalaciones en donde se llevo a cabo el proyecto)*

	ÍNDICE	Pág.
ÍNDICE		i
<b>Capítulo I</b>		
1. OBJETIVOS		1
1.1. Objetivo General		1
1.2. Objetivos Particulares		1
<b>Capítulo II</b>		
2. INTRODUCCION		2
<b>Capítulo III</b>		
3. Planteamiento del Problema		3
<b>Capítulo IV</b>		
4. Importancia del Estudio		4
<b>Capítulo V</b>		
5. Antecedentes		5
5.1. Historia		5
5.1.1. Olimpia: cuna de los juegos olímpicos		5
5.1.2. Los juegos en honor a los Dioses		6
5.1.3. Los deportes		7
5.1.4. Los atletas		8
5.1.5. La tregua sagrada		9
5.1.6. El final de los juegos		9

5.2. Historia de los juegos olímpicos actuales	9
	Pág.
	12
5.2.1. El Comité Olímpico Internacional	
5.3. Historia del doping	13
5.3.1. Los primeros intentos del dopaje	14
5.3.2. El COI en el dopaje	14
<b>Capítulo VI</b>	
6. Regulaciones Actuales en el Deporte	15
6.1. La Agencia Mundial Antidopaje (WADA-AMA)	15
6.1.1. Programa Mundial Antidopaje	16
6.1.2. El Código Mundial Antidopaje	16
6.1.3. Definición de dopaje conforme a la WADA	17
6.2. Los Estándares Internacionales	18
6.2.1. La Lista de Sustancias y Métodos Prohibidos (La Lista Prohibida 2010)	18
6.3. Modelos de Mejores Practicas	22
6.4. El Deporte y el Código: Un proceso de tres pasos	23
<b>Capítulo VII</b>	
7. Química de los Esteroides	24
7.1. Estructura de los esteroides	24
7.2. Biosíntesis de las hormonas suprarrenales	26
7.3. Los esteroides androgénicos	27
7.4. La importancia del citocromo P-450 en el metabolismo de los	29

xenobióticos	
7.4.1. Reacciones de fase 1 y regulación enzimática del CYP	30
7.5. Metabolismo de la Testosterona	32
	Pág.
7.6. Reacciones de Fase II	34
7.6.1. Glucuronidación	34
7.6.2. Sulfonación	35
7.7. Síntesis de compuestos relacionados	37
<b>Capítulo VIII</b>	
8. Efectos adversos de los EAA	39
8.1. Principales efectos adversos de los esteroides anabólicos	39
8.1.1. Otros efectos secundarios	40
<b>Capítulo IX</b>	
9. Técnicas Comatográficas	41
9.1. Cromatografía	41
9.2. Extracción en Fase Sólida	42
9.3. Cromatografía de Gases	44
9.4. Espectrometría de Masas	46
9.5. El acoplamiento GC-MS en el análisis de esteroides anabólicos	48
<b>Capítulo X</b>	
10. Análisis de esteroides androgénicos anabólicos	49
10.1. Pasos críticos en el análisis de AAS	49
10.1.1. Hidrólisis	49

10.1.2. Hidrólisis acida	49
10.1.3. Hidrólisis enzimática	50
10.2. Extracción	50
10.2.1. Extracción Líquido-Líquido	51
10.2.2. Extracción en fase sólida	51
10.2.3 Sílice sustituida con octadecil (C <sub>18</sub> )	51
10.3. Derivatización	52
10.3.1. Reacción de derivatización	52
<b>Capítulo XI</b>	
11. Ejemplos en el análisis de esteroides	55
<b>Capítulo XII</b>	
12. Discusión	58
<b>Capítulo XIII</b>	
13. Conclusiones	59
14. Referencias Bibliográficas	61
15. <b>Glosario</b>	66

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo General

Dar a conocer los aspectos más importantes en el análisis de los esteroides androgénicos para la prevención y control del dopaje.

### 1.2. Objetivos particulares

- Conocer la historia y antecedentes de los juegos olímpicos.
- Dar a conocer que es el dopaje deportivo, los tipos de sustancias prohibidas (esteroides) y sus efectos a la salud de quien los consume.
- Presentar la reglamentación y aspectos generales actuales acerca de la agencia mundial antidopaje (WADA).
- Propiedades de las sustancias prohibidas (esteroides androgénicos).
- Proporcionar el método analítico para la identificación de los esteroides androgénicos como sustancias prohibidas.
- Conocer la biosíntesis y metabolismo de los esteroides androgénicos anabólicos.

## 2. INTRODUCCIÓN

Una forma externa de influir en el desempeño físico del atleta ha sido mediante el consumo de sustancias prohibidas, las cuales son establecidas en los reglamentos de las organizaciones deportivas.

Estas sustancias, al ser ingeridas, provocan un aumento artificial del rendimiento deportivo, y su uso se opone a la filosofía que dio surgimiento al Comité Olímpico Internacional (COI), quien promueve todo un conjunto de valores éticos, morales, pedagógicos y humanistas, inherentes al deporte, para lograr un desarrollo integral de la personalidad de los deportistas y mejorar la comunicación entre los pueblos participantes con el objetivo de salvaguardar el juego limpio. Esta concepción filosófica se ha ignorado con el uso de sustancias tóxicas que colocan en desigualdad de posibilidades competitivas a los deportistas.

Los esteroides androgénicos anabólicos son uno de los grupos de compuestos más ampliamente usados para mejorar el desempeño del deportista. Este tipo de compuestos son derivados de la hormona masculina testosterona, que fue sintetizada en los años 30's, y que a partir de entonces se han obtenido, mediante síntesis orgánica, una gran variedad de compuestos derivados.

Los esteroides anabólicos no fueron incluidos en la primera lista de sustancias prohibidas publicada por el COI en 1967. Sin embargo, hicieron su aparición por primera vez como un nuevo grupo en 1976, antes de los Juegos Olímpicos de Montreal, y hasta la fecha, son el grupo de compuestos más detectados en los análisis de dopaje.

Ya que es importante conocer los métodos actuales para el análisis de los esteroides anabólicos para su detección, en esta tesis se presenta una revisión general del análisis completo de dichas sustancias en un laboratorio de control y prevención del dopaje, desde el metabolismo y las técnicas analíticas usadas para su identificación hasta las reglas actuales en el mundo deportivo, sin omitir, evidentemente, la historia que dio vida a los juegos olímpicos como los conocemos en la actualidad.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sigue buscando, con una ilusión tan antigua como el mundo, el producto milagroso que sea capaz de transformar al individuo corriente en un superhombre, debido a que la organización socioeconómica del mundo actual impulsa, a multitud de personas, a buscar un incremento de su rendimiento físico y una disminución de la sensación de fatiga ante el esfuerzo de un trabajo intenso prolongado; atletas, ejecutivos, estudiantes, etc, buscan a veces un suplemento artificial o sustancia prohibida, con el que puedan acrecentar sus posibilidades físicas más allá de su límite natural, sin tener en cuenta el riesgo intrínseco que esta actitud conlleva.

En mundo deportivo, los esteroides androgénicos anabólicos son los compuestos más usados en el dopaje deportivo con la finalidad de incrementar el desempeño físico de los atletas. Este grupo de sustancias con estructura derivada de la testosterona o aquellos compuestos que presenten una estructura diferente, pero que presente efectos anabólicos similares a la testosterona están clasificadas como sustancias prohibidas, tanto en competencia como fuera de ella. ref

Por estas razones, el Comité Olímpico Internacional (COI) como la Agencia Mundial Antidopaje (WADA, por sus siglas en inglés) se han dado a la tarea de implementar las técnicas analíticas que permitan la detección de estos compuestos en las muestras de orina de los atletas, valiéndose para ello de diferentes técnicas analíticas como las cromatográficas y espectrométricas.

#### **4. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO**

La poca información disponible que existe sobre el análisis de compuestos derivados de la testosterona para la prevención y control del dopaje, los efectos secundarios que presentan este tipo de sustancias y ya que la lista de sustancias prohibidas se ve modificada anualmente, incluyendo o eliminando sustancias como agentes dopantes, colocan a los esteroides como los líderes dentro de las muestras positivas en los análisis en las muestras de orina de los atletas.

Considerando lo anterior, en este trabajo se propone la revisión más actual sobre los procedimientos de análisis, los efectos secundarios que producen, la historia sobre los esteroides androgénicos anabólicos, así como los compuestos incluidos en la lista de sustancias prohibidas para este año.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1. HISTORIA

#### 5.1.1. Olimpia: cuna de los juegos olímpicos

Los juegos olímpicos, como los conocemos hoy en la actualidad, tienen una larga historia.

Todo empezó en Peloponesia, Grecia hace 3000 años atrás, donde las competiciones eran organizadas en Olimpia y se les daba el nombre respecto al lugar donde se organizaban, en este caso Olimpiadas, nadie sabe exactamente cuando empezaron, pero escritos encontrados aproximan la fecha al 776 A.C.

#### **Figura 1.**

Estos juegos eran especiales, ya que la gente viajaba desde las colonias lejanas solo para participar en los juegos PANHELENICOS; (Pan = todos, Helenicos = Grecia).



**Figura 1:** Mapa del mediterráneo y lugares de celebración de los juegos.

Es difícil saber exactamente cuando nacieron los juegos y su mitología, ya que todo esto se encuentra mezclado con la historia y eventos sucedidos en aquellas épocas. ¿Porque sucedieron los juegos? intervencion divina, celebraciones a los dioses o simplemente por saber cual ciudad era la mejor ciudad de toda Grecia, el caso que fuere se iniciaron y de aquellos epicos juegos nacieron numerosas historias que aun tenemos presentes. (The Olympic Museum, the Olympic Games in Antiquity, International Olympic Committee 2007), (Brief History of Antidoping , Wada, v.6.0, 2009)

### **5.1.2. Los juegos en honor a los dioses**

Los antiguos juegos panhelenicos tuvieron una mayor importancia religiosa que en la actualidad ya que cada juego era celebrado en honor aun un dios en específico.

- Zeus: Rey de todos los dioses, se le celebraban los juegos de Olimpia y Nemea.
- Apolo: El dios de la luz y la razón, se le celebraban los juegos de Delfi.
- Poseidón: Dios de los mares y caballos, se le celebraban los juegos de Istmia.

Como evidencias gráficas sobre los juegos de la antigüedad se encuentran algunas artesanías etruscas donde se plasmó al atleta compitiendo en diferentes disciplinas deportivas.

El estatus de los juegos Panhelenicos y el número de localidades donde se llevaban acabo ilustra la importancia del ejercicio y del espíritu de competición de la antigua sociedad greca. (The Olympic Museum, the Olympic Games in Antiquity, International Olympic Committee 2007)

### 5.1.3. Los deportes

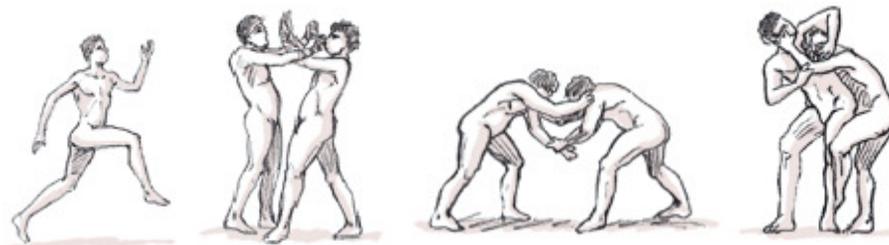
El programa comprendía diferentes tipos de deportes en donde la gran mayoría eran individuales, los deportes en equipo no eran incluidos, mucho menos los deportes acuáticos, las competiciones se realizaban en los sitios correspondientes, como en los estadios y en los hipódromos, se tocaban las trompetas y los jurados seguían una ceremonia en la cual se mencionaban las reglas a seguir en los juegos.

Algunos de los deportes realizados era el pentatlón, que se celebraba en la tarde y consistía en 5 eventos que eran el lanzamiento de disco, el salto de longitud, la jabalina, las carreras y las luchas. **Figuras 2 y 3.**

En la tarde se dedicaban a los deportes de combate, como box, luchas, y el pankraton, un tipo de lucha en el que se valía de todo, no existían categorías y solo luchaban con guantes que a veces llevaban piezas de metal. Al final de cada evento el atleta ganador recibía el honor de ser el victorioso, se le recibían con palmas de victoria y eran coronados con las ramas de olivo. Finalmente se hacía un banquete en honor a los ganadores.



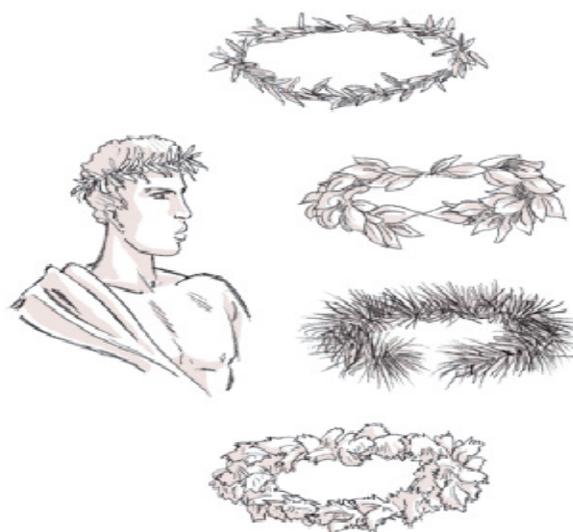
**Figura 2:** Lanzamiento de disco, salto de longitud y lanzamiento de jabalina.



**Figura 3:** Las carreras y las luchas que consistían en box, lucha grecorromana y pankration.

#### 5.1.4. Los atletas

Aproximadamente hace 3000 años en la ciudad de Olimpia, Grecia, se reunían atletas de diferentes regiones para competir en diversas modalidades deportivas de la época. De los atletas se esperaba el mejor desempeño para orgullo de su ciudad natal, a cambio se les proclamaba como héroes, colocándoles una corona hecha de ramas de olivo, cortadas con un cuchillo especial. (The Olympic Museum, the Olympic Games in Antiquity, International Olympic Committee 2007) (Brief History of Antidoping , Wada, v.6.0, 2009). **Figura 4.**



**Figura 4:** Premios a los ganadores.

Los vencedores al llegar a su ciudad, atravesaban un hueco hecho en la muralla de su ciudad, con el fin de ser cerrado después de su paso, para evitar que el triunfo escapara de la ciudad. La práctica deportiva era realizada sin ropa y con los pies descalzos, se excluían a las mujeres y les era vedada su participación como espectadoras, cualquier violación a la norma se pagaba con la muerte.

### **5.1.5. La tregua sagrada**

En la temporada de los juegos se mantenía una tregua sagrada en todo el país llamada **EKECHEIRI** dándosele al evento una connotación de paz y armonía que no podía ser violada bajo ninguna circunstancia, los mensajeros cruzaban de ciudad en ciudad en toda Grecia, anunciando la fecha de las competiciones y llamaban a evitar las confrontaciones.

### **5.1.6. El final de los juegos**

Durante 1000 años los griegos y después los romanos iban a Olimpia a celebrar los juegos en honor a Zeus, no existía otro evento tan importante como este, en el siglo 4 a.c. el emperador Teodorus I aceptó la celebración pagana de los juegos Olímpicos, todos los deportes y las festividades culturales que traían los juegos Olímpicos fueron retomadas y heredadas a los romanos durante varios cientos de años.

Con el tiempo desaparecieron los juegos Olímpicos, progresivamente fueron abandonados y se dio paso a la agricultura y a otros tipos de actividades, Olimpia fue abandonada en el siglo 7 D.C. y gradualmente fue desapareciendo bajo varios metros de tierra, pero gracias a las escrituras y otros artefactos en los cuales quedaron plasmados los acontecimientos de los juegos Olímpicos, sabemos que existieron.

## 5.2. Historia de los juegos olímpicos actuales

Casi 20 siglos después, el Barón de Coubertin, proveniente de una familia de la aristocracia francesa, en un viaje realizado al estadio Olímpico de Grecia, tuvo la brillante idea de reiniciar los juegos que se realizaban en la antigua ciudad de Olimpia. El Barón, hombre que a pesar de la presión de su familia cambió la carrera militar por la docencia, con estudios de derecho y su ideología siempre enmarcada dentro de la igualdad social, entendió que la actividad deportiva de aquel entonces era solo privilegio de las clases adineradas, consideró entonces la necesidad de masificarla dentro de toda la población, reconociendo sus beneficios en el desarrollo de madurez, nobleza, capacidad de trabajo y bienestar físico que generaba el esfuerzo y la sana competencia.

Aliados a esa idea estaban los avances tecnológicos de la segunda mitad del siglo XIX, con el invento de los buques a vapor y el telégrafo, situación afortunada que acortaba las distancias entre los diferentes continentes.

Hacia el año 1894, el Barón de Coubertin dio origen al movimiento olímpico mundial, al convocar a 14 países creándose el primer Comité Olímpico Internacional (COI), con sede en la prestigiosa universidad parisina de la Sorbona. Dentro de ese contexto académico, se adjudicaron los primeros juegos olímpicos de la era moderna a la ciudad de Atenas en reconocimiento histórico a los juegos de la antigüedad y, en el mismo congreso, fue elegido el primer presidente del COI, cargo asumido por el griego Demetrios Bikelas, mientras que el Barón del deporte, como se le llamó a Coubertin, ocupó el cargo de secretario general.

A pesar de las dificultades políticas y financieras que afrontó la organización, se logró la inauguración de los juegos por el Rey Jorge I en el año 1896, en el monumental estadio olímpico de Grecia frente a 70.000 espectadores, todo esto gracias a diferentes aportes económicos, en especial del acaudalado comerciante griego George Averof, residente en Alejandría, quien aportó un millón de dracmas.

En estos juegos participaron 311 atletas de 11 países que a pesar de los reveses de la mayoría de los atletas griegos, el humilde panadero Spiridon Louis consiguió el triunfo en la Maratón de 42 kilómetros. La prueba, una de las más prestigiosas de la competencia olímpica, fue diseñada recordando la gesta heroica del soldado ateniense de la antigüedad y quien después de la batalla, recorrió la misma distancia entre el valle de Maratón y Atenas para anunciar la gran noticia del triunfo de los atenienses sobre los persas. (The Olympic Museum, the Olympic Games in Antiquity, International Olympic Committee 2007) (Brief History of Antidoping , Wada, v.6.0, 2009)

En esta primer Olimpiada de los Juegos Modernos cada país participante tuvo la oportunidad de desfilar con sus respectivas banderas. En esa ocasión, el Barón Pierre de Coubertín expresó: **"Lo importante no es ganar sino competir"**, frase que quedó en la historia de los Juegos olímpicos. (The Olympic Museum, the Olympic Games in Antiquity, International Olympic Committee 2007) (Brief History of Antidoping , Wada, v.6.0, 2009)

El primer premio para el ganador de los antiguos juegos olímpicos fue una corona de olivo sagrado, hoy es la medalla de oro.

En relación a la llama olímpica, esta se encendió en los juegos realizados en Ámsterdam en 1928, que fue trasladada por corredores de relevo y hasta 1932 aparecieron los anillos como símbolo olímpico para representar a los cinco continentes entrelazados.

Las primeras olimpiadas para personas con capacidades diferentes se celebraron en 1960 en Roma, el récord en 400, 800, 1500 y 5000 metros en silla de ruedas lo obtuvo la atleta Louise Sauvage, el 5 de septiembre de 1972. En las Olimpiadas realizadas en Montreal, en 1976, la gimnasta rumana Nadia Comaneci obtuvo una calificación perfecta de 10 puntos en su disciplina. Actualmente esta y otras disciplinas se evalúan por jueces utilizando otros criterios de acumulación de puntaje..

En los años de 1916, 1940 y 1944 no se realizaron Olimpiadas dado que el mundo se encontraba en plenas guerras mundiales y en el año de 1924 tuvieron lugar por primera vez, en Chamonix, Francia, los Primeros Juegos Olímpicos de invierno, y desde entonces se realizan en forma separada, pero en los mismos años que los de verano.

### **5.2.1. El Comité Olímpico Internacional (COI)**

El COI, con sede en Lausana Suiza, es el responsable de regular los juegos y cada país que quiera participar debe poseer un Comité Olímpico Nacional reconocido por el COI.

El COI coordina todas las actividades del Movimiento Olímpico y está encargado de supervisar y administrar todo lo concerniente de los Juegos Olímpicos de verano así como los de invierno, además es el encargado de seleccionar las sedes donde se llevaran a cabo los Juegos Olímpicos. Desde su fundación se han realizado numerosas reuniones donde se ha discutido el pasado, el presente y el futuro del movimiento olímpico internacional. (Fried et al., 1884.)

Entre las reglas del COI está el no permitir ningún tipo de discriminación entre los participantes y las competiciones se consideran de carácter individual y no nacional, aunque la participación de algún país se haya prohibido por su política interna. (The International Olympic Committee. Antidoping Rules article 11).

Ante la evidencia de participación de atletas profesionales encubiertos, el COI varió en 1976 sus estatutos, y admitió que los participantes pudieran ser compensados económicamente por el tiempo que no estaban en sus trabajos para poder entrenar, y esto abrió la posibilidad de dedicarse exclusivamente a la práctica deportiva.

### **5.3. Historia del doping**

Aunque los intentos de mejorar el rendimiento de los atletas son mucho más antiguos, la primera mención de la palabra doping fue en 1889 en un diccionario Inglés. Se usó para describir un remedio, en forma de mezcla, que contenía opio, utilizado para dopar caballos.

Dope fue una bebida preparada de los residuos de la uva, la cual era usada por los guerreros Zulu como un estimulante para los procedimientos religiosos o la guerra y que también fue reportada como doop por los holandeses y africanos. Posteriormente, el significado dope se extendió a otras bebidas con propiedades estimulantes. (Detlef Thieme et al. 2010)

### **5.3.1. Los primeros intentos del dopaje**

De acuerdo con los reportes de Filostratos y Galeno, varios remedios fueron usados para potenciar el rendimiento de los deportistas a finales del siglo III a.C. Los médicos chinos recomendaban usar el Ma Huang (Un extracto de la planta Efedra) para incrementar el rendimiento 5,000 años atrás, cuando esta droga fue usada para suprimir la tos y estimular la circulación.

Los médicos indios Sutrutas recomendaban comer los testículos para tener virilidad alrededor del 300 d.C y los Huns consumían los testículos antes de las batallas, evidentemente con el mismo objetivo. Los hongos alucinógenos se tomaron en siglo tercero para potenciar el rendimiento durante las competiciones olímpicas y se mantuvieron entre el 776 al 393 A.D. (Detlef Thieme et al. 2010).

En la antigüedad el doping fue estrictamente prohibido por las reglas de los Juegos Olímpicos, como hoy en día. Las sanciones, sin embargo, fueron mucho más severas en las olimpiadas de la Grecia antigua, en donde incluso se pagaba con muerte algunas penalidades. (Detlef Thieme et al. 2010)

### **5.3.2. El COI en el dopaje**

La lucha en contra del dopaje es la prioridad numero uno del COI, la ética y la salud va ligada a los Principios Fundamentales del Movimiento Olímpico y al juego limpio, tomando como referencia las marcas deportivas alcanzadas en el alto rendimiento en la época actual, día con día se buscan nuevos métodos y técnicas para tratar de superar dichos parámetros, por eso el Presidente del COI estableció la política de “Cero tolerancia” a quienes promuevan o usen el dopaje a su favor. (The Internacional Olympic Commitee [www.olympic.org](http://www.olympic.org)).

## 6. REGULACIONES ACTUALES EN EL DEPORTE

### 6.1. La Agencia Mundial Anti-dopaje (WADA; AMA)

En el año 1966, la federación internacional de ciclismo (UCI) y la FIFA introdujeron el primer test antidopaje en sus respectivos campeonatos mundiales, al año siguiente el COI instauró la Comisión Médica e implantó la primera lista de sustancias prohibidas. El primer test antidrogas fue puesto a disposición en los Juegos Olímpicos de México 68.

En 1998 un gran número de sustancias médicas prohibidas fueron encontradas por la policía durante el Tour de Francia, el escándalo fue enorme y las autoridades públicas tomaron represalias en el tema del dopaje. (<http://www.wada-ama.org/en/dynamic.ch2?pageCategory.id=312> Consultado el 18 de Febrero 2010)

Tras los eventos que sacudieron al mundo del ciclismo en el verano de 1998, el COI decidió convocar a una conferencia sobre dopaje, reuniendo las partes involucradas en la lucha contra el dopaje. La Conferencia Mundial sobre dopaje celebrada en Lausana del 2 al 4 de febrero de 1999, produjo “La Declaración de Lausana” sobre el dopaje en el deporte. Este documento facilitó la creación de un organismo internacional independiente que fuese completamente operativa para el inicio de los juegos de la XXVII olimpiada en Sydney en el 2000. De acuerdo a los términos de la declaración de lausana, la Agencia Mundial Antidopaje (WADA, por sus siglas en ingles y AMA por sus siglas en español) fue establecida el 10 de Noviembre de 1999 para promover y coordinar la lucha contra el dopaje en el deporte a nivel internacional. La AMA fue establecida como una fundación bajo la iniciativa del COI con el respaldo y participación de organizaciones intergubernamentales, autoridades Públicas y Deportivas, así como otros entes

públicos y privados involucrados con la lucha contra el dopaje. El Movimiento Deportivo y los Gobiernos del mundo componen y financian la Agencia a partes iguales. (O'Leary John., 2001).

Actualmente la WADA promueve, coordina y monitorea la lucha contra el dopaje en el deporte en todas sus formas y trabaja por alcanzar la visión de un mundo que valore y aliente el deporte sin dopaje.

(<http://www.wada-ama.org/en/dynamic.ch2?pageCategory.id=312> Consultado el 3 de Febrero de 2010).

### **6.1.1. Programa Mundial Antidopaje**

La armonización en la lucha global contra el dopaje en el deporte es lograda por la adherencia de las autoridades públicas y deportivas al Programa Mundial Antidopaje - WADP, el cual tiene tres niveles: El Código, Los Estándares Internacionales y los Modelos de Mejores Prácticas.

### **6.1.2. El Código Mundial Antidopaje**

El Código es el documento que armoniza las reglas relacionadas con las actividades antidopaje en todos los deportes y áreas del mundo. Dentro de sus objetivos esta el ser específicamente suficiente para lograr una armonización completa en aspectos donde la uniformidad es requerida, y suficiente en otras áreas para permitir flexibilidad en como se acuerda implementar los principios antidopaje.

Los aspectos específicamente tratados en el Código incluyen: definición de dopaje; lo que constituye una violación de una regla antidopaje; prueba de dopaje; la lista de sustancias prohibidas; Toma de Muestras; Análisis de muestras; Administración de Resultados; Derechos a una audiencia justa; Descalificación de resultados individuales; Sanciones a individuos; consecuencias para los equipos; apelaciones; confidencialidad y reportes; clarificación de las responsabilidades antidopaje; estatuto de limitaciones. ([http://www.wada-ama.org/Documents/World Anti-Doping Program/WADP-The-Code/WADA Anti-Doping CODE 2009 EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-The-Code/WADA_Anti-Doping_CODE_2009_EN.pdf) Consultado el 3 de Febrero de 2010).

### **6.1.3. Definición de dopaje conforme a la WADA**

El doping es definido como la violación, a una o más normas antidoping, según lo dispuesto en el artículo 2.1 al artículo 2.8 del Código Mundial Anti-dopaje. Existen ocho violaciones al código, sin embargo, solo trataremos la violación al artículo 2.1 del Código.

El artículo 2.1 habla sobre la presencia de una sustancia prohibida o de sus metabolitos o marcadores en la muestra de un atleta y menciona que: “corresponde a cada deportista asegurarse de que ninguna sustancia prohibida se introduzca en su cuerpo”. Los atletas son responsables de que cualquier sustancia prohibida o de sus metabolitos o marcadores estén presentes en sus muestras. En consecuencia con esto, no es necesario que la intención, culpa, negligencia o el conocimiento por parte del deportista con el fin de establecer una violación al código de antidopaje, en especial del artículo 2.1” ([http://www.wada-ama.org/Documents/World Anti-Doping Program/WADP-The-Code/WADA Anti-Doping CODE 2009 EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-The-Code/WADA_Anti-Doping_CODE_2009_EN.pdf). Consultado el 3 de Febrero del 2010)

## 6.2. Los Estándares Internacionales

El código mundial antidopaje trabaja en conjunción con cinco Estándares Internacionales con el objetivo de armonizar diferentes aspectos técnicos y operativos del antidopaje, llamados: La lista prohibida, pruebas, laboratorios, excepciones de uso terapéutico (TUE) y, la protección de la privacidad e información personal. **Figura 5.**

Estos estándares han sido sujetos a largas consultas entre las partes interesadas de la WADA y son mandatorios para la armonización y cumplimiento del Código. (<http://www.wada-ama.org/en/World-Anti-Doping-Program/Sports-and-Anti-Doping-Organizations/International-Standards/> Consultado el 3 de Febrero del 2010)



**Figura 5:** Estándares Internacionales.

### 6.2.1. La Lista de Sustancias y Métodos Prohibidos (La Lista Prohibida 2010)

Desde el 2004, como un mandato del Código, la WADA es responsable de la preparación y publicación anual de La Lista Prohibida, la cual es una piedra

angular del Código y un componente clave para la armonización, identificando las sustancias y métodos prohibidos en competición, fuera de competencia y en deportes en particular. (International Olympic Committee, The fight against doping and promotion of athletes' health, IOC, Switzerland, 2007, 5/5)

La Lista Prohibida se renueva anualmente en Octubre de cada año y entra en vigor el 1º de Enero del año siguiente y el uso de cualquier sustancia prohibida por algún deportista debido a razones médicas es posible si se presenta una Excepción de Uso Terapéutico (TUE). (J. Sheider Angela., et al 2006).

([http://www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-Prohibited-list/WADA\\_Prohibited\\_List\\_2010\\_EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited-list/WADA_Prohibited_List_2010_EN.pdf) Consultado el 5 de Febrero del 2010)

La Lista Prohibida se divide en:

- Sustancias Prohibidas durante y fuera de competencia
  - I. S1. Agentes anabólicos.
  - II. S2. Hormonas peptídicas, factores de crecimiento y sustancias relacionadas.
  - III. S3.  $\beta$  – 2 Agonistas.
  - IV. S4. Hormonas antagonistas y Moduladores.
  - V. S5. Diuréticos y otros agentes enmascarantes.
- Solo en competencia:
  - I. S6. Estimulantes
  - II. S7. Narcóticos.
  - III. S8. Cannabinoides.
  - IV. S9. Glucocorticoides.

- Métodos Prohibidos dentro y fuera de competencia:
  - I. M1. Acarreadores de oxígeno.
  - II. M2. Manipulación física o química.
  - III. M3. Doping genético.
- Sustancias Prohibidas en deportes específicos:
  - I. P1. Alcohol.
  - II. P2.  $\beta$  – Bloqueadores.

**En relación a los agentes anabólicos la lista comprende:**

Esteroides Anabolizantes Androgénicos (EAA)

a). EAA exógenos\*, entre ellos:

1-androstendiol ( $5\alpha$ -androst-1-en- $3\beta$ , $17\beta$ -diol); 1-androstendiona ( $5\alpha$ -androst-1-en- $3,17$ -diona); bolandiol (19-norandrostendiol); bolasterona, boldenona, boldiona (androsta-1,4-dieno- $3,17$ -diona); calusterona, clostebol, danazol ( $17\alpha$ -etinil- $17\beta$ -hidroxiandrost-4-eno[2,3-d]isoxazol); dehidroclorometiltestosterona (4-cloro- $17\beta$ -hidroxi- $17\alpha$ -metilandrosta-1,4-dien-3-ona); desoximetiltestosterona ( $17\alpha$ -metil- $5\alpha$ -androst-2-en- $17\beta$ -ol); drostanolona, estanozolol, estenbolona, etilestrenol (19-nor- $17\alpha$ -pregna-4-en- $17$ -ol); fluoximesterona, formebolona, furazabol ( $17\beta$ -hidroxi- $17\alpha$ -metil- $5\alpha$ -androstan[2,3-c]-furazan); gestrinona, 4-hidroxitestosterona (4, $17\beta$ -dihidroxiandrost-4-en-3-ona); mestanolona, mesterolona, metandienona; ( $17\beta$ -hidroxi- $17\alpha$ -metilandrosta-1,4-dien-3-ona); metandriol, metasterona ( $2\alpha$ , $17\alpha$ -dimetil- $5\alpha$ -androstan-3-ona- $17\beta$ -ol); metenolona, metildienolona ( $17\beta$ -hidroxi- $17\alpha$ -metilestra-4,9-dien-3-ona); metil-1-testosterona ( $17\beta$ -hidroxi- $17\alpha$ -metil- $5\alpha$ -androst-1-en-3-ona); metilnortestosterona ( $17\beta$ -hidroxi- $17\alpha$ -metilestr-4-en-3-ona); metiltestosterona,

metribolona (metiltrienolona, 17 $\beta$ -hidroxi-17 $\alpha$ -metilestra-4,9,11-trien-3-ona); mibolerona, nandrolona, 19-norandrostendiona (ester-4-en-3,17-diona); norboletona, norclostebol, noretandrolona, oxabolona, oxandrolona, oximesterona, oximetolona, prostanazol (17 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstano[3,2-c]pyrazol); quimbolona, 1-testosterona (17 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androst-1-en-3-ona); tetrahidrogestrinona (18 $\alpha$ -homo-pregna-4,9,11-trien-17 $\beta$ -ol-3-ona); trembolona y otras sustancias con estructura química o efectos biológicos similares.

#### Esteroides Anabolizantes Androgénicos (EAA)

b). EAA endógenos\*\* administrados exógenamente:

Androstendiol (androst-5-en-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol); androstendiona (androst-4-en-3,17-diona); dihidrotestosterona (17 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-3-ona); prasterona (dehidroepiandrosterona, DHEA); testosterona,

Los siguientes metabolitos e isómeros:

5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -diol; 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol; 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol; 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol; androst-4-en-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -diol; androst-4-en-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol; androst-4-en-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol; androst-5-en-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -diol; androst-5-en-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol; androst-5-en-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol; 4-androstendiol (androst-4-en-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol); 5-androstendiona (androst-5-en-3,17-diona); epidihidrotestosterona; epitestosterona; 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-17-ona; 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-17-ona; 19-norandrosterona; 19-noreticolanolona.

2. Otros Agentes Anabolizantes, que incluyen pero no se limitan a:

Clenbuterol, moduladores selectivos del receptor de andrógeno (SARMs), tibolona, zeranol, zilpaterol.

Para efectos de esta sección:

\* “exógeno” se refiere a una sustancia que, por lo común, el cuerpo no puede producir de forma natural.

\*\* “endógeno” se refiere a una sustancia que el cuerpo puede producir de forma natural.

### **6.3. Modelos de Mejores Prácticas**

La WADA ofrece estos modelos a las autoridades Públicas y Deportivas para facilitar la implementación del Código en sus propias normas y regulaciones. Los modelos de reglas y directrices son recomendados como soluciones en diferentes áreas antidopaje.

- Modelos de Reglas: Dos modelos de reglas han sido desarrollados, una para las Federaciones Internacionales y otra para las Organizaciones Nacionales Antidopaje. Escritas en colaboración con las autoridades Públicas y Deportivas, estas reglas permiten una gran flexibilidad en su uso por las organizaciones.
- Directrices: WADA ha publicado también las directrices que se relacionan con actividades antidopaje. Sin ser mandatorias, buscan facilitar

- actividades como el manejo de resultados, pruebas fuera de competencia, ubicación de los atletas y toma de muestras de sangre y orina. ([www.wada-ama.org](http://www.wada-ama.org) Consultado el 8 de Febrero de 2010)

#### **6.4. El deporte y el Código: Un proceso de tres pasos**

Los deportes deben emprender tres pasos en relación con el Código Mundial Antidopaje: Aceptación, Implementación y Cumplimiento. La aceptación del Código significa que una organización deportiva acuerda sus principios y acuerda implementarlos y cumplirlos. La implementación significa que una organización deportiva enmienda sus normas y políticas de modo que se incluyan los artículos y principios mandatorios del Código.

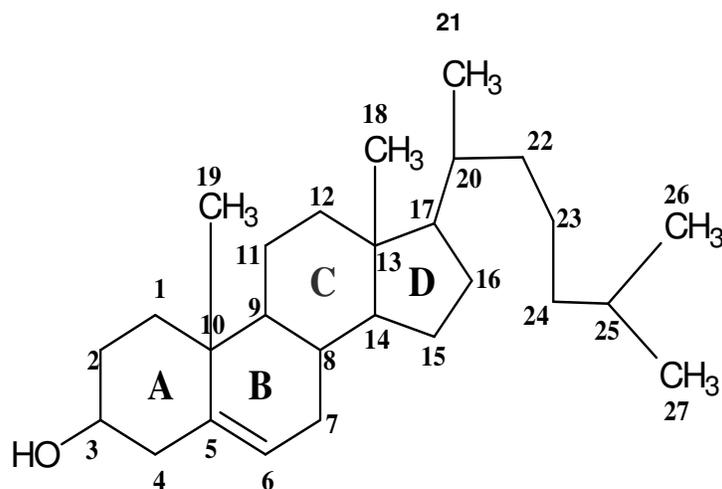
El cumplimiento significa que la organización deportiva ha enmendado sus normas y políticas y que además las aplica de acuerdo al Código.

Como organización internacional independiente responsable del Código, la WADA tiene la tarea de monitorear los tres aspectos y tomar las medidas necesarias para asegurar la integridad del Código. Las autoridades Públicas y Deportivas deben completar los tres pasos para estar completamente en línea con el Código. ([www.wada-ama.org](http://www.wada-ama.org) Consultado el 8 de Febrero de 2010)

## 7. QUÍMICA DE LOS ESTEROIDES

### 7.1. Estructura de los esteroides

Las hormonas esteroideas, estrógenos, andrógenos gestágenos y corticosteroides, son un grupo de compuestos lipofílicos, de bajo peso molecular y biológicamente activos que actúan como hormonas. (H. Noppe, et al. 2008) Todas las hormonas esteroideas tienen un sistema de anillos ciclopentaperhidrofenantreno como su núcleo químico. Este núcleo de 4 anillos y su sistema convencional están ilustrados en la estructura del colesterol. **Esquema 1.** (Martin, Mayes Rodwell, 1984)



### COLESTEROL

**Esquema 1.** Estructura general de los esteroides.

En general, dos grupos metilo están presentes en las posiciones C<sub>18</sub> y C<sub>19</sub>. Removiendo la cadena lateral del colesterol resultan los compuestos C<sub>21</sub>, los testágenos y corticosteroides. Sin embargo, removiendo completamente la cadena lateral se generan los esteroides C<sub>19</sub>, los andrógenos. (H. Noppe, et al. 2008)

Variadas formas estereoisómeras de los esteroides pueden ser posibles:

- Los anillos A y B pueden estar unidos ya sea en configuración *trans* o *cis*.
- Los hidrógenos u otros grupos pueden estar unidos a los anillos con una orientación ya sea hacia arriba ( $\beta$ -) o hacia abajo ( $\alpha$ -) del plano del anillo.

La orientación  $\beta$  es convencionalmente asignada a los grupos que están en el mismo plano que el grupo metilo  $C_{19}$  y esquemáticamente se muestran como líneas continuas. Los grupos opuestos  $\alpha$  se representan como líneas de guiones. En los esteroides naturales, tanto las cadenas unidas a  $C_{17}$  como varios sustituyentes en  $C_{11}$  tienen la configuración  $\beta$ . (Martin, Mayes Rodwell. 1984)

De acuerdo a su actividad biológica y efectos farmacológicos, los esteroides pueden ser divididos en dos grandes grupos:

- Los esteroides sexuales
  - ✓ Estrógenos
  - ✓ Gestágenos
  - ✓ Andrógenos
  
- Los corticosteroides
  - ✓ Glucocorticoides
  - ✓ Mineralcorticoides

O bien, pueden ser clasificados por su origen en:

- Endógeno
  
- Exógeno

Los esteroides biosintetizados en el organismo son llamados hormonas endógenas.

Los xenobióticos o esteroides exógenos son compuestos extraños, naturales o sintéticos (metiltestosterona, nandrolona). Usando esta clasificación de las hormonas esteroideas, también pueden ser subclasificadas por su estructura química y/o efectos farmacológicos en tres grupos principales: estrógenos, gestágenos y andrógenos. (H. Noppe, et al. 2008)

## 7.2. Biosíntesis de las hormonas suprarrenales

El acetato es el precursor primario para la síntesis de todos los esteroides. La vía implica la síntesis inicial del colesterol, el cual, después de una serie de desdoblamientos de la cadena lateral y oxidaciones, es convertido en  $\Delta^5$ -pregnenolona. La pregnenolona es el esteroide del cual derivan todas las demás hormonas esteroides. **Esquema 2.**

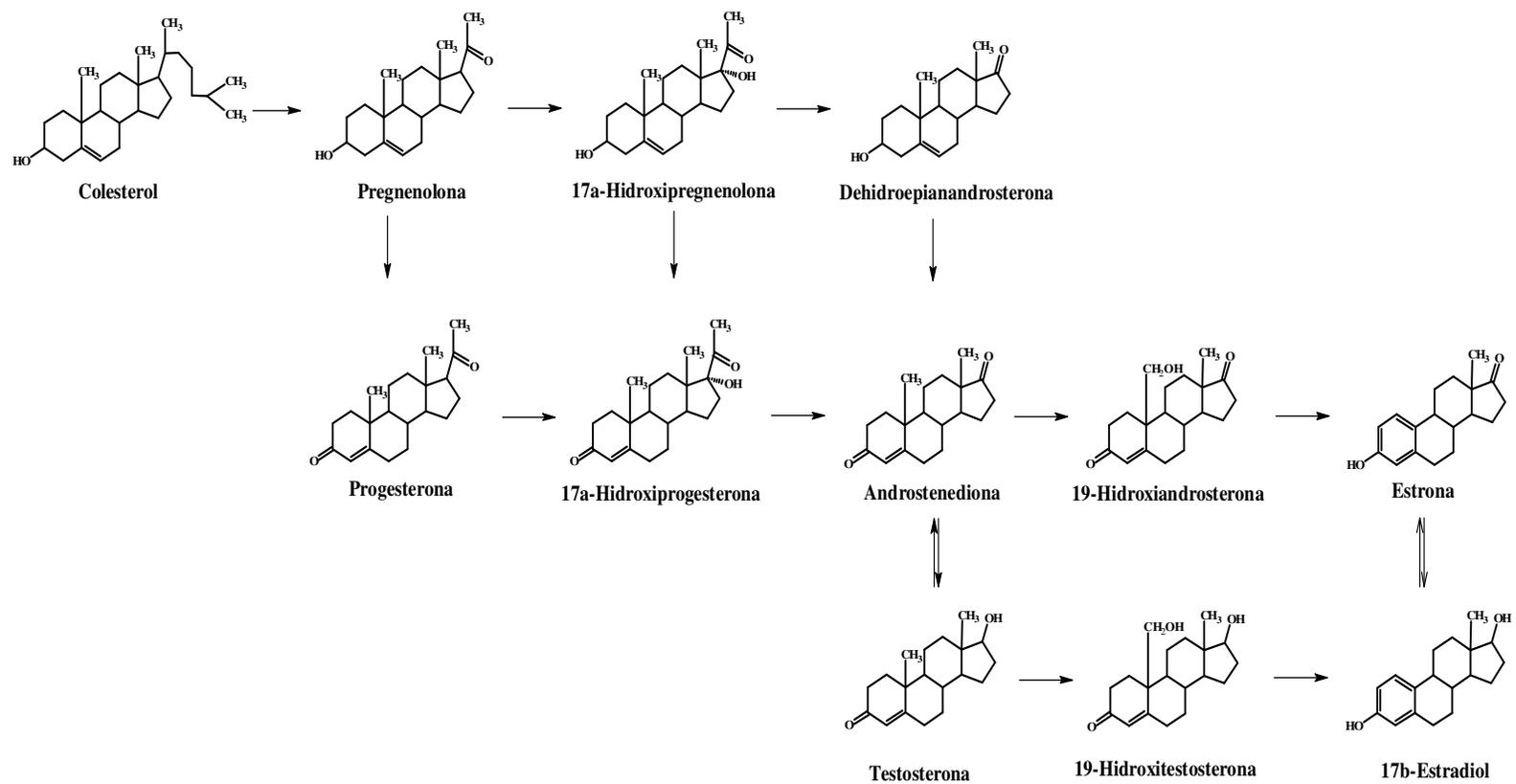
La pregnenolona es convertida en el citosol a progesterona por una deshidrogenasa o en 17-hidroxiprogesterona por una 17-hidroxilasa específica. Como se muestra en el **Esquema 2** estos dos esteroides son convertidos en toda una gama de hormonas activas en el retículo endoplasmico y las mitocondrias mediante oxigenasas y deshidrogenadas específicas que requieren de oxígeno

molecular y NADPH. El resultado de estas reacciones enzimáticas combinadas es la adición de grupos hidroxilo o cetónicos en las posiciones C<sub>11</sub>, C<sub>17</sub> o C<sub>21</sub>. (Martin, Mayes Rodwell. 1984)

### 7.3. Los esteroides androgénicos

Andrógeno (esteroides C<sub>19</sub>) es el nombre genérico para cualquier compuesto, natural o sintético, que estimula o controla el desarrollo y mantiene las características masculinas. (H. Noppe, et al. 2008)

La testosterona, principal hormona masculina, es sintetizada por la actividad de las células intersticiales (células de Leyding) del testículo a partir del colesterol pasando por la pregnenolona, progesterona e hidroxiprogesterona, la cual entonces es convertida en el cetoesteroide C<sub>19</sub>, androstenediona, el precursor inmediato de la testosterona. **Esquema 2.** (Martin, Mayes Rodwell. 1984)



**Esquema 2:** Biosíntesis de los andrógenos y estrógenos.

#### 7.4. Importancia del Citocromo P-450 en el metabolismo de xenobióticos

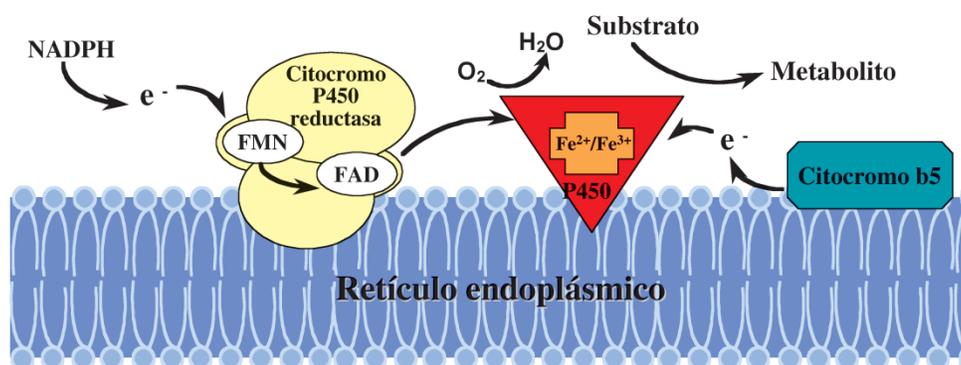
Debido al alto carácter no polar de los andrógenos, estos son ampliamente modificados por algunas reacciones metabólicas antes de ser excretados en la orina. En este apartado comentaremos brevemente este tipo de reacciones.

Un gran número de sustancias extrañas a nuestro organismo (xenobióticos) penetran por vía oral, piel, sangre o pulmones y pueden ocasionar trastornos a corto o largo plazo, lo que se evita gracias a que poseemos sistemas enzimáticos que llevan a cabo su biotransformación. (Myriam O.B., et al.,2004) La biotransformación de los xenobióticos se realiza principalmente en dos fases: Las de Fase I, catalizada principalmente por el sistema de monooxigenasas dependiente del citocromo P-450 encontradas principalmente en el hígado, y las de Fase II, encontradas en los microsomas, la mitocondria y el citosol. (Klaassen, C.D.; Casarett & Doull's. **2001**)

La expresión del citocromo P-450 esta regulada por factores genéticos (polimorfismo), fisiopatológicos (enfermedades, regulación hormonal) o ambientales (factores nutricionales, inducción, inhibición) que condicionan que los niveles hepáticos de las enzimas P-450 varíen extraordinariamente entre diferentes individuos. (Yamazaki, H., et al., **1994**)

El sistema P-450 presenta una enorme versatilidad funcional que se refleja tanto en la gran variedad de procesos que puede catalizar, como en el elevado número de substratos que es capaz de metabolizar. Salvo contadas excepciones, el P-450 requiere oxígeno molecular y NADPH para oxidar el substrato.

Se trata de reacciones de monooxigenación en las que sólo uno de los átomos de oxígeno es incorporado en la molécula del sustrato, mientras que el otro es reducido hasta agua. (Omura., 1999) ver **Figura 6**.

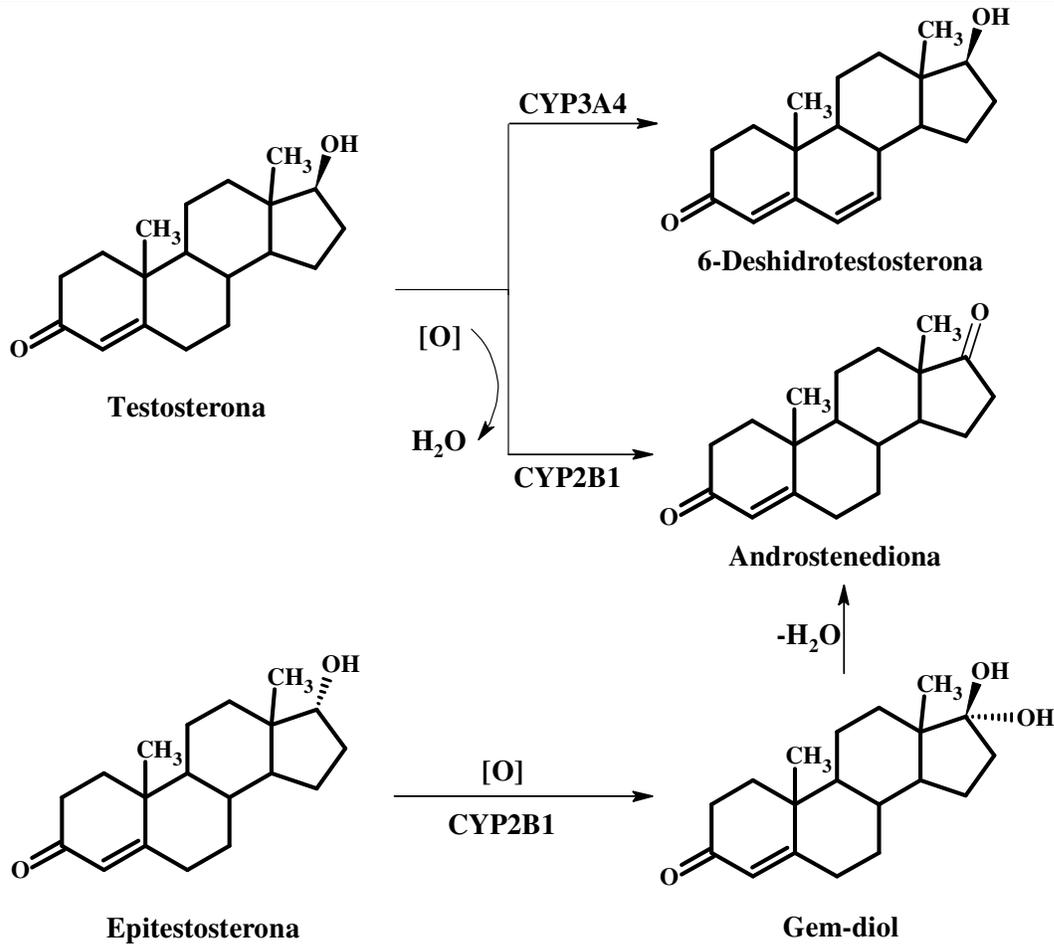


**Figura 6:** Reacción catalizada por el CYP

#### 7.4.1. Reacciones de fase I y Regulación enzimática del CYP

Entre las oxidaciones catalizadas por el P-450 se incluyen hidroxilaciones aromáticas y alifáticas, *N*- y *S*-oxidaciones, epoxidaciones, *O*-, *N*- y *S*-desalquilaciones, desaminaciones, desulfuraciones, deshalogenaciones y deshidrogenaciones. (Omura., 1999) Otra de las características más significativas del P-450 es su inducibilidad por los propios xenobióticos. Las primeras alusiones en este sentido se remontan a los años 50-60, al observarse que pacientes que eran tratados con ciertos fármacos desarrollaban una tolerancia al mismo de manera que eran necesarias dosis crecientes para producir el mismo efecto. Este hecho fue constatado en estudios con animales de experimentación y se

comprobó la existencia de tipos o grupos de inductores que actuaban de forma selectiva sobre diferentes enzimas P-450. (Conney, A.H., 1986). En el **esquema 3** se muestran ejemplos de las reacciones catalizadas por el citocromo P-450. Klaassen, C.D.; Casarett & Doull's., 2001

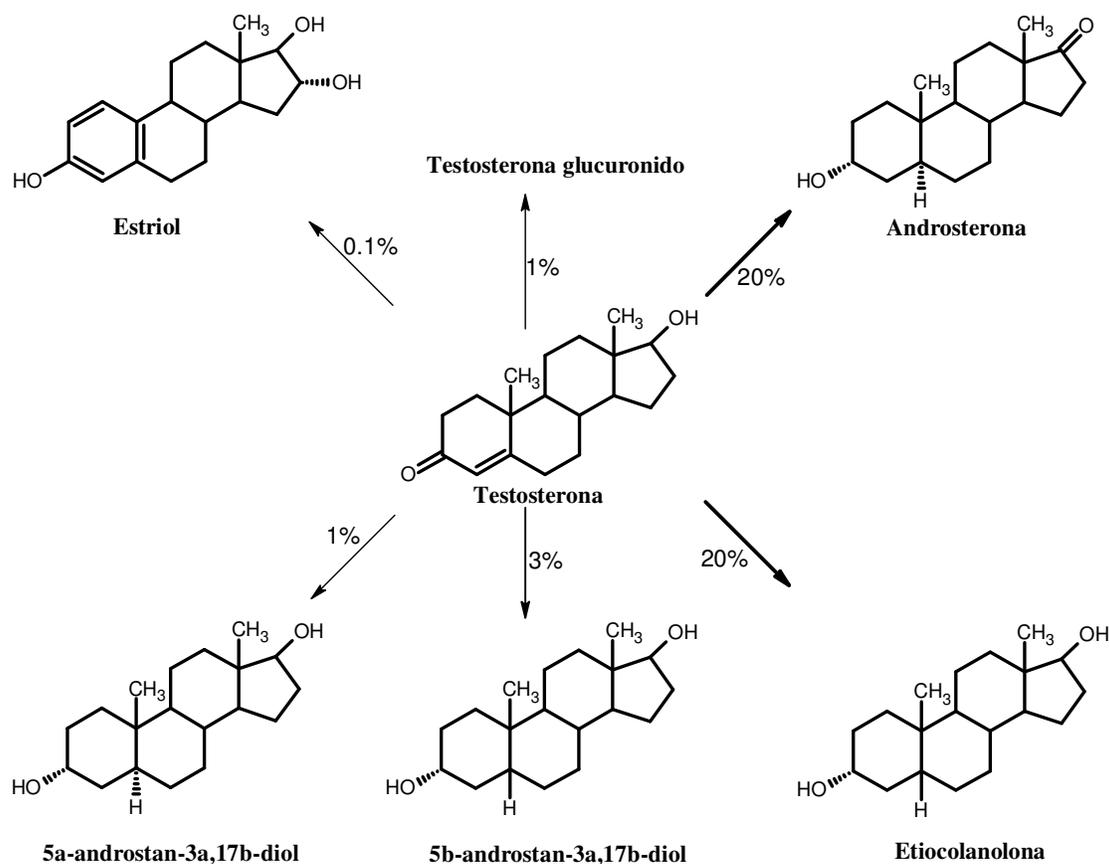


**Esquema 3.** Reacciones de deshidrogenación catalizadas por el citocromo P-450 sobre la testosterona

### 7.5. Metabolismo de la testosterona

El principal metabolismo de los andrógenos es en el hígado, ya que es extremadamente rico en enzimas catabólicas esteroideas, aunque el catabolismo de esteroides androgénicos extrahepático también puede ser significativo, como el caso del  $5\alpha$ -androstanoediol y su conjugado glucuronido. (Toscano V., 1986)

La testosterona es sujeta a un metabolismo de Fase I. **Esquemas 3 y 4** involucrando la oxidación del grupo 17-hidroxi a androstenediona, la reducción del anillo A para generar la 5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -androstanediones, y mediante la acción de las 3 $\alpha$ - y 3 $\beta$ -hidroxiesteroides dehidrogenasas para formar los metabolitos tetrahidro-17-oxosteroides, androsterona y eticolanolona, los principales metabolitos de la testosterona. Los isómeros 5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -androstan-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -androstanoles son los metabolitos minoritarios de la testosterona y una porción muy pequeña es convertida a estradiol. (Brooks RV., 1975). **Esquema 4**.



**Esquema 4:** Metabolismo de la testosterona, en las flechas adjuntas a las estructuras se indica la proporción aproximada de testosterona que es metabolizada por esta ruta.

**Nota:** Todos los esteroides del esquema anterior son metabolizados principalmente como conjugados.

## 7.6. Reacciones de Fase II

Las reacciones de biotransformación de fase II abarcan la glucuronidación y la sulfonación, la acetilación, la metilación, la conjugación con glutatión y la conjugación con aminoácidos tales como la glicina, la taurina y el ácido glutámico. Los cofactores para estas reacciones reaccionan con los grupos funcionales presentes en el xenobiótico o endobiótico que han sido introducidos o expuestos por la biotransformación de fase I. (Klaassen, C.D.; Casarett & Doull's., 2001)

En general las reacciones de fase II son mucho más rápidas que las de fase I. Por tanto la velocidad de eliminación de los xenobióticos cuya excreción dependa de la biotransformación por el citocromo P-450 seguida de la conjugación de fase II estará determinada por la primera reacción, (Conney, A.H. 1986) y también la conjugación juega un papel muy importante en el metabolismo de andrógenos, ya que ha sido reportado que la fracción sin conjugar contiene solo 3% o menos de la cantidad total de andrógenos excretada en la orina. (Dehennin L, Matsumoto AM., 1993)

### 7.6.1. Glucuronidación

En humanos la conjugación con ácido glucuronido es la principal reacción de conjugación de los andrógenos (Detlef Thieme et al., 2010). La glucuronidación es una reacción nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ), la cual requiere el cofactor uridina

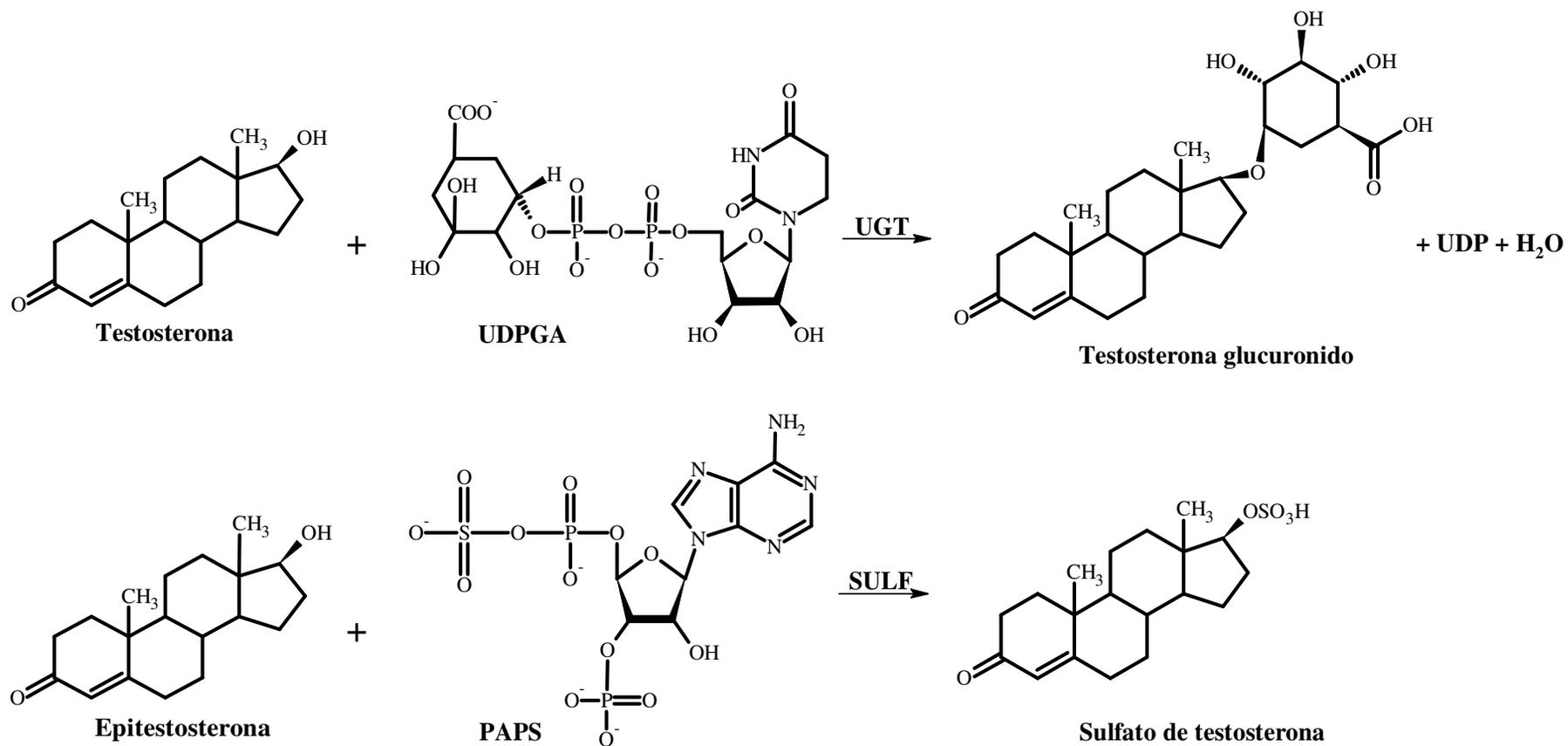
difosfato-ácido glucuronido (UDP-ácido glucurónico) y esta catalizada por las UDP-glucuroniltransferasas

(UGT). El lugar de la glucuronidación suele ser en un heteroátomo nucleófilo rico en electrones y en la mayoría de los casos la actividad de los xenobióticos o endobióticos se termina mediante la glucuronidación (Detlef Thieme et al., 2010). En el **esquema 5** se muestra el cofactor para la reacción de glucuronidación.

### 7.6.2. Sulfonación

En adición con la glucuronidación, la sulfonación (frecuentemente llamada también conjugación con sulfato) también juega un papel importante en la modulación de la actividad farmacológica de una gran variedad de compuestos endógenos y xenobióticos en el cuerpo humano.

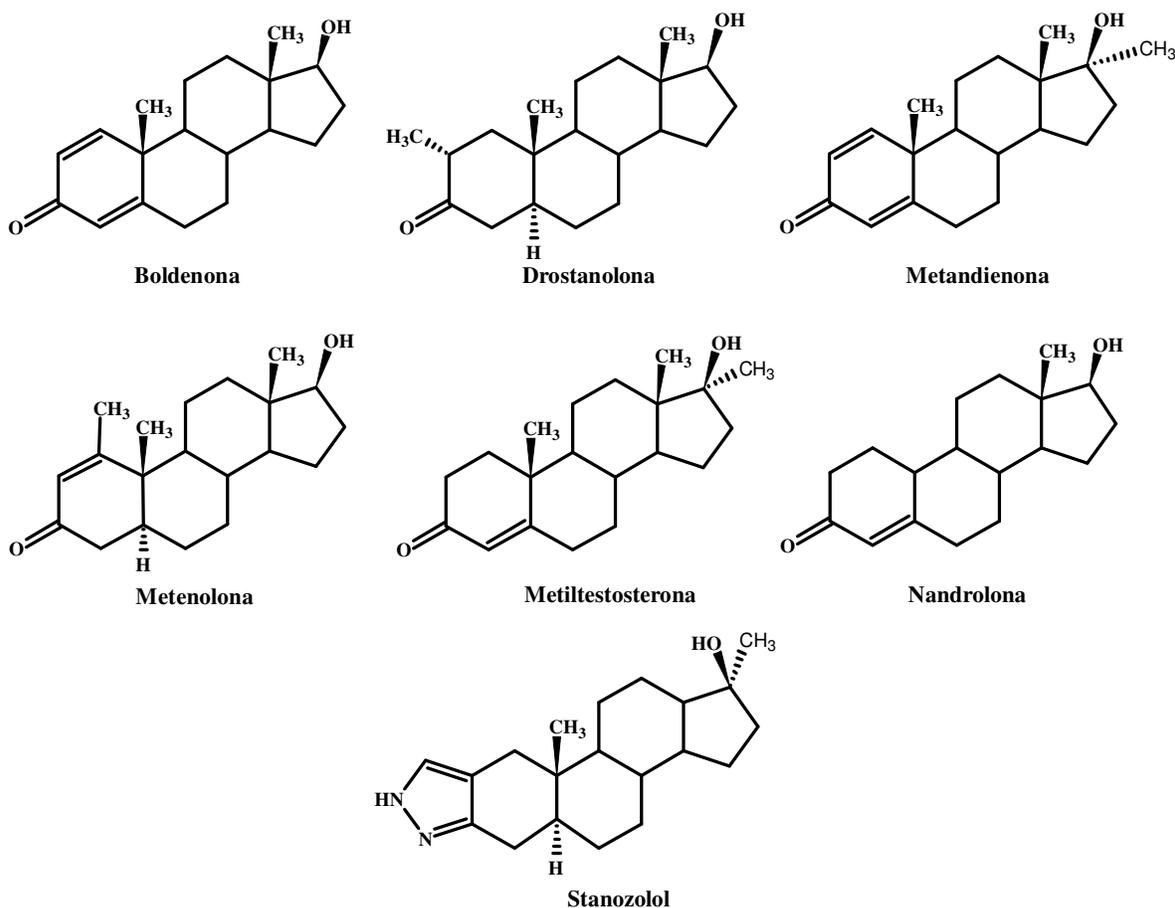
La sulfonación (**Esquema 5**) es catalizada por las enzimas sulfotransferasas que transfieren la porción sulfo ( $\text{SO}_3$ ) desde el co-sustrato 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS) para dar lugar a un ester de ácido sulfúrico muy hidrosoluble. Aunque la glucuronidación es la vía principal para la eliminación de los andrógenos en humanos, los esteroides que poseen una función  $3\beta$ -hidroxi son una excepción y son excretados mediante la sulfonación, siendo la dehidroepiandrosterona (DHEA) el compuesto androgénico modelo (Gower DB, et al. 1995) (Peter I. Mackenzie et al., 1992)



**Esquema 5.** Reacciones de glucuronidación y sulfonación catalizadas por la UDPGA y PAPS respectivamente.

### 7.7. Síntesis de compuestos relacionados

Una amplia variedad de EAA exógenos se menciona explícitamente en la lista de sustancias prohibidas, apartado 6.2.1. pag 20 de esta tesis. Las estructuras químicas de los EAA más frecuentemente detectados en el control del dopaje recientemente se muestran en el **Esquema 6**. (M.K. Parr, et al., 2009).



**Esquema 6:** Esteroides anabólicos androgénicos mas frecuentemente encontrados en los análisis del dopaje.



## 8. EFECTOS ADVERSOS DE LOS EAA

Los EAA son utilizados por los atletas en dosis que exceden de 10 a 50 veces o más los niveles fisiológicos, esto conduce a condiciones hiperandrogénicas en el organismo y se produce un desequilibrio endocrino inducido por esteroides anabólicos que tiene como consecuencia muchos efectos nocivos somáticos y psíquicos sobre salud de quien los consume. A continuación se mencionaran los efectos secundarios más importantes por el consumo de EEA.

### 8.1. Los principales efectos secundarios de los EAA son:

- Cardiovasculares: Infartos del miocardio, arritmias, muerte cardiaca repentina, trombosis, aumento en el colesterol aterogénico LDL.
- Hepáticos: Formación del quiste del hígado, tumores del hígado.
- Endocrinos y reproductivos: Debilitación de la función del tiroides, resistencia a la insulina y menor tolerancia a la glucosa, cambios en las concentraciones de las hormonas masculinas y femeninas.
  - Sistema reproductor masculino: Espermatogénesis deteriorada, infertilidad, atrofia testicular, dificultades eréctiles, cambios en la libido, ginecomastia, calvicie y probablemente hipertrofia de la próstata.
  - Sistema reproductor femenino: Inhibición de la ovulación, irregularidades menstruales, infertilidad, formación de quistes ováricos, alargamiento del clítoris, menor tamaño del pecho, atrofia del útero, cambios en la libido, agravamiento de la voz, alopecia e hirsutismo.
  - Niños y adolescentes: Desarrollo del vello púbico, alargamiento clitoriano/fálico y otras muestras del virilización o pubertad precoz.

- Esqueléticos: Ruptura del tendón, cierre prematuro de la epífisis y retraso del crecimiento en adolescentes.
- Psíquicos: Cambios de humor, irritabilidad, agresión incontrolada, otros síntomas y síndromes afectivos o sicopáticos.
- Otros: Acné esteroide, tumor renal de Wilm, síndrome de la apnea del sueño y aumento del riesgo de hepatitis y de SIDA (asociados a las agujas compartidas).

En mujeres, la atrofia del pecho, la hipertrofia del clítoris, los cambios en la voz, el hirsutismo y la alopecia son generalmente irreversibles, aunque la mayor parte de los otros efectos secundarios inducidos por EAA se consideran reversibles después de retirar el esteroide, algunos casos documentados sugieren que los problemas pueden persistir durante años y que no siempre existe una recuperación, además, los efectos sobre la salud a largo plazo por abuso de EAA son desconocidos, por ejemplo, la alteración hormonal que se observa después de la suplementación con prehormonas de la testosterona es similar al perfil hormonal observado en hombres con cáncer de próstata, cáncer testicular y cáncer pancreático. (David, R. Mottram., 1996)

### **8.1.1. Otros efectos secundarios.**

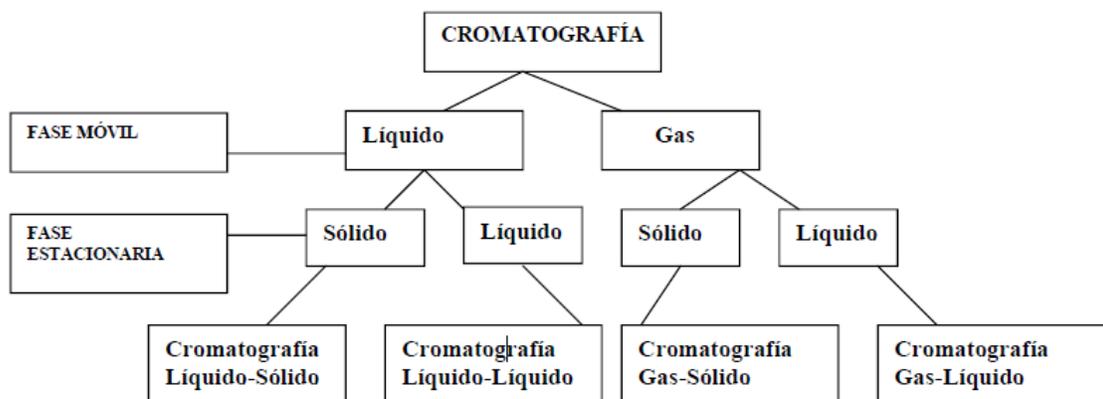
Los efectos secundarios del clenbuterol, como los de otros  $\beta_2$ -agonistas son, aumento del ritmo cardíaco, arritmias, muerte cardíaca repentina, temblor y calambres musculares, dolor de cabeza, nerviosismo e insomnio, ya que el zeranol se utiliza solamente en animales, no hay información sobre sus efectos secundarios en seres humanos, pero los estudios en animales sugieren que tiene efectos tóxicos sobre el hígado y aumenta el riesgo de carcinogénesis hepática, en mujeres, el uso de la tibolona puede dar lugar a náuseas, vómitos, mialgia, dolor de cabeza e hirsutismo. (David, R. Mottram., 1996) (NA Hassan, et al., 2009)

## 9. TECNICAS CROMATOGRAFICAS

En la inmensa mayoría de los problemas analíticos tenemos que separar, identificar, y medir cuantitativamente uno o más componentes de una mezcla compleja. En el caso del dopaje sucede lo mismo, se tiene que identificar y medir cuantitativamente los componentes de interés (analitos) y, en algunos casos solo se realiza la determinación de manera cualitativa. Las técnicas mas usadas en los laboratorios de control y prevención del dopaje la extracción en fase sólida (EFS), la cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS) y la cromatografía de gases acoplada un espectrómetro de masas en tándem (GC-MS/MS). (Mueller Klaus, et al., 1995)

### 9.1. La cromatografía

La cromatografía es una técnica analítica desarrollada a principios del siglo XX, que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. La palabra cromatografía significa descripción del color. El nombre se debe a que las primeras separaciones se llevaron a cabo con pigmentos de plantas, las cuales se observaban como bandas coloridas. La cromatografía se define como un proceso de separación por diferencias de migración, transportadas por la fase móvil (líquido o gas) y retenidas selectivamente por la fase estacionaria (sólidos, líquidos o fluidos supercríticos). En función de la fase móvil, la cromatografía se divide en cromatografía de líquidos (LC) y cromatografía de gases (GC). **Esquema 8.** (R.A. Day, A.L. Underwood. 1989.)



**Esquema 8:** Clasificación general de la cromatografía.

## 9.2. Extracción en fase sólida

La Extracción en Fase Sólida (SEP) es una potente y simple técnica de limpieza de muestras que es, al mismo tiempo, rápida y económica. Una columna SPE consiste en un lecho de adsorbente de partículas gruesas mantenido entre dos discos porosos en un tubo desechable. La SPE permite la preconcentración de la muestra con un riesgo mínimo de pérdida o contaminación de la misma. Se utilizan las mismas interacciones muestra-fase que en HPLC, en las que el componente de interés resulta retenido en una fase sólida mientras que los contaminantes de la matriz se eluyen.<sup>86</sup> Un método típico de SEP tanto para columnas **HyperSEP** o **MultiSEP** se organiza en cinco pasos. **Figura 7.**



**Figura 7:** Pasos para la activación del cartucho de EFS o SEP

**1. Activación.** El primer paso es la activación (A) en la que se utiliza un disolvente orgánico para "humidificar" la fase. Con fases hidrofóbicas (p. ej. C18) se usa un disolvente polar, como el metanol. Con fases estacionarias polares (p. ej. Sílice) se usa un disolvente no polar, como el cloruro de metileno.

**2. Acondicionamiento.** La fase estacionaria SEP se acondiciona (K) con el mismo disolvente de la matriz, por ejemplo, con matrices acuosas el disolvente es agua. El acondicionamiento permite "alinear" la fase estacionaria lejos de la superficie de la sílice, permitiendo la interacción entre el analito y la fase estacionaria. Cualquier disolvente orgánico residual se elimina en esta etapa, asegurando que los componentes de interés sean retenidos en la parte superior de la columna.

**3. Retención.** Las interacciones entre las moléculas de la muestra y la fase estacionaria controlan la retención en el adsorbente de SEP. Para maximizar las interacciones la muestra (A=analitos + M=matriz) deben cargarse en el adsorbente de SPE a aproximadamente 3 mL/min. Este flujo puede controlarse mediante una válvula en la estación de vacío. Los componentes de interés han de retenerse en el adsorbente de SEP mientras que la matriz y los contaminantes deben eluirse y descartarse.

Durante las etapas 1-3, el adsorbente SEP ha de mantenerse húmedo siempre, puesto que el secado del mismo puede acarrear una pérdida de muestra.

**4. Eliminar interferencias.** Usando un disolvente o una serie de disolventes de fuerza creciente los contaminantes pueden eliminarse del adsorbente de SEP hasta que solo los analitos de interés queden atrapados.

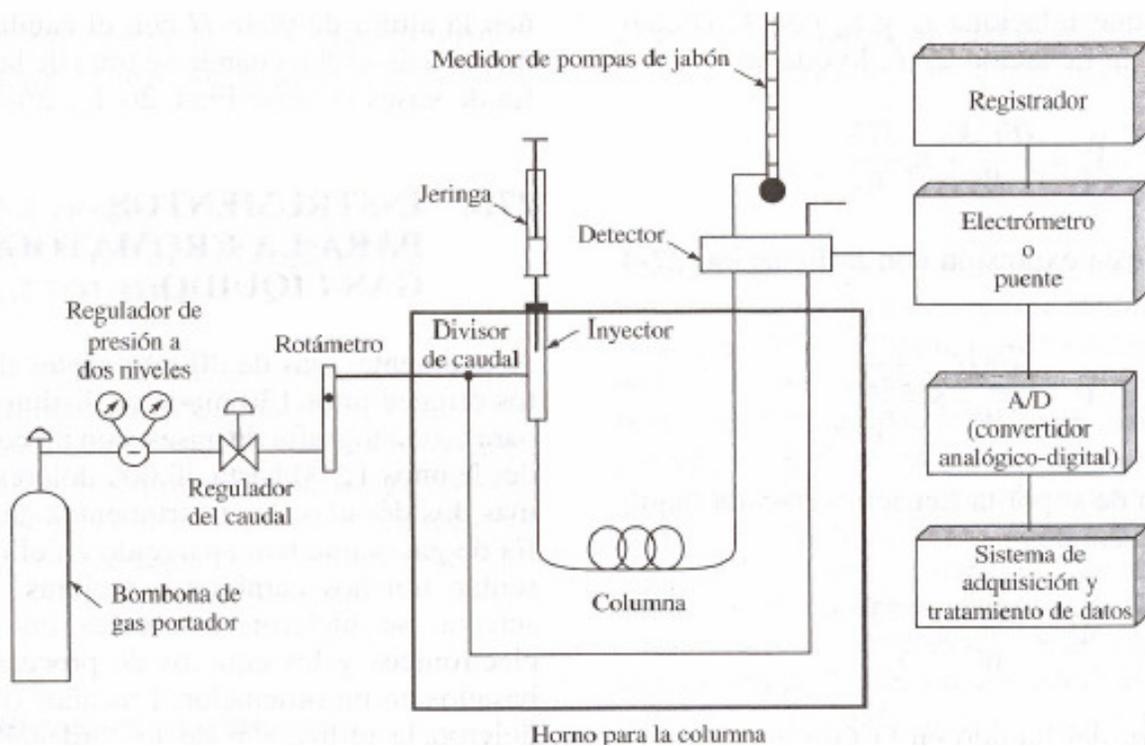
Por ejemplo, al retener compuestos hidrofóbicos en C18 la contaminación puede eliminarse con un lavado de agua:metanol 50:50, puesto que los compuestos de interés no se eluyen del adsorbente de SEP hasta que no se use un mayor porcentaje de disolvente orgánico. Con un lavado adecuado (M) las impurezas se eliminan con un adecuado eluyente de lavado (W). El adsorbente de SEP se deja secar generalmente con nitrógeno. El secado es esencial si el eluyente de lavado no es miscible con el disolvente de elución final.

**5. Elución.** La elución de los analitos (A) se efectúa mediante un eluyente adecuado (E) y a un flujo de 1 mL/min. El adsorbente de SEP y la interacción analito-adsorbente determinan el eluyente final de elución.

### 9.3. La cromatografía de gases (GC)

La cromatografía de gases es un método de separación basado en el equilibrio de distribución y elución de una muestras entre dos fases, una estacionaria (película delgada de líquidos de alto punto de ebullición que recubre las paredes de un capilar) y una móvil (gas acarreador). La separación depende del tiempo que pasan disuelto los analitos en la fase estacionaria.

La muestra, que puede ser líquida, sólida o gas, se introduce en el equipo a través del inyector, **Figura 8**, donde es vaporizada obligatoriamente y es llevada hacia la columna mediante el gas acarreador ( $N_2$ ,  $H_2$  ó  $He$ ). En la columna es donde se presenta el fenómeno de separación de los componentes de la mezcla debido a equilibrios de distribución y afinidad; los compuestos que sean menos afines a la fase estacionaria serán empujados por el gas acarreador más rápidamente y son los primeros en eluir de la columna hacia el detector.



**Figura 8.** Componentes principales del Cromatógrafo de Gases.

Los compuestos que eluyen de la columna llegan al detector en donde se genera una respuesta proporcional a la concentración del analito presente y mediante un proceso complejo se genera una señal que es procesada para generar un cromatograma. (Skoog, 2001.)

Un cromatógrafo de gases consiste básicamente en un inyector split/splitless, un horno en donde se encuentra la columna capilar, un detector y una computadora. (Mc Nair, et al., 1998) Los detectores más usados en cromatografía de gases son de Ionización de Flama, Captura de Electrones, Conductividad Térmica y Espectrometría de Masas, entre otros. (Braithwaithe, A. et al., 1985)

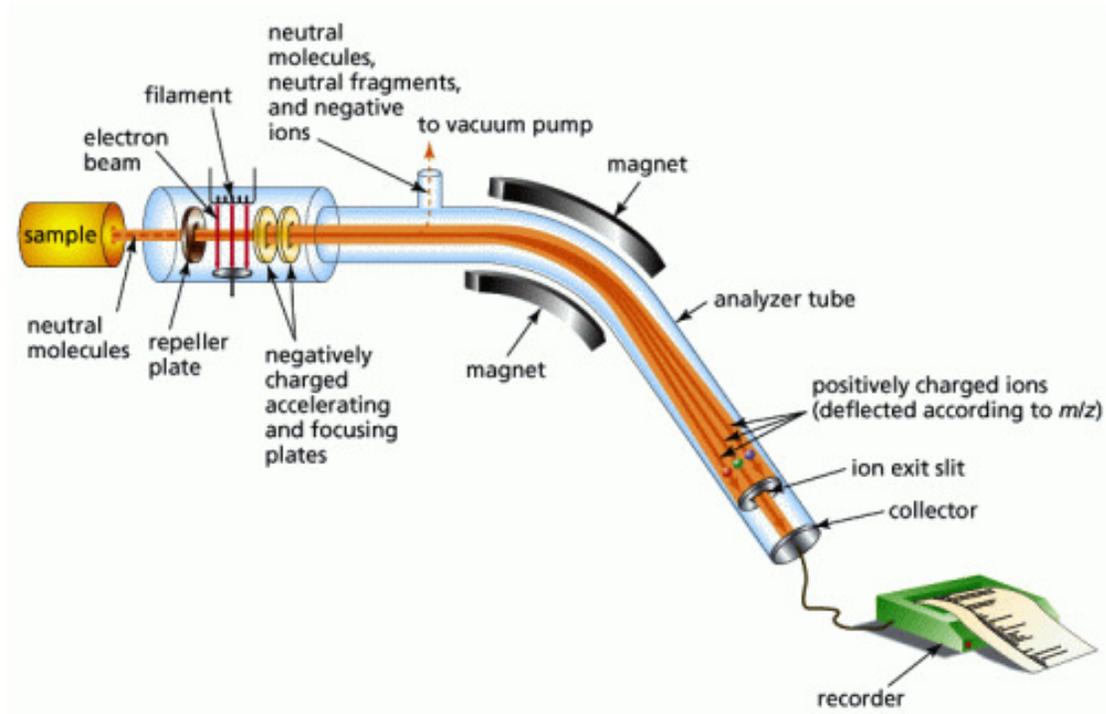
La desventaja de la GC es que no es posible saber la estructura o la masa molecular de los compuestos que presentan una señal en el cromatograma, debido a que los tiempos de retención de los analitos están en función de los equilibrios de distribución por afinidad que se presentan en la columna y no son característicos de cada compuesto, ya que varían de acuerdo a las condiciones cromatográficas y a la columna usada.

### **9.4. La espectrometría de masas (MS)**

El análisis de compuestos orgánicos mediante la espectrometría de masas (MS, por sus siglas en ingles) involucra primeramente la producción, en fase gaseosa, de iones moleculares cargados y iones fragmento generadas a partir de las moléculas padre en la fuente de iones del instrumento, y subsecuentemente separar estos iones en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ) y finalmente medir la intensidad de cada uno de estos iones.

Un espectrómetro de masas logra esto a través de una secuencia de 3 principales subsistemas, denominados:(i) la fuente de iones, en la cual se realiza la ionización de las moléculas orgánicas, y desde donde los iones son acelerados, (ii) el analizador de masas el cual separa los iones de acuerdo a su valor  $m/z$ , y finalmente (iii) el detector, en donde las intensidades relativas (abundancias) de los iones individuales es determinada. El instrumento se mantiene a una presión

baja por una bomba turbomolecular o por bombas de difusión de aceite. La baja presión del instrumento permite a los iones viajar desde la fuente de iones hacia el detector prácticamente sin obstáculos con una mínima interacción con otras moléculas.



**Figura 9.** Componentes principales de un cromatógrafo de masas.

La espectrometría de masas ha sido aplicada no solo a la elucidación de moléculas orgánicas, sino también a su cuantificación en una gran variedad de matrices.

La espectrometría de masas puede determinar el peso molecular de una molécula, incluso aquellas masas mayores de 100 000 Da y al mismo tiempo proveer información estructural incluyendo la secuencia de péptidos o hidratos de carbono complejos. En las circunstancias más favorables, la MS puede cuantificar

trazas de moléculas orgánicas con límites de detección de attomol ( $10^{-18}$  mol) (Toshimitsu Niwa, 1995)

Adicional a esto, el análisis mediante la espectrometría de masas se puede escoger entre varios modos de ionización y en dos modos de análisis del espectro, los cuales son: con barrido total de iones (SCAN por sus siglas en inglés) y por monitoreo selectivo de iones (SIM, por sus siglas en inglés). (Willard, H., et al., 1988).

### **9.5. El acoplamiento GC-MS en el análisis de esteroides anabólicos**

La ventaja de los métodos cromatográficos consiste en permitir separar los materiales en sus respectivos componentes moleculares. Sin embargo, una de sus principales limitaciones es que con frecuencia no se identifican los componentes que se eluyen y una de las principales ventajas de la espectrometría de masas es que permite determinar especies moleculares y atómicas a partir de los resultados del espectro de masas.

Por las ventajas y limitaciones complementarias de la espectrometría de masas y la cromatografía, probablemente es en la actualidad una de las herramientas de análisis más poderosas para el análisis de compuestos en mezclas complejas. La selectividad en el análisis por GC-MS es sobresaliente ya que provee evidencia concluyente de la presencia de un compuesto debido a la combinación de información proporcionada por el cromatógrafo de gases y la información estructural proveniente del espectrómetro de masas.

(Skoog., 2001).

## **10. ANALISIS DE ESTEROIDES ANDROGÉNICOS ANABÓLICOS**

### **10.1. Pasos críticos en el análisis de EAA**

Durante el análisis de los esteroides anabólicos androgénicos existen factores determinantes que pueden llevar a un resultado falso positivo o a un falso negativo. Dichos pasos críticos son: La hidrólisis, extracción y derivatización de los esteroides anabólicos androgénicos.

En esta sección discutiremos brevemente las características de cada uno de estos procesos.

#### **10.1.1. Hidrólisis**

Como mencionamos anteriormente la testosterona es eliminada del organismo en forma de glucuronido, por tal motivo es necesario realizar un procedimiento de hidrólisis para poder obtener el metabolito de interés antes de ser analizado por técnicas analíticas. En este apartado se mencionaran brevemente los principales métodos de hidrólisis.

#### **10.1.2. Hidrólisis acida**

Un ácido mineral se adiciona a la muestra de orina para romper el enlace de los esteroides con el glucuronido. El rendimiento de la hidrólisis esta fuertemente influenciado por algunos parámetros como son:

- El tipo de ácido utilizado (Hidroclorhídrico o sulfúrico),
- La molaridad del ácido,

- La temperatura de reacción y,
- El tiempo de reacción.

Una hidrólisis completa se lleva a cabo a temperatura de ebullición de la muestra de orina a 1 hr bajo la adicción de ácido hidroclorehídrico (15% v/v), aunque otros autores mencionan que las óptimas condiciones se logran con el uso de ácido sulfúrico 3 M a 37 °C durante 24 hr. (Elisabetta Venturelli., et al. 1995)

### 10.1.3. Hidrólisis Enzimática

Los esteroides conjugados son también hidrolizados por enzimas específicas derivadas de bacterias, hígados de ganado vacuno y moluscos. Las bacteria (*Escherichia coli*) y los extractos de hígado de ganado vacuno no presentan actividad sulfatasa, pero si contienen actividad  $\beta$ -glucoronidasa con mejores rendimientos de hidrólisis a un pH de 6.8-7.0 para los extractos de *E. coli* y un pH de 5.0 para los extractos de hígado de ganado vacuno. (Elisabetta Venturelli., et al. 1995) (Rachel. L. Gomes, et al., 2009)

Las preparaciones de moluscos son derivados de la lapa (*Patella vulgata*) y del caracol (*Helix pomatia*). En adición a la actividad  $\beta$ -glucoronidasa, presentan actividad sulfatasa, pobremente para *P. vulgata* e importante para *H. pomatia* (Elisabetta Venturelli., et al. 1995) (Graef V, et al., 1977.). Estas preparaciones requieren un pH de 4.5-5.5 para una óptima actividad.

## 10.2. Extracción

La extracción preliminar de la testosterona y de sus metabolitos es necesaria para continuar con posteriores pasos de purificación. Este procedimiento permite la concentración de la muestra e induce una limpieza parcial.

### 10.2.1. Extracción líquido-líquido

El principio de la extracción se basa en la partición de la testosterona entre dos disolventes inmiscibles. El método se emplea generalmente para recuperar la testosterona no conjugada, que es sólo ligeramente soluble en una matriz acuosa y puede ser extraída de la orina mediante disolventes orgánicos, por lo general, éter dietílico y diclorometano. Después de lavar con una solución alcalina y agua destilada, la muestra podrá ser sometida a nuevas medidas de análisis. ((Elisabetta Venturelli., et al. 1995) Este procedimiento es sencillo y rápido, pero requiere de una alta proporción de solvente para la matriz de orina.

### 10.2.2. Extracción en fase sólida

En la extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en ingles), la testosterona es retenida en una material adsorbente y posteriormente recuperada por disolventes polares. Aunque en el mercado existen muchos cartuchos de SPE solo se mencionaran los cartuchos C18.

### 10.2.3. Sílice sustituida con octadecil (C<sub>18</sub>)

El adsorbente C<sub>18</sub>, en un cartucho envasado de poliestireno y ha tomado el lugar de la amberlita XAD-2. El eficiente sorbente C<sub>18</sub> retiene a la testosterona libre y a la testosterona conjugada y tiene con una capacidad mucho mayor que la Amberlita (unos 300 mg por 100 ml de orina), los andrógenos se recuperan en un pequeño volumen de de disolvente (3-5 ml), y un caudal tan rápido como 30 ml / min se puede aplicar con una cámara de vacío (T. Fotsis. et al., 1987) (C.H.L. Shackleton .et at., 1980)

Justo antes de su uso, el cartucho de C<sub>18</sub> se prepara con un disolvente orgánico para activar el adsorbente y con agua para eliminar el disolvente residual. La muestra se aplica a la columna y se lava con una solución acuosa para que posteriormente se eluyan los analitos con metanol o acetonitrilo. (T. Fotsis. et al., 1987) (C.H.L. Shackleton .et at., 1980)

### 10.3. Derivatización

La volatilidad y la estabilidad térmica de los compuestos son requeridas para el análisis mediante GC/MS. La derivatización es obligatoria para los compuestos polares y termolábiles para hacerlos susceptibles al análisis cromatográfico.

Los requerimientos principales para una reacción de derivatización exitosa son:

- Un solo derivado debe ser formado por cada compuesto.
- La reacción de derivatización debe ser simple y rápida.
- La reacción debe ocurrir bajo condiciones suaves.
- El derivado debe ser formado con alta reproducibilidad y rendimiento.
- El derivado debe ser estable en el medio de reacción.

#### 10.3.1. Reacción de derivatización

Los principales procedimientos usados para reacciones de derivatización son la silación, acilación, alquilación, etc. En este punto solo nos enfocaremos a la reacción de derivatización con compuestos de silicio.

La silación es el procedimiento de derivatización más ampliamente usado para el análisis de GC/MS. (J. Segura et at., 1998). Los derivados silil son formados

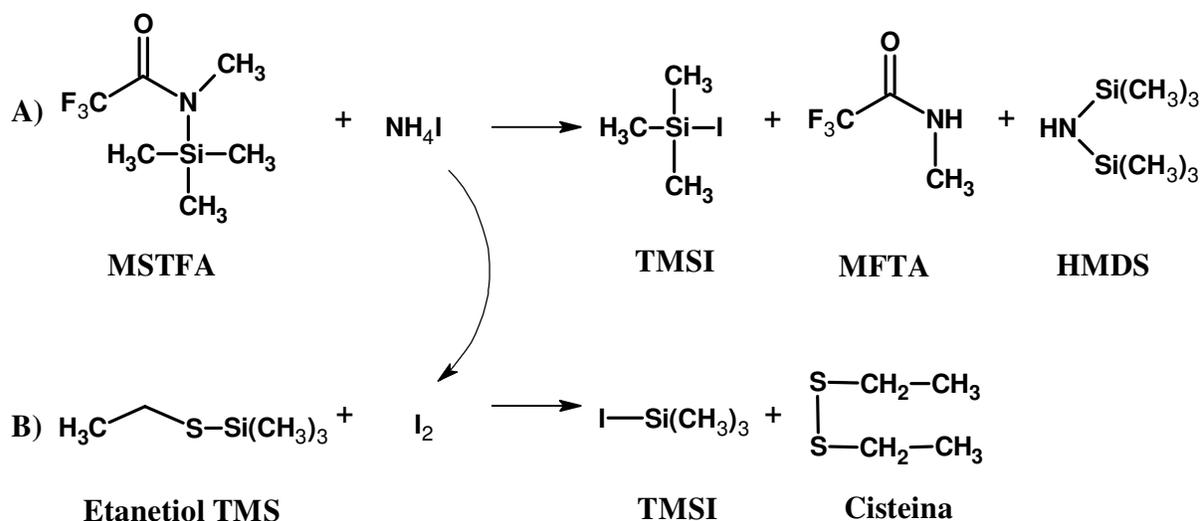
cuando se desplaza un protón activo, en los grupos –OH, -SH o –NH, por un grupo alquilsilil. Casi todos los grupos funcionales protonados presentes en compuestos orgánicos pueden ser convertidos en ésteres o ésteres de silil. La habilidad de varios grupos funcionales para formar los derivados silil es la siguiente: alcoholes>fenoles>ácidos carboxílicos>aminas>amidas. (J. Segura et al., 1998)

El procedimiento más común de silación es la trimetilsilación, ya que los derivados trimetilsilil (TMS) combinan la estabilidad química y térmica, así como una alta volatilidad. Son fáciles de preparar y muestran excelente comportamiento en la GC. Una gran variedad de este tipo de agentes con diferentes propiedades (volatilidad, reactividad, selectividad, etc.) han sido desarrollados. (J. Segura et al., 1998). Las TMS amidas, N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) (D.L. Dalling, et al., 1968) y N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) (M. Donike, J. Chromatogr. 42 (1969) 103) son los más ampliamente usados en los trabajos analíticos. El MSTFA es la TMS-amida más volátil disponible. (J. Segura et al., 1998). Algunos esteroides anabólicos y algunos de sus metabolitos no presentan buen comportamiento cromatográfico, principalmente debido a la presencia de los grupos hidroxilo y ceto en su estructura. (J. Segura et al., 1998)

Considerando el hecho de que algunos esteroides anabólicos contienen un grupo 17 $\beta$ -hidroxilo terciario, hacen que este tipo de compuestos estén impedidos estéricamente. Por esta razón, se han usado catalizadores para el análisis de drogas de abuso y sus metabolitos. (J. Segura et al., 1998). El trimetilsililimidazol (TMSIm) es un fuerte agente de silación para los grupos hidroxilo y carboxilo que no

reaccionan con los grupos amino, principalmente es usado como catalizador. (R.P. Evershed, et al., 1987)

Algunos esteroides anabólicos y sus metabolitos también contienen un grupo carboxilo en la molécula. La posibilidad de formar los derivados TMS a través de la forma enólica es usado para incrementar la masa molecular del derivado y evitar interferencias. Esto se logra al usar acetato de potasio (S.G. Webster., 1985) o TMSIm como catalizadores. Recientemente el uso de ioduro de amonio con MSTFA para generar in situ el ioduro de trimetil silil (TMSI) ha sido recomendado (W. Schanzenzer, et al. 1996) La adición de agentes reductores tales como el ditioeritritol, etanetiol o 2-mercaptoetanol minimiza la formación de iodo y han sido descritos por algunos autores. (R. Massé, et al., 1989) (J. Segura, et al., 1993) (W. Schanzenzer, et al., 1991) Este tipo de reacción se presenta en el **Esquema 9**. (Hernández, Antonio. Comunicación personal realizada el 5 de Abril del 2010)



**Esquema 9.** Preparación de MSTFA: NH<sub>4</sub>I: Etanetiol

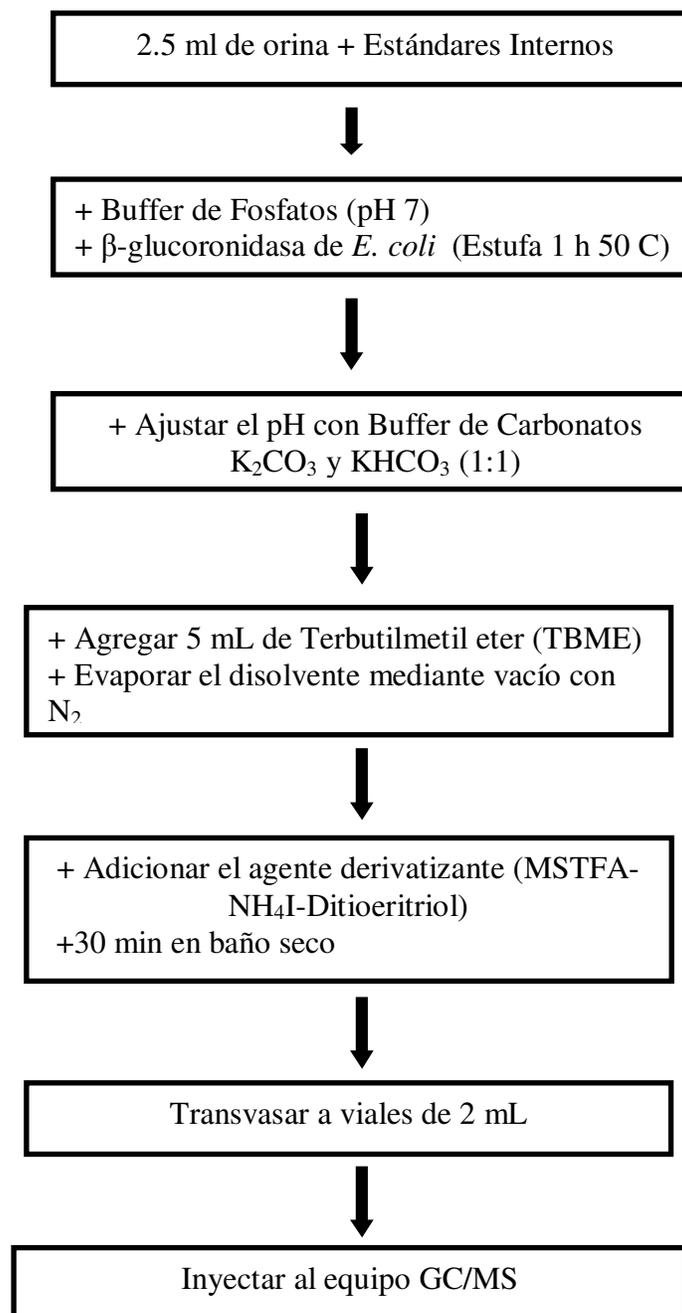
## 11. EJEMPLOS EN EL ANALISIS DE ESTEROIDES

El análisis de esteroides en la prevención y control del dopaje es realizado generalmente usando como muestra biológica una muestra de orina de los deportistas como matriz biológica. Los métodos rutinariamente usados en el screening de esteroides esta principalmente enfocado en aquellos metabolitos que son excretados sin conjugar o como glucuronidos en la orina. Previo al análisis de la muestra en los instrumentos analíticos, las alícuotas de las muestras, que consisten en 2.5 mL de orina de los deportistas, son hidrolizadas enzimáticamente usando  $\beta$ -glucoronidasa. Posteriormente se realiza la extracción de los esteroides libres (no conjugados) de la matriz biológica y la concentración de los analitos realizando una extracción liquido-liquido o mediante una extracción en fase sólida (EFS). Posteriormente como propuso Donike (M. Donike, 1969) la mayoría de los laboratorios utilizan el compuesto *N*-metil-*N*-trifluoroacetamida (MSFTA) como agente derivatizante antes de la separación mediante GC.

Durante este proceso de análisis algunos compuestos, la mayoría de ellos deuterados, se utilizan como estándares internos y permiten el control en los pasos críticos de preparación de las muestras y para determinar las cantidades de esteroides excretados (M.K. Parr, et al., 2010)

Los laboratorios de control de dopaje se enfrentan a un número cada vez mayor de sustancias a analizar, por lo que un examen exhaustivo de los esteroides que cubren las diferentes clases de sustancias prohibidas es lo más deseado. Un procedimiento que cubre los esteroides en un método de tamizaje después de la desconjugación glucurónidos combina LC-MS/MS y GC-MS de análisis dentro de una preparación de muestra única.

Los residuos finales se dividen en dos partes alícuotas y se analizaron por separado. La preparación de la muestra se representa en la **Diagrama 2**. (W. Schänzer, et al., 2004), (Rachel. L. Gomes, et al., 2009), (H. Noppe, et al., 2008).



**Diagrama 2:** Análisis de Screening de esteroides en el control del dopaje.

Los criterios para la identificación de la sustancia propuesta por la WADA, incluyen la coincidencia en la abundancia relativa de al menos tres iones de diagnóstico o de tres iones de transiciones y el tiempo de retención en comparación con las muestras de referencia o sustancias de referencia. (World Anti-Doping Agency, Wada technical document td2003idcr, 2004, online at [http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/criteria\\_1\\_2.pdf](http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/criteria_1_2.pdf), 15 Febrero 2010), (C. Van Poucke, et al., 2006), (Segura Jordi, et al., 1993), (Marcos J. De la Torre, et al., 2004)

## 12. DISCUSIÓN

El dopaje alrededor del mundo es un problema social, cuya solución solo supone la aplicación de estrategias y acciones preventivas que se pueden ejercer en las federaciones deportivas de cada país, incluyendo programas de divulgación, información y educación que alerten a todos los interesados en el ámbito deportivo, ya que el dopaje no es una cuestión solo del deportista. Si se toman en cuenta estas medidas en todos los niveles competitivos disminuirán los casos de dopaje alrededor de la elite deportiva. Otra medida de interés es el aumento en los controles antidopaje y la aplicación de sanciones mas severas a quienes infrinjan o violen al código.

En relación al análisis de esteroides anabólicos se discutió los aspectos más importantes en la preparación de la muestra, ya que son los pasos más importantes antes del análisis instrumental, y de la misma manera se presentó un panorama general del metabolismo de dichas sustancias, haciendo hincapié en el metabolismo de la testosterona.

### 13. CONCLUSIONES

Tomando en cuenta que la información que existe sobre los esteroides androgénicos anabólicos y los efectos adversos que su consumo provoca son muy escasos, el interés de realizar una investigación que abordara el tema del dopaje con esteroides se cumplió con este trabajo.

En relación a los objetivos particulares planteados y a los resultados obtenidos con la investigación de este trabajo podemos concluir lo siguiente:

- Se abordó la historia de los juegos olímpicos desde la antigua Grecia, cuna de estos juegos, hasta la actualidad incluyendo las normas y regulaciones de estos juegos.
- Se dio a conocer que es el dopaje deportivo, desde sus orígenes hasta la definición actual que dicta la Agencia Mundial Antidopaje (WADA).
- Se presentó en este trabajo de tesis los tipos esteroides y sus efectos a la salud de quien los consume. Ya que dadas las características estructurales que presentan este tipo de compuestos, endógenos o sintéticos, son utilizados para aumentar el desempeño físico en el deportista mediante un aumento en su resistencia, disminuyendo la fatiga, aumentando la masa muscular y la fuerza. Lamentablemente los efectos adversos que producen en las personas quienes los consumen es el precio por solo un momento de superioridad.

- Así mismo, se comentaron los aspectos generales de la biosíntesis y metabolismo de los esteroides androgénicos anabólicos, haciendo énfasis en el metabolismo de la testosterona y en las enzimas que participan en dichas transformaciones.

Finalmente en relación al objetivo general podemos concluir que:

- La técnica analítica de vanguardia para detectar y confirmar la presencia de esteroides en los deportistas es el acoplamiento GC/MS por su alta sensibilidad y especificidad. Sin embargo, no solo es importante el análisis por las técnicas analíticas, sino que es igual de importante la preparación de la muestra y en este sentido se abordaron los aspectos clave en el análisis de los esteroides androgénicos para la prevención y control del dopaje.

Para poder abordar un tema tan interesante como el del dopaje se tiene que tener conocimientos de toxicología, química analítica, metabolismo, química orgánica que son necesarios para la preparación de la muestra y saber lo que estamos buscando en las muestras de los deportistas, así como para la correcta interpretación de los resultados. Por lo que de manera personal la integración de los conocimientos adquiridos en la carrera y el cumplimiento de los objetivos de dicho proyecto de tesis se cumplieron.

Lamentablemente el tema del dopaje es tan extenso que se tiene que abordar el tema de forma asilada, afortunadamente con este trabajo de tesis se deja un antecedente para que otro profesional interesado en el área de la salud y en el ámbito deportivo realice futuras investigaciones al respecto que lo complementen, y así, se tenga más información con respecto al dopaje en nuestro país, ya que las investigaciones al respecto son tan escasas y las que hay no son tan digeribles por los atletas, con la finalidad de que se evite el dopaje con los esteroides anabólicos androgénicos.

---

---

## 14. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Toshimitsu Niwa. Basic theory of mass spectrometry. *Clinical Mass Spectrometry*. (Clinical Chemica Acta) 1995 (241-242):15-71.
2. Braithwaite, A. & Smith J.F. *Chromatographic Methods*. Chapter 1. 4th Ed. Chmpman Hall. London (1985):3-8.
3. - Brooks RV (1975) Androgens. *Clin Endocrinol Metab* 4:503-520.
4. C. Van Poucke, C. Detavernier Et All. Determination of anabolic steroids in dietary supplements by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Ghent University, Department of Bioanalysis, Belgium 2006, 35-42.
5. C.H.L, Shackleton and J.O. Whitney. Use of sep-pak @ cartridges for urinary steroid extraction: Evaluation of the method for use prior to gas chromatographic analysis. *Clin. Chim. Acta*, 107 (1980) 231.
6. Conney, A.H. Induction of microsomal cytochrome P-450 enzymes. *Life Sci* (1986) 39, 2493-2518.
7. D.L. Dtalling, et al., *Biochem Biophys Res Commun*. 31 (1968) 616.
8. David, R. Mottram. *Doping in Sport*. Spon Press. 1996.
9. Dehennin L, Matsumoto AM (1993) Long-term administration of testosterone enanthate to normal men: alterations of the urinary profile of androgen metabolites potentially useful for the detection of testosterone misuse in sport. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44:179-189.
10. Detlef Thieme, Peter Hemmersbach, *Doping in Sports*. 2010. Springer.
11. Elisabetta Venturelli, Adalberto Cavalleri, Giorgio Secreto. *Journal of Chromatography B. Methods for urinary testosterone analysis*. 671 (1995) 363-380.
12. Fried, Edgar. *Tasks and objectives of the int. Olympic Committee Since 1884*. International Olympic Committee 2009.

- 
- 
13. Gower DB, et al. (1995) Anabolic steroids: Metabolism, doping and detection of equestrian and human sports. In: Makin HLJ and Gower DB (eds) Steroids analysis. Blackie Academic and Professional, Chapman & Hall, Glasgow.
  14. Graef V, Furuya E, Nishikaze O. Hydrolysis of steroids glucuronides with  $\beta$ -glucuronidase preparations from bovine liver, *Helix pomatia*, and *E. coli*. Clin Chem 1977; 23: 532-535.
  15. H. Noppe, B. Le Bizec, K. Verheyden, H.F. De Brabander. Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices. Analytica Chimica Acta. 611 (2008) 1-16.
  16. [http://www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-Prohibited-list/WADA\\_Prohibited\\_List\\_2010\\_EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited-list/WADA_Prohibited_List_2010_EN.pdf) Consultado el 5 de Febrero del 2010
  17. [http://www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-The-Code/WADA\\_Anti-Doping\\_CODE\\_2009\\_EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-The-Code/WADA_Anti-Doping_CODE_2009_EN.pdf). Consultado el 3 de Febrero del 2010
  18. <http://www.wada-ama.org/en/dynamic.ch2?pageCategory.id=312> Consultado el 18 de Febrero 2010.
  19. <http://www.wada-ama.org/en/dynamic.ch2?pageCategory.id=312> Consultado el 3 de Febrero de 2010.
  20. <http://www.wada-ama.org/en/World-Anti-Doping-Program/Sports-and-Anti-Doping-Organizations/International-Standards/> Consultado el 3 de Febrero del 2010.
  21. International Olympic Committee, The fight against doping and promotion of athletes' health, IOC, Switzerland, 2007, 5/5.
  22. J. Segura et al. J.Chromatogr. B Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents 713 (1998) 61-90.

- 
- 
23. J. Segura, et al., Clin Chem 39(1993) 863).
24. J. Sheider Angela., Friedmann Theodore. Gene Doping in Sports. The Science and Ethics of Genetically Modified Athletes. Elsevier 2006.
25. Klaassen, C.D.; Casarett & Doull's. Toxicology: The Basic science of poison; 6<sup>o</sup> Ed.; McGraw-Hill: E.U., 2001.
26. M. Donike, N-methyl-n-trimethylsilyl-trifluoroacetamide a new silylating agent from series of silylated amides, J. Chromatogr. 42 (1) (1969) 103–104.
27. M.K. Parr, W. Schänzer, Detection of the misuse of steroids in doping control, J. Steroid Biochem. Mol. Biol.(2010), doi:10.1016/j.jsbmb.2009.12.008.
28. Marcos J. De la Torre X, Et All. Liquid chromatography clean-up method to improve identification of anabolic agents in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. Institut Municipal d'Investigació Medica IMIM, Barcelona, España, 2004, 79-88.
29. Martin, Mayes Rodwell. Bioquímica de Harper 9<sup>a</sup> Ed. Editorial El manual Moderno. 1984. Pag 502.
30. Mc Nair, H.M. & Miller, J.M. Basic Gas Chromatography. Ed Jonh Wiley & Sons Inc. New York. USA. 1998.
31. Mueller Klaus, Grosse R. Lang, D. Thieme., Chromatographic Techniques- The Basis of Doping Control, Journal of Chromatography B 674 (1995), 1-11.
32. Myriam O.B., Viviana G.T., Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. Rev. Med. Chile. 2004; 132, pp 85-94.
33. NA Hassan, MF Salem, MAEL Sabed., Doping and effects of anabolic androgenic steroids on the heart: histological, ultrastructural, and echocardiography assessment in strength athletes. Faculty of Medicine, Tanta University, Egypt, *Hum Exp Toxicol May* 2009 28: 273-283.
34. O'Leary John Drugs and Doping in Sport. Socio-Legal Perspectives, Ed. Cavendish Publishing, Anglia Polytechnic University, London. 2001.

- 
- 
35. Omura, T. Forty years of cytochrome P-450. *Biochem Biophys Res Commun* (1999) 266, 690-698.
36. Peter I. Mackenzie, Louise Rodbourne and Steven Stranks. *Steroid Biochem. Molec. Biol.* Vol. 43, No. 8, pp. 1099-1105, 1992.
37. R. Massé, et al., *J. Chromatogr.* 489(1989):23.
38. R.A. Day, A.L. Underwood. *Química Analítica Cuantitativa*, Ed. 5ª Ed. Pearson Education, México. 1989.
39. R.P. Evershed, J.G. Mercer, H.H. Rees., *J. Chromatogr.* 390(1987) 357.
40. Rachel. L. Gomes, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2009), doi:10.1016/j.jpba.2009.01.027.
41. S.G. Webster., *J. Chromatogr.* (1985) 333:186.
42. Segura Jordi, Pascual J. Antonio., *International cooperation in analytical chemistry: experience of antidoping control at the XI Panamerican Games, Habana, Cuba, 1993*, 836-845.
43. Skoog, D. *Principios de Análisis Instrumental*. Mc Graw Hill, 5ª Ed. España. 2001. Pag 537-573, 759-782.
44. T. Fotsis and H. Adlercreutz, The multicomponent analysis of estrogens in urine by ion exchange chromatography and GC-MS-I quantitation of estrogens after initial hydrolysis of conjugates *J. Steroid Biochem.*, 28:2 (1987) 203-213.
45. The Internacional Olympic Committee [www.olympic.org](http://www.olympic.org).
46. The Internacional Olympic Committee. *Antidoping Rules* article 11. page 16.
47. The Olympic Museum, *the Olympic Games in Antiquity*, International Olympic Committee 2007: 14/14.
48. Toscano V *Dihydrotestosterone metabolism*. *Clin Endocrinol Metab* (1986) 15:279-292.
49. W. Schanzenzer, et al. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* Gas chromatography/mass spectrometry identification of long-term excreted

---

---

metabolites of the anabolic steroid 4-chloro-1,2-dehydro-17 $\alpha$ -methyltestosterone in humans (1996) 57:363.

50. W. Schanzenzer, et al., J. Steroid Biochem. Mol. Biol. Metabolism of metandienone in man: Identification and synthesis of conjugated excreted urinary metabolites, determination of excretion rates and gas chromatographic-mass spectrometric identification of bis-hydroxylated metabolites 38(1991) 441.

51. W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck (Eds.), Recent Advances in Doping Analysis (12), Sportund Buch Strauß, Köln, 2004, pp. 65–69).

52. Willard, H., Merritt, L., Dean, J. Métodos de Análisis Instrumental. Compañía Editorial Continental. 1988. Cap. 15-19. pp 477-628.

53. World Anti-Doping Agency, Brief History of Antidoping , Wada, v.6.0, 2009.

54. World Anti-Doping Agency, Wada technical document td2003idcr, 2004, online at [http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/criteria\\_1\\_2.pdf](http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/criteria_1_2.pdf), 15 Febrero 2010.

55. [www.wada-ama.org](http://www.wada-ama.org) Consultado el 8 de Febrero de 2010.

56. Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y. & Guengerich, F.P. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: Studies with liver microsomes of 30 japaneses and 30 caucasians. J Pharmacol Exp Ther. 1994. 270, 414-423.

---

---

## 15. GLOSARIO

<b>ABREVIATURA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
<b>AMA</b>	AGENCIA MUNDIAL ANTIDOPAJE
<b>COI</b>	COMITE OLIMPICO INTERNACIONAL
<b>DHEA</b>	DEHIDROEPIADROSTERONA
<b>EAA</b>	ESTEROIDES ANABOLICOS ANDROGENICOS
<b>EFS</b>	EXTRACCION EN FASE SOLIDA
<b>FIFA</b>	FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE FUTBOL ASOCIACION
<b>GC</b>	CROMATOGRAFIA DE GASES
<b>GC-MS</b>	CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPLADO A MASAS
<b>H<sub>2</sub></b>	HIDROGENO
<b>He</b>	HELIO
<b>HMDS</b>	HEXAMETILDISILAZANO
<b>HPLC</b>	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA
<b>LC-MS/MS</b>	CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS MASA ACOPLADO A MASAS
<b>MFTA</b>	METIL – FENIL FLUOROACETAMIDA
<b>MS</b>	ESPECTROMETRO DE MASAS
<b>MSTFA</b>	N-METIL-N-TRIMETILSILITRIFLUOROACETAMIDA
<b>N<sub>2</sub></b>	NITROGENO
<b>SCAN</b>	BARRIDO TOTAL DE IONES
<b>SIM</b>	MONITOREO SELECTIVO DE IONES
<b>TBME</b>	TERBUTILMETIL ETER
<b>TMS</b>	TRIMETILSILIL
<b>TMSI</b>	N- TRIMETILSILILIMIDAZOL
<b>TMSIM</b>	TRIMETILSILILMIDAZOL