



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“CONFIRMACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN  
DE ESTEROIDES ENDÓGENOS MEDIANTE  
GC/C/IRMS”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

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

**DELANEY RIVERA JUÁREZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2010**



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: Villanueva González Pedro  
Vocal: Cervera Flores Ernestina  
Secretario: Hernández Martínez Antonio  
Primer suplente: Flores Pérez Blas  
Segundo suplente: García Ortega Héctor

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:

---

Delaney Rivera Juárez

En ocasiones las palabras no logran reflejar la esencia de los sentimientos, por tanto, resulta imposible tratar de expresar unas líneas de agradecimiento hacia todas aquellas personas que con sus acertadas opiniones y apoyo contribuyeron a la realización de este proyecto, lo cual es una gran satisfacción.

## **DEDICATORIAS**

### ***A Dios:***

Por su infinito amor y por no dejarme sola en los momentos que más lo he necesitado.

### ***A mi hijo Yurem Gael:***

Por haber significado la inspiración que necesitaba para terminar mi carrera, por ser mi motor principal que me impulsa a seguir adelante.

### ***A mis padres Tere y José Luis:***

Gracias por su apoyo y ejemplo que en cada instante me han brindado. Por su confianza, comprensión y amor incondicional. Por formar parte de mis anhelos, aspiraciones y logros.

### ***A mis hermanas Miriam, Nancy y Kimberly:***

Por todos los maravillosos momentos buenos y malos que hemos vivido juntas y el cariño que nos ha unido. Por creer en mí y en mi carrera.

## **AGRADECIMIENTOS**

### ***A mi asesor de tesis M. en C. Antonio Hernández Martínez:***

Maestro son pocas las palabras para expresar, mi gratitud por impulsarme a dar el último paso en mi carrera, por sus valiosas aportaciones, confianza, cariño, apoyo y paciencia para poder concluir este proyecto de tesis. Mil gracias.

### ***A la Universidad Nacional Autónoma de México:***

Por tener la oportunidad de pertenecer a la máxima casa de estudios y forjar en mi valores e ideales positivos.

### ***A la Facultad de Química:***

Por formar parte de ella, a las y los profesores, por compartir cada una de sus enseñanzas y experiencias profesionales. Por dotarme de las herramientas necesarias para desempeñar un excelente papel en el área profesional.

### ***Al Dr. Benjamín Velasco Bejarano:***

Por sus aportaciones en la revisión de esta tesis, por sus valiosas observaciones y comentarios que están reflejadas en esta tesis.

### ***A los honorables miembros del jurado:***

Por todas sus observaciones y correcciones para resaltar esta tesis.

### ***Al M. en C. Daniel Huberto Rosas Sánchez:***

Representante del Colegio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias, por las instalaciones en donde se llevo a cabo esta tesis.

### ***A todos mis amigos:***

Por los momentos maravillosos e inolvidables que hemos compartido, por sus consejos y el ánimo que siempre me dan cuando las cosas están mal. Muchas Gracias!

---

---

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. INTRODUCCIÓN	2
<b>Capítulo III</b>	
3. ANTECEDENTES	4
3.1. Historia	4
3.1.1. Los juegos en la antigüedad	4
3.2. Historia de los Juegos Olímpicos actuales	5
3.2.1. El Comité Olímpico Internacional (COI)	5
3.3. Historia del doping	6
3.3.1. Los primeros intentos del dopaje	7
<b>Capítulo IV</b>	
4. REGULACIONES ACTUALES EN EL DEPORTE	8
4.1. La Agencia Mundial Anti-dopaje (WADA; AMA)	8
4.1.1. Programa Mundial Antidopaje	9

---

---

	Pág.
4.1.2. El Código Mundial Antidopaje	9
4.1.3. Definición de Dopaje conforme a la WADA	10
4.2. Los Estándares Internacionales	11
4.2.1. La Lista de Sustancias y Métodos Prohibidos (La Lista Prohibida 2010).	12
<b>4.2.2. Documentos técnicos de la WADA</b>	<b>16</b>
<b>Capítulo V</b>	
<b>5. QUÍMICA DE LOS ESTEROIDES</b>	<b>20</b>
5.1. Aspectos Generales	20
5.2. Efectos de los esteroides anabólicos	23
5.3. Los esteroides en los análisis de dopaje	24
5.4. Biosíntesis de las hormonas de las glándulas suprarrenales	27
5.5. Metabolismo de xenobióticos	28
5.6. Biotransformación de la testosterona	29
5.6.1. Prohormonas de la testosterona	30
<b>Capítulo VI</b>	
<b>6. MÉTODOS INSTRUMENTALES</b>	<b>33</b>
6.1. Técnicas Cromatográficas	33
6.1.1. La cromatografía	33
6.2. Extracción en fase sólida (EFS-SPE)	34



---

---

	Pág.
6.3. La cromatografía de gases (GC)	36
6.3.1. El proceso cromatográfico	38
6.4. La espectrometría de masas (MS)	40
6.5. El acoplamiento de la cromatografía de gases a espectrometría de masas. (GC/MS)	43
<b>Capítulo VII</b>	
7. COMPONENTES Y FUNCIONAMIENTO DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE RELACIONES ISOTÓPICAS (IRMS)	44
7.1. Cromatografía de gases	44
7.2. La interfase de combustión	44
7.3. La trampa de agua	45
7.4. Funcionamiento del espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (IRMS)	47
7.4.1. Introducción de un gas de referencia	49
7.5. Usos del GC/C/IRMS	50
<b>Capítulo VIII</b>	
8. LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE RELACIONES ISOTÓPICAS	53
8.1. Definición de átomo	53
8.1.1. Definición de "isótopo"	54
8.1.2. Isótopos del carbono	57
8.2. El Fraccionamiento isotópico del carbono en plantas	59
8.2.1. La fotosíntesis	60

---

---

	Pág.
8.2.2. Plantas tipo C3	61
8.2.3. Plantas tipo C4	63
8.2.4. Plantas tipo CAM	65
<b>Capítulo IX</b>	
9. DETECCIÓN DE ESTEROIDES ANABÓLICOS Y SUS METABOLITOS EN EL ANÁLISIS DEL DOPAJE	67
9.1. Pasos críticos en el análisis de esteroides anabólicos	67
9.2. Confirmación de la administración de esteroides endógenos mediante GC/C/IRMS	70
9.3. Condiciones analíticas de los equipos	73
9.3.1. Condiciones de trabajo para el HPLC	73
9.3.2. Condiciones de trabajo para el cromatógrafo de gases y para el IRMS	74
<b>Capítulo X</b>	
10. DISCUSIÓN	75
<b>Capítulo XI</b>	
11. CONCLUSIONES	76
<b>Capítulo XII</b>	
12. BIBLIOGRAFÍA	77

## 1. OBJETIVOS

### 1.1. Objetivo General

- Dar a conocer las condiciones y aspectos más importantes en el análisis de esteroides, mediante el equipo de Cromatografía de Gases con Celda de Combustión acoplado a un Espectrómetro de Masas de Relaciones Isotópicas (GC/C/IRMS), para detectar la administración de esteroides endógenos de forma exógena y así contribuir a disminuir el dopaje deportivo con este tipo de sustancias.

### 1.2. Objetivos Particulares

- Presentar un panorama general sobre la historia de los Juegos Olímpicos.
- Dar a conocer que es el dopaje deportivo y los tipos de sustancias prohibidas.
- Presentar la reglamentación y aspectos generales actuales acerca de la Agencia Mundial Antidopaje (AMA, WADA).
- Conocer la biosíntesis y metabolismo de los esteroides androgénicos anabólicos, así como la síntesis de algunos compuestos relacionados.
- Dar a conocer los efectos adversos del consumo de los esteroides anabólicos androgénicos.
- Publicar por este medio, el método analítico para la identificación de los esteroides androgénicos como sustancias prohibidas mediante el uso del GC/C/IRMS.
- Dar inicio en un tema de investigación de relevante importancia en nuestro país que ha sido poco estudiado.

## 2. INTRODUCCIÓN

El consumo de sustancias prohibidas es una forma externa, de influir en el desempeño físico del atleta. Estas sustancias, al ser administradas provocan un aumento artificial del rendimiento deportivo, y su uso se opone a la filosofía que dio surgimiento al Comité Olímpico Internacional (COI), que publica anualmente la lista de sustancias y métodos prohibidos para los deportistas.

Este tipo de sustancias prohibidas se encuentran publicadas en el documento oficial de la WADA (Agencia Mundial Antidopaje) que se conoce como la Lista Prohibida, donde se encuentran los esteroides anabólicos, quienes son uno de los grupos de compuestos más ampliamente usados para mejorar el desempeño físico 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 que presentan los mismos efectos que su precursor o que han sido modificados para eliminar las propiedades androgénicas de la testosterona dejando que solo contribuyan los efectos anabólicos de dicha sustancia. Dentro de este grupo también encontramos prohormonas, que son precursores de la testosterona, los cuales generan mediante metabolismo a la testosterona, así como a sus metabolitos.

Lamentablemente las propiedades físicas y químicas de algunos compuestos sintéticos son iguales a los que biosintetiza el organismo y metodologías más específicas deben desarrollarse para identificar el origen endógeno o exógeno de dichas sustancias. Para este propósito, la investigación bibliográfica en este trabajo ha sido encaminada a identificar esta diferencia así como para detectar sustancias dopantes a las concentraciones requeridas.

La técnica de cromatografía de gases con celda de combustión acoplado a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (GC/C/IRMS), puede determinar, mediante la relación isotópica de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , el origen de la testosterona y/o sus metabolitos presentes en la muestra de un deportista.

Dicho equipo determina el análisis de isótopos estables que se refiere a la variación en el contenido isotópico de algún elemento en particular conocido, un proceso en el cual un isótopo de un elemento es discriminado, física o químicamente, en relación a otro isótopo, este proceso de discriminación se conoce como fraccionamiento. Las diferencias isotópicas pueden ser una fuente de información acerca de los mecanismos de reacción del medio ambiente y/o la fuente o destino de un compuesto.

En términos del  $^{13}\text{C}$ , la fotosíntesis es un importante proceso de fraccionamiento donde las plantas absorben dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) de la atmósfera. Existen dos métodos por los cuales las plantas pueden reducir el  $\text{CO}_2$  absorbido de la atmósfera, y tres categorías de plantas que utilizan estos métodos, conocidas como plantas tipo C3, C4 y CAM.

Ya que en México la investigación realizada en el ámbito deportivo es nula, es de particular interés dar a conocer los métodos actuales para el análisis y detección de los esteroides anabólicos, y de esta forma contribuir a un campo de investigación de interés económico, político y social en nuestro país, por lo que en esta tesis se presenta lo publicado en relación al análisis de sustancias dopantes con enfoque a los esteroides anabólicos, así como a su confirmación mediante el equipo de espectrómetro de masas de relaciones isotópicas, resaltando el metabolismo de este tipo de compuestos, la síntesis de compuestos relacionados y las regulaciones actuales sin excluir evidentemente, la historia de los Juegos Olímpicos.

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1. HISTORIA**

##### **3.1.1. Los juegos en la antigüedad**

Los Juegos Olímpicos comenzaron en Olimpia, Grecia, en el año 776 a.C. Los juegos se realizaron en el valle boscoso de Olimpia, en Elis. Aquí los griegos eligieron estatuas y templos construidos en un bosque dedicado a Zeus, el dios más importante de todos los dioses. El mayor santuario fue una estatua de marfil y oro de Zeus. Creado por el escultor Fidias, que se consideró una de las Siete Maravillas del Mundo. Los estudiosos han especulado que los juegos en el año 776 a.C. no fueron los primeros juegos, sino más bien los primeros juegos celebrados después de que se organizaron en festivales que se celebran cada cuatro años como resultado de un acuerdo de paz entre las ciudades-estado de Elis y Pisa.

El primer y único evento olímpico fue una carrera de 200 yardas, en el año 708 a.C. el pentatlón fue agregado y la lucha libre pasó a formar parte de los juegos. Este evento consistía en correr, luchar, saltar, lanzar el disco y lanzar la jabalina. Con el tiempo, el boxeo, la carrera de carros, y otros eventos fueron incluidos.

Los vencedores de estos primeros juegos fueron coronados con guirnaldas de un árbol sagrado de olivo que crecía detrás del templo de Zeus. Según la tradición este árbol fue plantado por Hércules, fundador de los juegos.

Los juegos se celebraban cada cuatro años a partir del año 776 a.C. al año 393 d.C. cuando fueron abolidas por el emperador cristiano bizantino Teodosio I. Los antiguos Juegos Olímpicos duraron 1170 años.

### 3.2. Historia de los Juegos Olímpicos actuales

La exitosa campaña para revivir los Juegos Olímpicos se inició en Francia por el Barón Pierre de Coubertin a finales del siglo XIX. 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. 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. (Museum, the Olympic Games in Antiquity, International Olympic Committee 2007), (Brief History of Antidoping, Wada, v.6.0, 2009).

En esta primera olimpiada de los juegos modernos cada país participante tuvo la oportunidad de desfilarse con sus respectivas banderas. En esa ocasión, el Barón Pierre de Coubertin 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.

#### 3.2.1. 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 llevarán 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 modificó 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.

### **3.3. 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).



### 3.3.1. 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 año 300 d.C. y los Huns consumían los testículos antes de las batallas, evidentemente con el mismo objetivo. Los hongos alucinógenos se tomaron en el siglo tercero para potenciar el rendimiento durante las competiciones olímpicas. (Detlef Thieme et al. 2010).

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

## 4. REGULACIONES ACTUALES EN EL DEPORTE

### 4.1. 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 año 2000. De acuerdo a los términos de la declaración de Lausana, La Agencia Mundial Antidopaje fue establecida el 10 de Noviembre de 1999 para promover y coordinar la lucha contra el dopaje en el deporte a nivel internacional. La Agencia Mundial Antidopaje 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.

La Agencia está conformada por igual número de representantes provenientes de las autoridades públicas y deportivas. 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).

#### **4.1.1. Programa Mundial Antidopaje**

La armonización en la lucha global contra el dopaje en el deporte es lograda por la intervención conjunta 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.

#### **4.1.2. 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 en lograr una armonización completa en aspectos donde la uniformidad es requerida, y suficiente en otras áreas para permitir flexibilidad en cómo 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).

#### **4.1.3. Definición de dopaje conforme a la Agencia Mundial Antidopaje**

De acuerdo con la Agencia Mundial Antidopaje (WADA. *The World Anti-Doping Code* publicado en [http://www.wadaama.org/rtecontent/document/code\\_v3.pdf](http://www.wadaama.org/rtecontent/document/code_v3.pdf), consultado el 20 de Abril de 2010), el dopaje se define como la ocurrencia de una o varias de las violaciones de las normas antidopaje. Las más frecuentes son "la presencia de una sustancia prohibida o sus metabolitos o marcadores en la muestra de un atleta "y" el uso o intento de uso por un atleta de una sustancia prohibida o un método prohibido".

Además, otras situaciones también se consideran dopaje como: "(i) la negativa o de eludir la toma de muestras, (ii) violación de los requisitos aplicables sobre el atleta para los controles fuera de competencia, (iii) la falsificación o intento de alteración de cualquier parte del control de dopaje, (iv) la posesión de sustancias prohibidas y métodos prohibidos, (v) la trata o el tráfico intentado de alguna sustancia o método prohibido y (vi) la administración, la asistencia, incitación, contribución, instigación, encubrimiento o cualquier otro tipo de complicidad involucra una violación de las reglas antidoping".

En específico, la regla de antidoping que interesa en un laboratorio de prevención y control del dopaje se establece en el artículo 2.1, el cual 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 15 de Febrero del 2010).

#### **4.2. 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.

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).

#### 4.2.1. 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).

Como se muestra en la **Tabla No.1** Las sustancias y métodos prohibidos por la WADA pueden ser divididos en diferentes grupos. Algunos ellos (de S1 a S5 y M1 a M3) son prohibidos en todo momento (dentro y fuera de competición), otros (de S6 a S9) solo en competición y otros (P1 y P2) están prohibidos solo para deportes en particular. ([http://www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-Prohibitedlist/WADA\\_Prohibited\\_List\\_2010\\_EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibitedlist/WADA_Prohibited_List_2010_EN.pdf).

Consultado el 5 de Febrero del 2010).

**Tabla No. 1:** Grupos de sustancias y métodos prohibidos según la WADA

<b>Clase</b>	<b>Agente</b>
<b>Sustancias prohibidas dentro y fuera de competición</b>	
S1	Agentes anabólicos
S2	Hormonas y sustancias relacionadas
S3	$\beta$ – 2 Agonistas
S4	Hormonas antagonistas y Moduladores
S5	Diuréticos y otros agentes enmascarantes
<b>Sustancias prohibidas en competición</b>	
S6	Estimulantes
S7	Narcóticos
S8	Cannabinoides
S9	Glucocorticoides
<b>Métodos prohibidos dentro y fuera de competencia</b>	
M1	Acarreadores de oxígeno
M2	Manipulación física o química
M3	Doping genético
<b>Sustancias prohibidas en deportes específicos</b>	
P1	Alcohol
P2	$\beta$ – Bloqueadores

Agentes Anabólicos; la lista comprende:

**1. Esteroides Anabolizantes Androgénicos 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 $\alpha$ -androstano[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 $\alpha$ -metiléster-4-en-3-ona); **metiltestosterona**; **metribolona** (metiltrienolona, 17 $\beta$ -hidroxi-17 $\alpha$ -metilestra-4,9,11-trien-3-ona); **mibolerona**; **nandrolona**; **19-norandrostendiona** (éster-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); **tetrahydrogestrinona** (18 $\alpha$ -homo-pregna-4,9,11-trien-17 $\beta$ -ol-3-ona); **trembolona** y otras sustancias con estructura química o efectos biológicos similares.



**2. Esteroides Anabolizantes Androgénicos 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) y **testosterona**.

Y 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-noreticolanona**.**

**3. Otros Agentes Anabolizantes, que incluyen pero no se limitan a su estructura:**

**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.

#### 4.2.2. Documentos técnicos de la WADA

La WADA publica periódicamente recomendaciones técnicas concretas, que aborden ámbitos operativos específicos de los laboratorios acreditados, en un documento técnico. Los documentos técnicos constituyen elementos del nivel 2 del Programa Mundial Antidopaje, y por lo tanto la aplicación de las recomendaciones técnicas descritas en ellos es obligatoria y debe producirse antes de la fecha efectiva especificada en el documento técnico.

Los documentos técnicos sustituyen cualquier publicación anterior sobre un tema similar o en su caso, al Estándar Internacional para Laboratorios.

Los documentos técnicos que se muestran en la **Tabla No. 2**, son los documentos más actuales que establece la WADA y se encuentran enlistados en el documento WADA Technical Document – TD2009INDEX. (<http://www.wada-ama.org/en/Science-Medicine/Anti-Doping-Laboratories/Technical-Documents/>).

En el documento técnico TD2004EAAS se establecen los criterios para reportar la presencia de perfiles anormales de esteroides urinarios resultado de la administración de testosterona o sus precursores: androstenediol, androstenediona, dehidroepiandrosterona (DHEA), o de un metabolito de la testosterona: dihidrotestosterona o de un agente enmascarante: epitestosterona.

En dicho documento se recomienda que cuando una muestra de orina cumpla con alguno de los siguientes requisitos se someta a un análisis mediante espectrometría de masas de relaciones isotópicas. (Cawley and et al., 2008).

- i. Si el cociente entre las concentraciones urinarias de Testosterona/Epitestosterona sea mayor o igual a 4.
- ii. Cuando la concentración de testosterona o epitestosterona (en relación al glucuronido) sea mayor de 200 ng/mL.
- iii. Cuando la concentración de androsterona o eticolanolona sea mayor de 10,000 ng/mL, y
- iv. Cuando la concentración de dehidroepiandrosterona (DHEA) sea mayor a 100 ng/mL.

La confirmación entre la relación de las concentraciones de T/E elevada, concentración de testosterona, epitestosterona o de cualquiera otro de sus metabolitos debe ser realizado por triplicado.

Así mismo, se menciona que cuando un parámetro del perfil esteroideal indica una necesidad de seguir estudiando su valor expresado en unidades  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  delta por mil ( $\delta\%$ ) o la de sus metabolitos se mide y compara con la de los esteroides urinarios de referencia. Dependiendo de la naturaleza de los esteroides endógenos que se sospecha han sido administrados, los metabolitos analizados pueden ser: testosterona, epitestosterona, androsterona, eticolanolona, androstanediol, dehidroepiandrosterona (DHEA), o de otros metabolitos urinarios, mientras que los esteroides de referencia analizadas por los laboratorios son generalmente: pregnanediol, pregnanetriol, colesterol,  $11\beta$ -hidroxiandrosterona o 11-cetoeticolanolona.

**Tabla No. 2:** Documentos técnicos que establece la WADA.

Título	Número del documento	Número de versión	Valido a partir de
Armonización del método para la identificación de Eritropoyetinas Recombinantes y Análogos	TD2009EPO	2.0	Sept. 21 de 2009
Criterios de Identificación para análisis cualitativos que incorporan GC-MS	TD2003IDCR	1.2	1º Enero de 2004
Paquetes de documentación del laboratorio	TD2009LDOC	1.0	1º Enero de 2009
Cadena de custodia interna en el Laboratorio	TD2009LCOC	1.0	1º Enero de 2009
Límites mínimos requeridos para la detección de sustancias prohibidas	TD2009MRP	1.0	1º Enero de 2009
Guía de reporte y evaluación para testosterona (T), epitestosterona (E), la relación T/E, y otros esteroides endógenos	TD2004EAAS	1.0	Agosto 13 de 2004
Reporte de Norandrosterona	TD2004NAND	1.0	Agosto 13 de 2004
Medición de la incertidumbre para análisis de antidoping	-----	-----	En proceso

La administración de testosterona eleva el cociente de concentración urinaria de Testosterona/Epitestosterona debido al incremento de la concentración de testosterona y la disminución de epitestosterona; y es justificado en los equipos de

cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, (Dehennin L. et al., 1993), así como se ve aumentada la concentración de sus metabolitos. El cociente de concentraciones de Testosterona/Epitestosterona varía en un rango de 0.1 a 3.0 y en casos de valores mayores o iguales a 4, un reporte analítico adverso se establece de acuerdo a las reglas de la WADA, sin embargo este criterio por si solo no es suficiente para decir que existe una violación de dopaje.

Los compuestos derivados de plantas tienen menor  $^{13}\text{C}$  que sus homólogos endógenos, por lo tanto, los esteroides urinarios con una baja relación  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  son probablemente originados de fuentes farmacéuticas; (Cedric H. L. et al., 1997), mientras que los compuestos de referencia endógenos (ERCs, por sus siglas en inglés) no se ven afectados, esto queda comprobado por medio de un equipo IRMS.

Los ERCs son: el pregnanediol (PD),  $11\beta$ -hidroxiandrosterona (OHA),  $5\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol (16EN) o 11-Cetoetiocolanolona (CETO). La testosterona por si misma o sus metabolitos, androsterona (A), etiocolanolona (E).  $5\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol ( $5\alpha$ ) y  $5\beta$ -androstan-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol ( $5\beta$ ), funcionan como compuesto blanco (TC, por sus siglas en inglés). (Payne AH, et al., 2004).

La WADA ha establecido un mínimo de 3‰ de diferencia entre un ERC y un compuesto blanco. Estas diferencias son expresadas como valores  $\Delta$  basados en la siguiente ecuación:

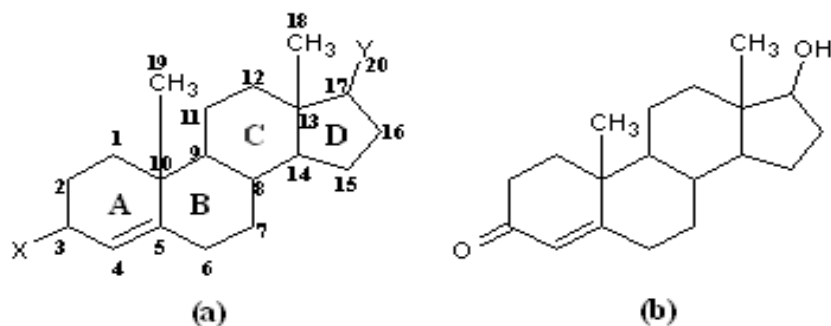
$$\Delta [\text{‰}] = \delta^{13}\text{C}_{\text{ERC}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{TC}}$$

Y la diferencia de 3‰ es valido para todas las posibles combinaciones de ERCs y TC.

## 5. QUÍMICA DE LOS ESTEROIDES

### 5.1. Aspectos Generales

Los esteroides anabólicos pueden ser considerados derivados sintéticos de la hormona masculina testosterona (T). La estructura general de este tipo de sustancias está basada en un núcleo perhidrociclofenantreno. **Figura No. 1.** Los átomos de carbono son numerados como se muestra en la **Figura No. 1a.** La mayoría de los esteroides anabólicos y sus metabolitos presentan un grupo hidroxilo o un grupo ceto en las posiciones C<sub>3</sub> y C<sub>17</sub>. Adicional a esto, presentan un doble enlace entre C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub> y dos grupos metilo en las posiciones C<sub>13</sub> y C<sub>10</sub>, a estos metilos les corresponde las posiciones C<sub>18</sub> y C<sub>19</sub> respectivamente. Como un ejemplo se muestra la estructura de la testosterona. **Figura No. 1b**



**Figura No.1:** (a) Estructura general de los esteroides anabólicos (b) Estructura de la testosterona.

Después de que la testosterona fue aislada en 1935, se descubrió que es virtualmente inactiva cuando se administra de forma oral. Después de la ingestión, la testosterona es adsorbida en el intestino delgado y pasa al hígado por la vena porta donde es rápidamente metabolizada, principalmente a compuestos inactivos. (Nieschlag E, et al. 1975), (Coert A, et al. 1975).

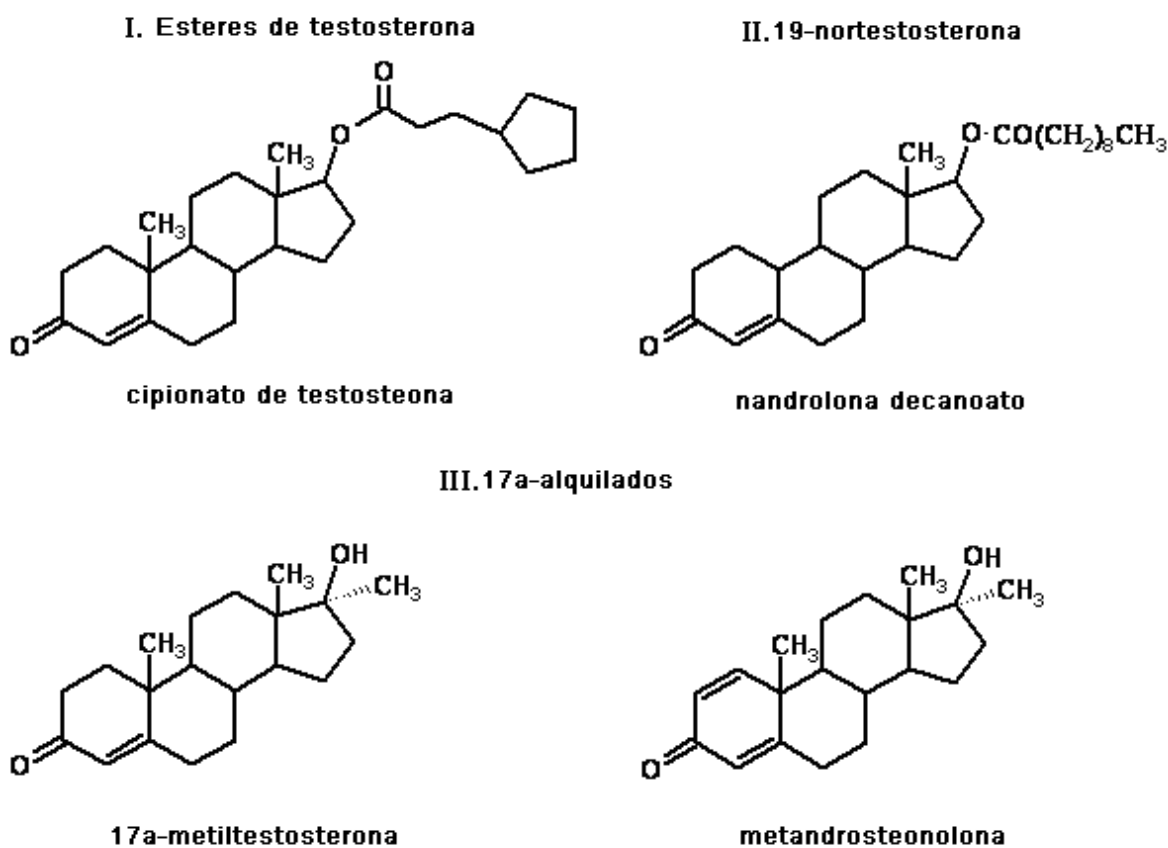
El descubrimiento de la testosterona ha dado lugar a la síntesis de esteroides anabólicos. Las modificaciones químicas realizadas han sido útiles para alterar farmacológicamente la potencia relativa anabólica-androgénica, disminuir la inactivación y cambiar el patrón del metabolismo. (Saudan C, et al., 2006), (Basaria S, et al., 2001), (Schanzer W, et al., 1990), (Shahidi NT. 2001).

Tres principales clases de esteroides anabólicos androgénicos (AAS; por sus siglas en inglés) han sido descritos:

La primera clase son derivados de la esterificación del grupo  $17\beta$ -hidroxilo de la testosterona. La esterificación retarda la degradación y prolonga la acción. Los ésteres de testosterona son hidrolizados a testosterona libre, reducidos a  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT), un andrógeno con elevada actividad biológica. (Ann S. et al., 2003). **Esquema No.1.**

La segunda clase son compuestos derivados androgénicos de la 19-nortestosterona. Estos compuestos presentan en conjunción con la adición de una larga cadena lateral, una sustitución de un hidrógeno por el grupo metil en el  $C_{19}$ . Este compuesto ha disminuido la actividad androgénica en comparación con la  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT). **Esquema No.1.**

La tercera clase de compuestos son aquellos que están alquilados en el C<sub>17</sub>. Debido a esta modificación hay un retraso en el metabolismo en el hígado y son oralmente activos. **Esquema No.1.**



**Esquema No. 1:** Estructuras químicas representativas de las tres principales clases de esteroides anabólicos androgénicos o AAS



### 5.2. Efectos de los esteroides anabólicos

Los efectos de la testosterona en el cuerpo pueden ser divididos en efectos androgénicos y efectos anabólicos. Por lo que el término “esteroides anabólicos androgénicos” o AAS es lo mas apropiado. Por simplicidad, la expresión “esteroides anabólicos” se usa dentro de esta tesis.

El efecto anabólico, está asociado con la construcción de proteína en músculo esquelético y en hueso. Los efectos anabólicos más importantes son el incremento de las dimensiones del cuerpo, la masa corporal magra y la fuerza. Por lo tanto es el deseo de los deportistas tener un mejor desempeño físico y una mejor apariencia. Una revisión detallada acerca de los efectos de anabolizantes esteroides en atletas fue realizada por Hartgens y Kuipers. (Hartgens F., et al., 2004).

Los efectos androgénicos de los esteroides anabólicos pueden ser considerados asociados con la masculinización. Por lo tanto, en fetos de sexo masculino, los andrógenos estimulan el desarrollo de los genitales externos masculinos y durante la pubertad estimulan el crecimiento de los testículos y glándulas reproductoras masculinas. Además, también son responsables de las características sexuales secundarias, tales como la ampliación de la laringe (causa de un engrosamiento de la voz), el crecimiento de pelo terminal (en el pubis, regiones axilar y facial), un aumento de la actividad de las glándulas sebáceas (que conducen al acné) y efectos sobre el Sistema Nervioso Central (libido y aumento de la agresión). Lógicamente, los efectos androgénicos son indeseables para los atletas que consumen esteroides. (Kicman A. T., 2008).

### 5.3. Los esteroides en los análisis de dopaje

Los esteroides anabólicos no fueron incluidos en la primera lista de sustancias prohibidas publicada por el COI en 1967. No fue hasta 1976, antes de los Juegos Olímpicos de Montreal que se incluyeron como un nuevo grupo. Desde entonces, los esteroides anabólicos son los compuestos mas detectados en los análisis de dopaje. En el año 2007, los agentes anabólicos fueron el grupo con el número más alto de reportes analíticos adversos (RAA). **Tabla No.3.**

**Tabla No. 3:** Reportes analíticos adversos reportados por los laboratorios acreditados por la WADA en el año 2007.

Grupo de sustancias		% Reportes adversos
S1	Agentes anabólicos	47.9
S6	Estimulantes	16.4
S8	Cannabinoides	11.9
S3	$\beta$ – 2 Agonistas	8.2
S5	Diuréticos y otros agentes enmascarantes	7.4
S9	Glucocorticoides	5.9
S2	Hormonas y sustancias relacionadas	0.8
P2	$\beta$ -Bloqueadores	0.6
S7	Narcóticos	0.4
S4	Agentes con actividad anti-estrogénica	0.4
M1	Acarreadores de oxígeno	0.1
M2	Manipulación física y química	0.1

Para asegurar que todos los laboratorios acreditados puedan reportar la presencia de una sustancia prohibida de una manera uniforme, la WADA estableció un mínimo de detección de rutina para los métodos de ensayo. Estos niveles de detección se conocen como Nivel Mínimo Requerido de Rendimiento (*Minimum Required Performance Level*, MRPL).

(WADA Technical Document TD2004MRPL version 1.0, (2010) released at [http://wada-ama.org/rtecontent/document/pref\\_limits\\_2.pdf](http://wada-ama.org/rtecontent/document/pref_limits_2.pdf)).

El Nivel Mínimo Requerido de Rendimiento varía dependiendo de la sustancia en un rango de 1-500 ng/mL. Los esteroides anabólicos son los que tienen los valores más bajos de MRPL de todas las sustancias prohibidas. Dichos valores para este tipo de sustancias, así como de sus metabolitos son de 10 ng/mL, mientras que para algunos esteroides en específico tales como el metabolito de la metandienona (17 $\beta$ -metil-5 $\beta$ -androst-1-ona-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -diol), el metabolito de la metil testosterona (17 $\alpha$ -metil-5 $\beta$ -androstano-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol) o el metabolito del estanozolol (3-hidroxitanozolol), el valor de MRPL se fija a 2 ng/mL.

Por lo tanto, los laboratorios de control del dopaje deben tener desarrollados métodos sensibles para la detección de esteroides anabólicos y de sus metabolitos. Para este propósito, se requieren técnicas más avanzadas.

La sensibilidad no es la única dificultad para la detección de esteroides anabólicos para laboratorios de control de dopaje. Si bien la detección de cualquier rastro de un esteroide exógeno es suficiente para informar de un hallazgo analítico adverso, es más difícil detectar el mal uso de esteroides anabólicos endógenos. Esto puede ser una de las razones del uso prolongado de la testosterona a pesar de su menor actividad en comparación con los esteroides exógenos. (Kicman A. T., 2008).

En el caso de los esteroides endógenos, la presencia de la sustancia por sí sola no puede considerarse suficiente para informar de un hallazgo analítico adverso. Con el fin de detectar el mal uso de los esteroides endógenos, los laboratorios de control de dopaje deben diferenciar entre la producción endógena y la fuente exógena. Un valor de corte para la testosterona no se puede utilizar debido a la amplia gama de concentraciones detectadas en la población. (Saugy M., et al., 2000). Sin embargo, el consumo de testosterona causa cambios característicos en el patrón de los esteroides urinarios. El cociente entre las concentraciones de testosterona y epitestosterona (T/E) se utiliza habitualmente como indicador de estos cambios.

La epitestosterona, 17  $\alpha$ -epímero de la testosterona, es sólo un metabolito menor en el metabolismo de la testosterona y se mantiene prácticamente constante después de la ingesta de testosterona. Por lo tanto, el cociente entre las concentraciones de testosterona y epitestosterona (T/E) es afectada por la ingesta de testosterona y la medición de este índice es la forma comúnmente usada por los laboratorios para detectar el uso indebido de testosterona. Sin embargo, este cociente de concentraciones de T/E presenta algunas limitaciones. En primer lugar algunas personas (las deficientes en el gen UGT2B17) tienen valores muy bajos de la relación Testosterona/Epitestosterona. Además, la presencia de valores anormales de la relación Testosterona /Epitestosterona no puede ser considerado como confirmación definitiva del mal uso de testosterona. A tal efecto se necesita la medición por espectrometría de masas, de la relación entre los isótopos estables del carbono  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ .

Al igual que la testosterona y la epitestosterona, otros esteroides endógenos pueden ser cuantificados. Esta cuantificación (llamada perfil esteroideal) se considera como una de las herramientas más versátiles e informativas en la

detección de esteroides endógenos dado que la ingesta de estos esteroides cambia uno o más parámetros del perfil de esteroides urinarios. (Mareck U., et al., 2008).

Varios esteroides endógenos y metabolitos normalmente se incluyen en el perfil de esteroides como testosterona, epitestosterona, 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, androsterona, eticolanolona, dehidroepiandrosterona, androstenediona, 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol; 5 $\beta$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol; 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol; 11 $\beta$ -OH-androsterona y 11 $\beta$ -OH-eticolanolona, aunque la adición de otros metabolitos también ha sido descrita. (Mareck U., et al., 2008), (Van Reterghem P., et al., 2008).

Una causa de preocupación actual es la producción de análogos de los esteroides anabólicos, llamados prohormonas, que desde 1996 están legalmente disponibles en el mercado de nutrición deportiva en los EE.UU.

#### **5.4. Biosíntesis de las hormonas de las glándulas 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.

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 No. 2** estos dos esteroides son convertidos en toda una gama de hormonas activas en el retículo endoplasmico y las mitocondrias mediante oxigenasas y deshidrogenasas especificas que requieren de oxígeno molecular y NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato). 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, M. R. 1984).

### 5.5. 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. Las reacciones predominantes son divididas como reacciones de fase I y de fase II. En este apartado comentaremos brevemente este tipo de reacciones.

Un gran número de sustancias extrañas (xenobióticos) penetran a nuestro organismo 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).

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 sistema P-450 requiere oxígeno molecular y NADPH para oxidar el sustrato. 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).

Las reacciones de biotransformación de fase II abarcan la glucuronidación, 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 el metabolismo de los esteroides anabólicos, principalmente son excretados como conjugados glucuronidos o sulfónicos.

### **5.6. Biotransformación de la testosterona**

El principal objetivo de los métodos de cribado para el control del dopaje de los esteroides anabólicos es detectar el abuso de estas sustancias de la forma más específica y por el periodo más largo posible. La detección en orina del compuesto padre puede ser muy específica, pero debido a que los esteroides son ampliamente metabolizados, el compuesto padre puede ser detectado en orina por un corto tiempo después de la administración en la mayoría de los casos. La presencia de algunos metabolitos es normalmente detectada por un periodo más largo. Por esta razón, la detección de metabolitos específicos es preferida para el cribado de los esteroides anabólicos. (Schänzer W., 1996).

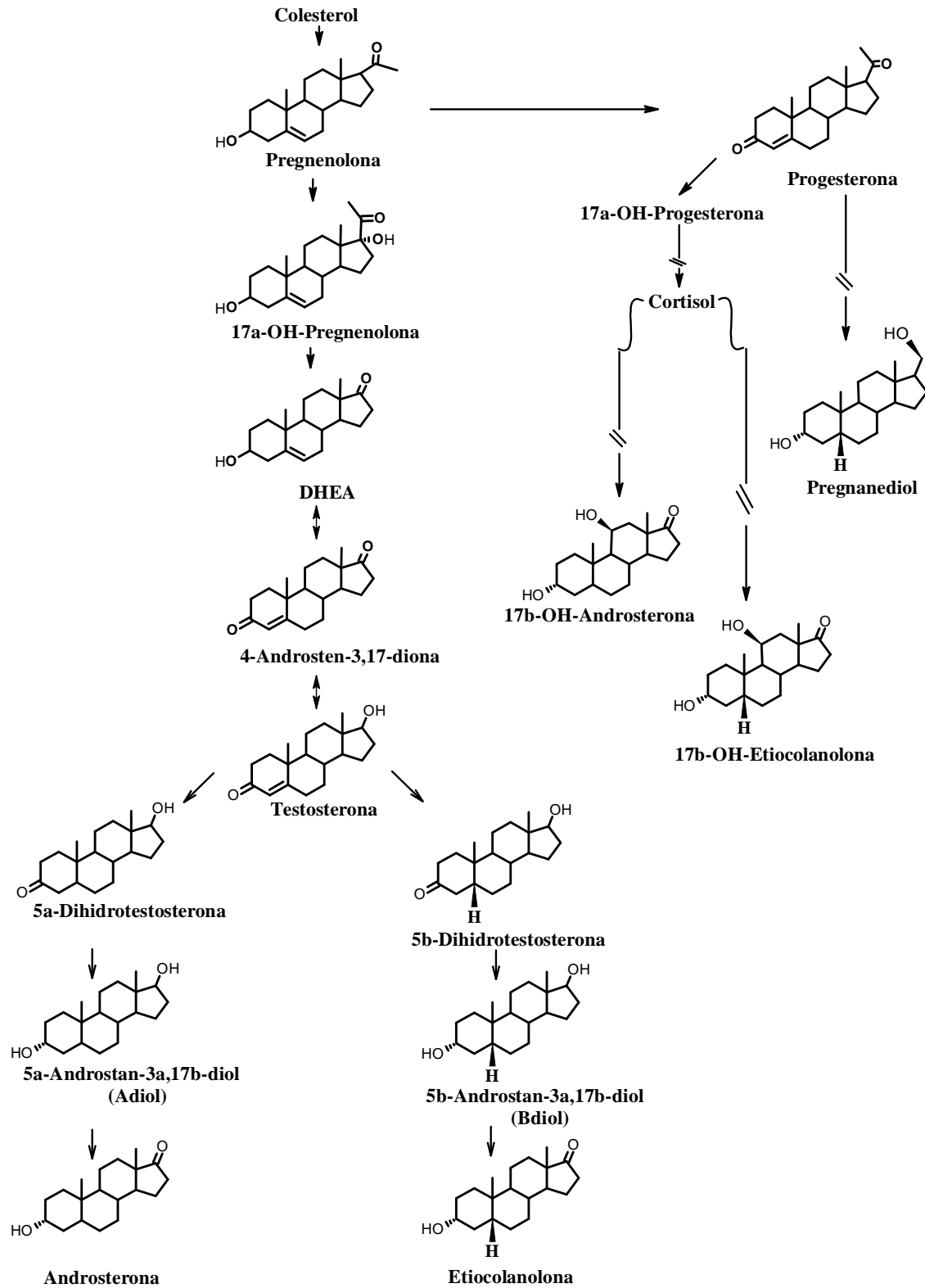
El principal metabolismo de los andrógenos es en el hígado, ya que es extremadamente rico en enzimas catabólicas esteroideas, aunque el catabolismo de esteroides androgénicos extrahepático también puede ser significativo, como es el caso del 5 $\alpha$ -androstenediol y su conjugado glucuronido. (Toscano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

La testosterona es sujeta a un metabolismo de fase I, involucrando la oxidación del grupo 17-hidroxi a androstenediona, la reducción del anillo A para generar la 5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -androstenediones y mediante la acción de las 3 $\alpha$ - y 3 $\beta$ -hidroxiesteroides deshidrogenasas para formar los metabolitos tetrahidro-17-oxosteroides, androsterona y eticolanolona, los principales metabolitos de la testosterona. Los isómeros 5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -androstano-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -androstenedioles son los metabolitos minoritarios de la testosterona y una porción muy pequeña es convertida a estradiol. (Brooks RV., 1975). **Esquema No. 2.**

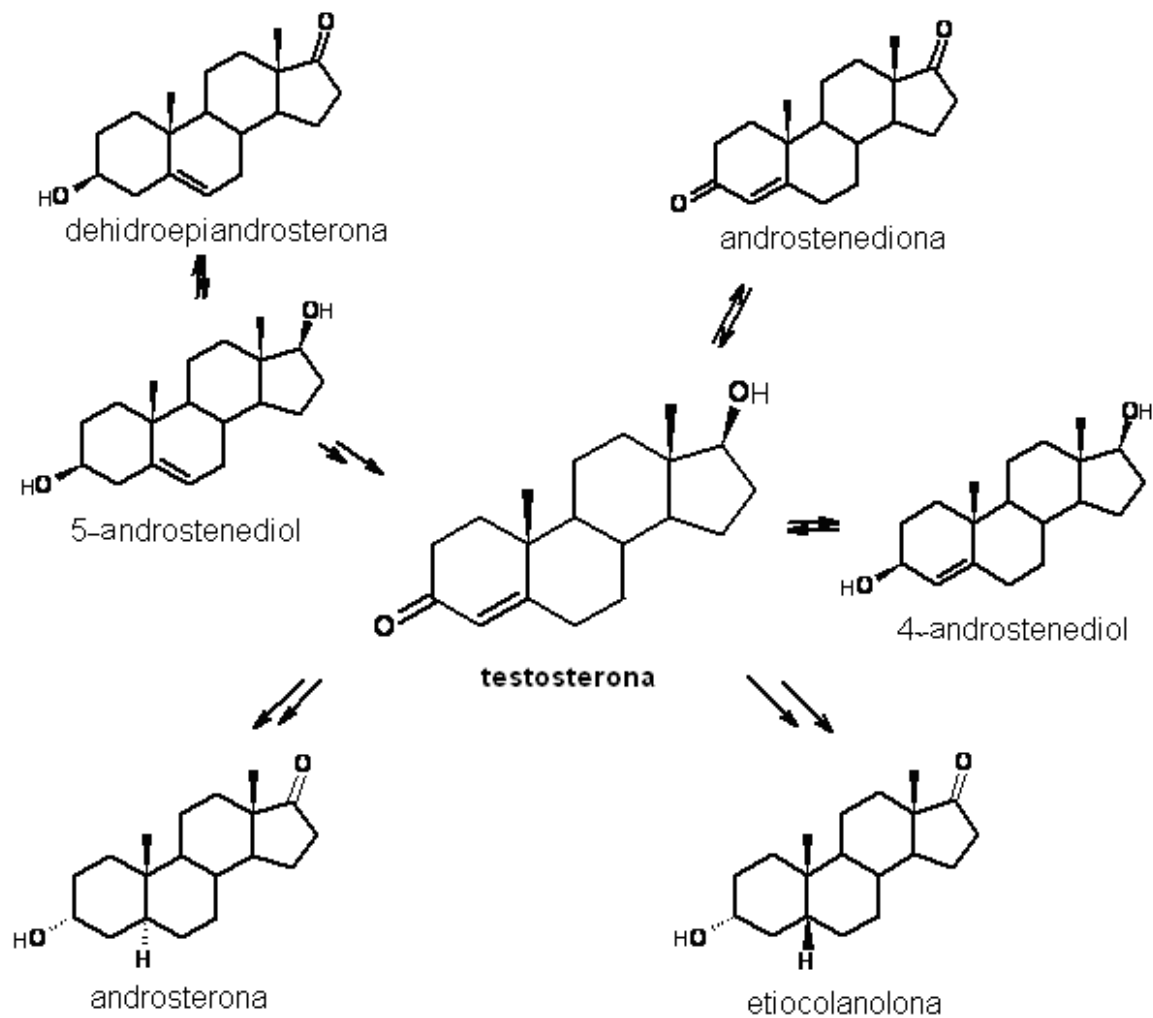
### 5.6.1. Prohormonas de la testosterona

La síntesis química de esteroides endógenos, conocidos como dehidroepiandrosterona, [(DHEA); androst-5-ene-3 $\beta$ -ol-17-ona], androstenediona (ADIONE; androst-4-ene-3,17-diona), 4-androstenediol (4-ADIOL; androst-4-ene-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol), 5-androstenediol (5-ADIOL; androst-5-ene-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol) y testosterona son química y farmacológicamente idénticos a sus análogos endógenos. **Esquema No. 3.** La excreción de estos compuestos en la orina de los atletas no es prueba de su administración. (Cawley, A.T., et al., 2008). Para conocer el cambio en los esteroides endógenos, el análisis de la relación isotópica de los carbonos estables ( $\delta^{13}\text{C}$ ) de los esteroides urinarios debe realizarse para satisfacer los requerimientos medico legales que demanda el control del dopaje.





Esquema No. 2: Biosíntesis de los esteroides endógenos.



**Esquema No. 3:** Metabolismo de la testosterona y de sus precursores.

## 6. MÉTODOS INSTRUMENTALES

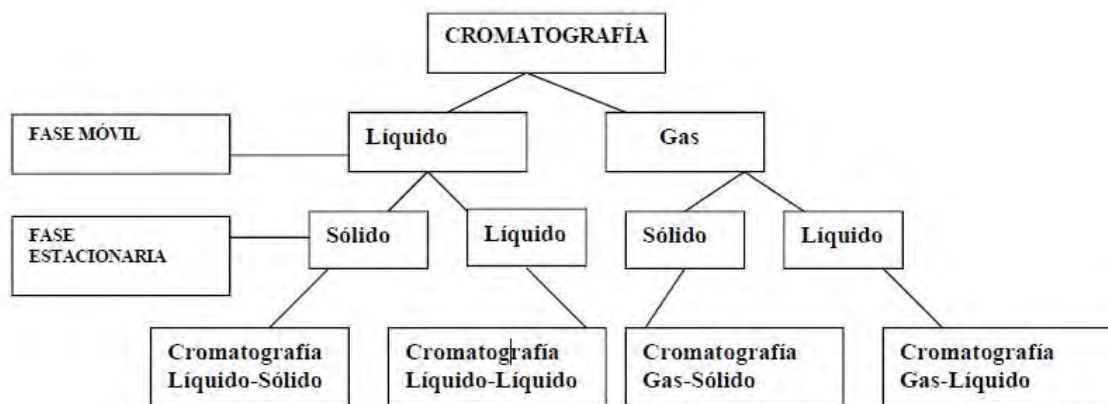
### 6.1. Técnicas Cromatográficas

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 más usadas en los laboratorios de control y prevención del dopaje son: la extracción en fase sólida (EFS-SPE), la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC/MS) y la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas en tándem (GC/MS/MS), así como el espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (GC/C/IRMS). (Klaus M., et al., Institute of doping Analysis and Sports Biochemistry, Germany, 1-11).

#### 6.1.1. 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, gas o fluidos supercríticos) y retenidas selectivamente por la fase estacionaria (sólidos o líquidos).

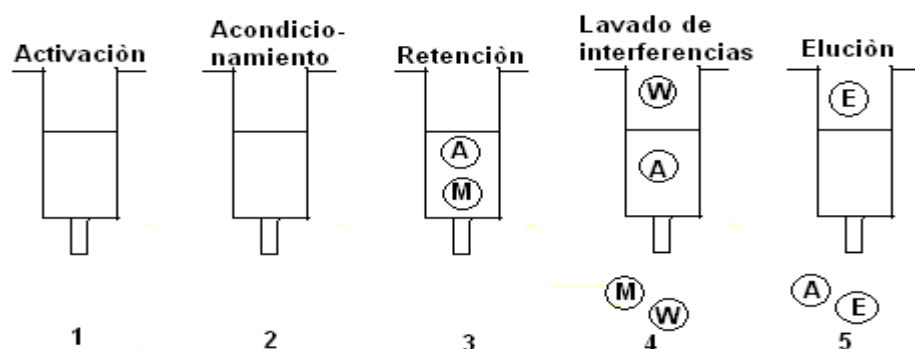
En función de la fase móvil, la cromatografía se divide principalmente en cromatografía de líquidos (LC) y cromatografía de gases (GC). (R.A. Day, et., al, 1989). **Esquema No. 4.**



**Esquema No. 4:** Clasificación general de la cromatografía.

## 6.2. Extracción en fase sólida (EFS-SPE)

La Extracción en Fase Sólida es una potente y simple técnica de limpieza de muestras que es, al mismo tiempo rápida y económica. Una columna de extracción de fase sólida consiste en un lecho de adsorbente de partículas gruesas mantenido entre dos discos porosos en un tubo desechable. La extracción en fase sólida 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 la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), en las que el componente de interés resulta retenido en una fase sólida mientras que los contaminantes de la matriz se eluyen. (Meyer, V. R., 1988). Un método típico de EFS-SPE se organiza en cinco pasos. **Figura No. 2.**



**Figura No. 2:** Procedimiento para la extracción en fase sólida (EFS-SPE).

**1. Activación:** 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 EFS 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 EFS. Para maximizar las interacciones la muestra (A=analitos + M=matriz) deben cargarse en el adsorbente de EFS 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 EFS mientras que la matriz y los contaminantes deben eluirse y descartarse.

Durante las etapas 1-3, el adsorbente EFS 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 EFS 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 EFS hasta que no se use un mayor porcentaje de disolvente orgánico. Las impurezas se eliminan con un adecuado eluyente de lavado (W). El adsorbente de EFS 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 EFS y la interacción analito-adsorbente determinan el eluyente final de elución.

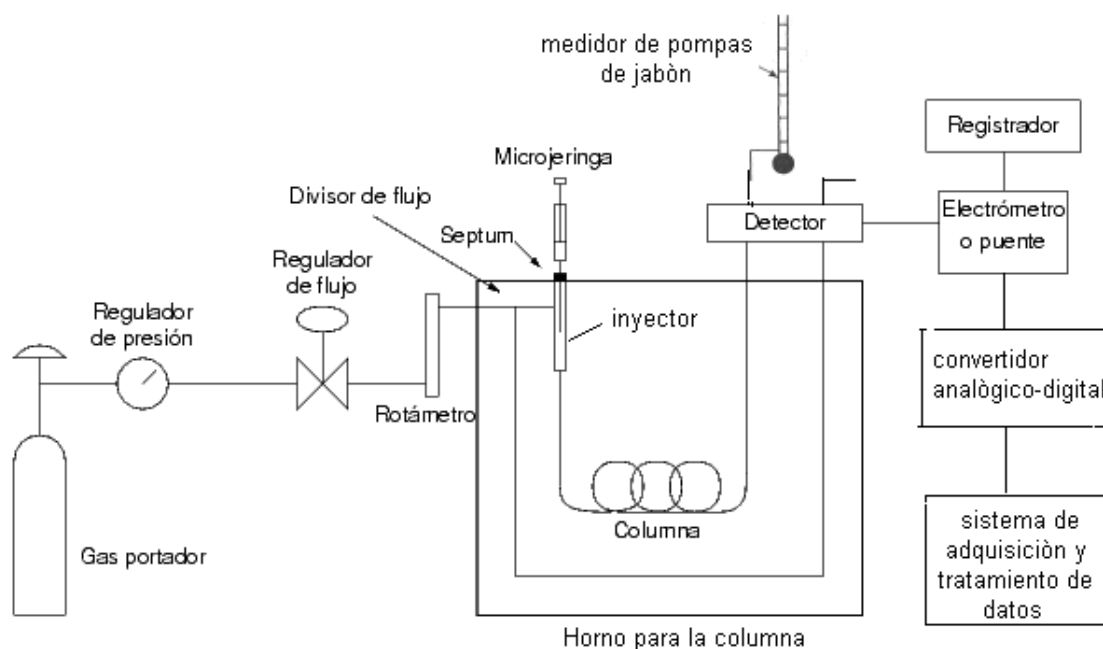
### **6.3. La cromatografía de gases (GC)**

La cromatografía de gases es un método de separación basado en el equilibrio de distribución y elución de una muestra 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 interactúan los analitos en la fase estacionaria.

La muestra, que puede ser líquida, sólida o gas se introduce en el equipo a través del inyector, donde es vaporizada obligatoriamente y es llevada hacia la columna mediante el gas acarreador ( $N_2$ ,  $H_2$  ó  $He$ ).

Un cromatógrafo de gases consiste básicamente en: un inyector split/splitless, la columna capilar (que se encuentra dentro de un horno), 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).

**Figura No.3.**



**Figura No. 3.** Componentes principales del Cromatógrafo de Gases.

La desventaja de la cromatografía de gases es que no es posible saber la estructura o la masa molecular de los compuestos que presentan una señal en el cromatógrama, 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.

### 6.3.1. El proceso cromatográfico

En la **Figura No. 4** se muestra una representación del proceso cromatográfico. Las líneas horizontales representan la columna, cada línea representa un momento en específico, crecientes en el tiempo de arriba hacia abajo, en un primer tiempo la muestra compuesta por los componentes A y B, se introduce en la columna y es entonces cuando es acarreada a través de la columna (de derecha a izquierda) por la fase móvil.

Cada componente se distribuye en las dos fases, como se muestra en los picos de distribución por encima y debajo de la línea. Los picos por encima de la línea representan la cantidad de un componente en particular en la fase móvil, y los picos por debajo de la línea representan la cantidad en la fase estacionaria.

El componente A tiene mayor distribución en la fase móvil y en consecuencia es llevado al final de la columna mucho más rápido que el componente B, el cual pasa más tiempo en la fase estacionaria. 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 cromatógrama, que se muestra en el lado derecho de la figura. (. McNair H. M., et al., 2009).



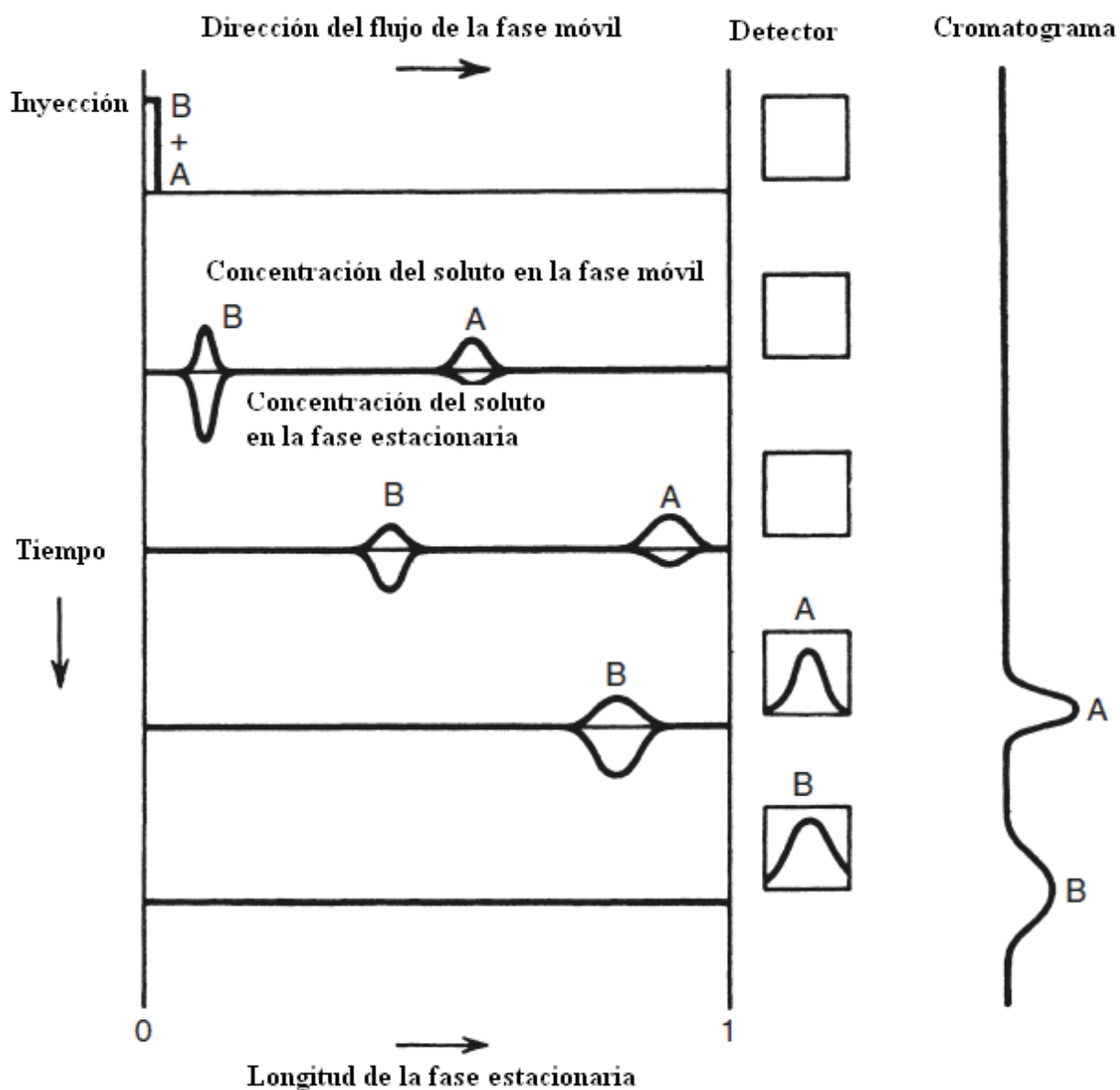


Figura No. 4: El proceso cromatográfico.

#### 6.4. La espectrometría de masas (MS)

El análisis de compuestos orgánicos mediante la espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) 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, subsecuentemente se separan estos iones en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ) y finalmente se mide 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. (Meier-Augenstein W., 1997). 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 No. 5.**

Existen diferentes métodos de ionizar la muestra, solo por mencionar algunos encontramos:

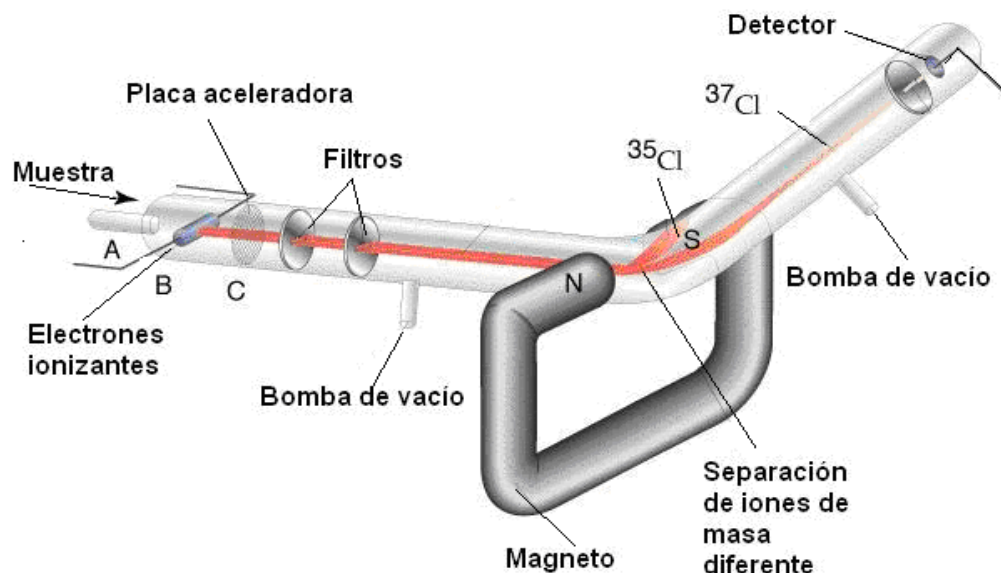
- Impacto electrónico (EI)
- Ionización química (CI)
- Desorción de campo (FD)
- Ionización por electrospray
- Bombardeo con átomos rápidos (FAB)

Dado que en el laboratorio solo se usa el impacto electrónico, para ionizar la muestra abordaremos brevemente el fundamento de este método.

**Ionización por impacto electrónico:** es el método frecuentemente más empleado para la ionización de moléculas orgánicas. La fuente de iones normalmente se mantiene a una presión entre  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  Pa para reducir las interacciones intermoleculares. (T. Niwa., 1995).

Las moléculas gaseosas de la muestra que entran en la fuente de iones de un cromatógrafo de gases o una sonda de inserción directa se ionizan por la interacción con un haz de electrones de alta energía emitida por un filamento caliente (frecuentemente de tungsteno o renio). Los electrones emitidos por el filamento son acelerados a través de un potencial de 70 eV, cuando las moléculas de gas neutro interactúan con este rayo de electrones, un electrón (con mayor frecuencia un electrón no enlazante) es eliminado de la molécula con la deposición simultánea de  $>100$  Kcal. de energía interna y se genera la producción de un catión radical molecular; este se trata del ion molecular. Como este exceso de energía interna es distribuido al ión molecular, la suficiente excitación se depositará en grados de libertad de vibración, para generar el rompimiento de enlaces. Esto resulta en la producción de iones cargados y neutros provenientes del ion molecular, dentro de la fuente de iones. Los iones positivos son el resultado habitual del proceso de la ionización por impacto electrónico. (T. Niwa., 1995).

El patrón de fragmentación variará con la energía de los electrones de bombardeo. Un valor de 70 eV ha sido elegido empíricamente como la energía de rutina para el impacto electrónico, ya que la eficiencia de ionización se encuentra a lo largo de una meseta a esta energía de electrones, la energía suficiente se transfiere a la molécula para producir iones fragmento de diagnóstico. (T. Niwa., 1995).



**Figura No. 5.** Principales componentes de un espectrómetro de masas.

Tomado de: <http://depa.fquim.unam.mx/representaciones/imagenes/Aston.JPG>

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 espectrometría de masas puede cuantificar trazas de moléculas orgánicas con límites de detección de attomol ( $10^{-18}$  mol). (Niwa, T., 1995).

Adicional a esto, el análisis mediante la espectrometría de masas se puede escoger 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).

### **6.5. El acoplamiento de la cromatografía de gases a espectrometría de masas (GC/MS)**

La ventaja de los métodos cromatográficos consiste en que permite 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 de gases, 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).

## 7. COMPONENTES Y FUNCIONAMIENTO DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE RELACIONES ISOTÓPICAS (IRMS)

### 7.1. Cromatografía de gases

La GC usada para el acoplamiento de GC/C/IRMS es la misma que se usa en el equipo GC/MS. La columna y las condiciones instrumentales deben ser las mismas que se usaron en el equipo de GC/MS para hacer posible la comparación de los cromatogramas obtenidos en los dos instrumentos. (Meier-Augenstein W, et al., 1996).

En el IRMS un GC no puede ser acoplado directamente ya que la muestra tiene que ser convertida a CO<sub>2</sub>, en el caso del análisis de la relación <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C, lo que ha llevado al desarrollo de una interfase de combustión, en donde se introducen los componentes que han sido separados mediante GC en un reactor de combustión. En la **Figura No. 6** se muestran los componentes del equipo de cromatografía de gases con celda de combustión acoplado a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas.

### 7.2. La interfase de combustión

La interfase de combustión tiene dos componentes:

- Una interfaz controlado por un termostato que permite una conexión entre el horno del GC y el modulo que contiene el horno.
- El modulo que contiene el horno de combustión es un recinto con termostato cuya temperatura se regula de 850 a 940° C.

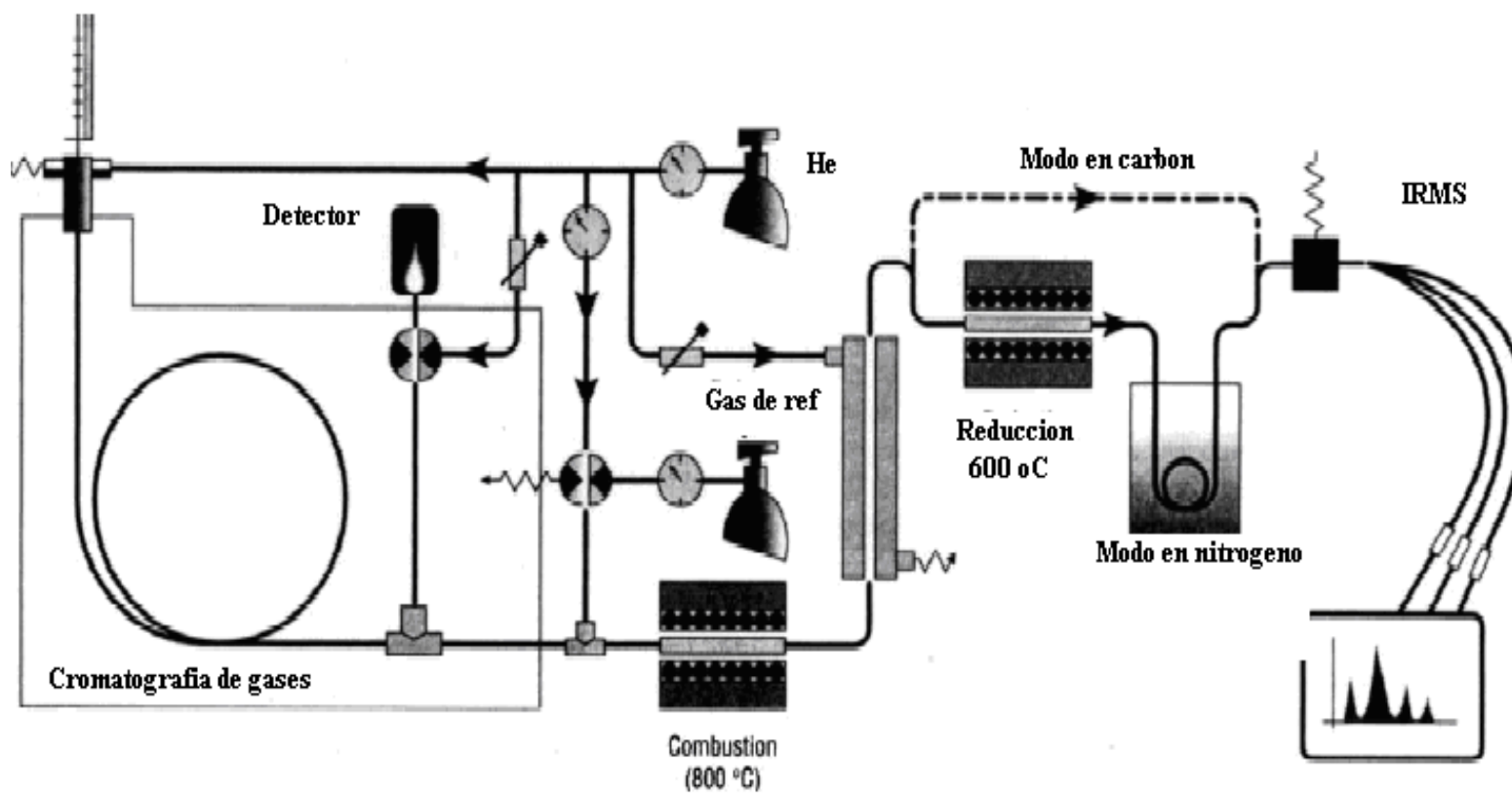
El horno de combustión es un tubo de cuarzo o cerámica. Dicho tubo puede estar lleno de gránulos de óxido de cobre y bloqueado en el extremo del tubo por un hilo de lana de plata, o puede estar relleno por dos cables trenzados de platino y cobre, respectivamente. El óxido de cobre posee la propiedad de ser capaz de liberar oxígeno a altas temperaturas, lo cual es esencial para la combustión. Los compuestos son entonces instantáneamente quemados y transformados en  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . (Fourcroy L.J., 2009).

### 7.3. La trampa de agua

El agua formada durante el proceso de la combustión del horno debe ser eliminada de modo de que ninguna traza de agua se introduzca en la fuente del espectrómetro de masas. De hecho, cantidades traza de  $\text{H}_2\text{O}$  podría llevar a la protonación del  $^{12}\text{CO}_2$  para generar  $\text{H}^{12}\text{CO}_2$ , el cual podría interferir con la medición del  $^{13}\text{C}$  (interferencias isobáricas). Existen dos formas de eliminar esta agua: el colector de agua criogénica o trampa criogénica y mediante la membrana de Nafión.

La trampa criogénica consiste de un vaso de Dewar, que es un contenedor resistente a bajas temperaturas, relleno con nitrógeno líquido, dentro del cual el agua es atrapada.

La membrana de Nafión (un polímero fluorado), es una membrana hidrofílica que de manera selectiva absorbe el agua de la corriente de gas que está circulando. El agua es expulsada a través de la membrana por osmosis y se evacua mediante la circulación del gas auxiliar (He). (Fourcroy L.J., 2009).



**Fig. No. 6.** Componentes del equipo de cromatografía de gases con celda de combustión acoplado a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (GC/C/IRMS).



#### 7.4. Funcionamiento del espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (IRMS).

El fundamento del IRMS (*Isotope Ratio Mass Spectrometers*), es el mismo que el de un espectrómetro de masas común y los componentes son los mismos. En el IRMS las moléculas gaseosas de  $\text{CO}_2$  son ionizadas a  $\text{CO}_2^{+0}$ . Los iones formados tienen una relación  $m/z$  de 44, 45 y 46.

En relación al analizador de masas, este está compuesto por un sector magnético de baja resolución con una geometría asimétrica de  $90^\circ$ . Con esta geometría particular, todas las masas son separadas y enfocadas al mismo tiempo.

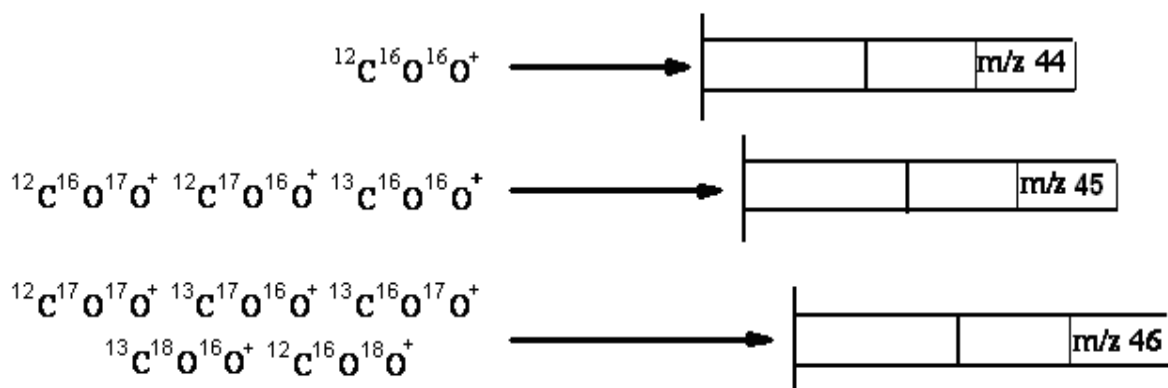
El detector de masas consiste de algunos colectores llamados copas de Faraday; cada una de estas copas colecta solo una masa dada. Para la determinación de las relaciones isotópicas del carbono, tres copas son suficientes: para la masa 44, para la masa 45 y para la masa 46. **Figura No. 7.**

En la **Tabla No. 5** se muestran las abundancias relativas de los isótopos del carbono y oxígeno medidos en los análisis de esteroides. En esta tabla podemos deducir las relaciones de las abundancias relativas de los picos isotópicos obtenidos del  $\text{CO}_2$  analizado (relación  $m/z$  de 44, 45 y 46).

**Isotopos Estables**

$^{12}\text{C}$ mayoritario	$^{16}\text{O}$ mayoritario
$^{13}\text{C}$ minoritario	$^{17}\text{O}$ minoritario
	$^{18}\text{O}$ minoritario

**Deteccion en las copas de Faraday**



**Figura No. 7:** Iones isótopomeros del  $\text{CO}_2$  colectados en las copas de Faraday para la relación m/z 44, 45 y 46.

**Tabla No. 5:** Abundancias relativas del carbono y del oxígeno.

Isótopo	% Abundancia Relativa
$^{12}\text{C}$	100
$^{13}\text{C}$	1.1
$^{16}\text{O}$	100
$^{17}\text{O}$	0.04
$^{18}\text{O}$	0.2

m/z 44: 100%

m/z 45:  $(1.1 + 0.04 + 0.04) = 1.18\%$

m/z 46:  $0.2 + 0.2 + (0.04 \times 0.04) + (1.1 \times 0.04) + (1.1 \times 0.04) = 0.49\%$

#### 7.4.1. Introducción de un gas de referencia

Una muestra de referencia de relación isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  de  $\text{CO}_2$  es inyectada para determinar la desviación isotópica de los compuestos comparados con un estándar de referencia; VPDB ( $^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ ). Estas mediciones proporcionan la información de la abundancia isotópica del analito respecto a la relación isotópica del estándar o del gas de referencia. Esto se hace para compensar los efectos discriminativos de masa que pueden fluctuar con el tiempo y de instrumento a instrumento.

### 7.5. Usos del GC/C/IRMS

Para poder hacer una comparación sobre la adulteración y/o el origen de una sustancia se ha utilizado el equipo de GC/C/IRMS, un ejemplo muy claro es la adulteración de la miel, en donde se realizó un nuevo procedimiento para determinar las proporciones isotópicas individuales de los componentes de la miel (sacarosa, glucosa y fructuosa) y con este estudio determinar la autenticidad de la miel ya que puede ser adulterada con altas cantidades de fructuosa. (Caballero, et al., 2006). Como se muestra en la **Tabla No. 6** y en la **Figura No. 8** son pequeñas diferencias que pueden ser usadas para determinar la autenticidad de una muestra. En este sentido han sido numerosos los trabajos realizados en esta materia para determinar el origen de una muestra como fragancias y aromas. (Bernreuther A., et al., 1990), vinos y jugos de fruta. (Scmidt, H.L. M. et al., 1993), Geoquímica. (Jones D.M, et al 1991), (Hauke V., et al., 1992), (Moers M.E.C., et al., 1993), Arqueología. (Evershed R.P., et al., 1994), Química Ambiental. (Zeng Y.Q., et al., 1994).

**Tabla No. 6:** Rangos de las diferencias isotópicas para moléculas orgánicas.

<b>Molécula Orgánica</b>	<b>Composición isotópica (<math>\delta\text{‰}</math>)</b>
Animales	-15 a 40
Plantas C3	-22 a 40
Plantas C4	-8 a 20
Gas natural	-30 a 50
Carbón	-25 a 30
Petróleo	-25 a 30

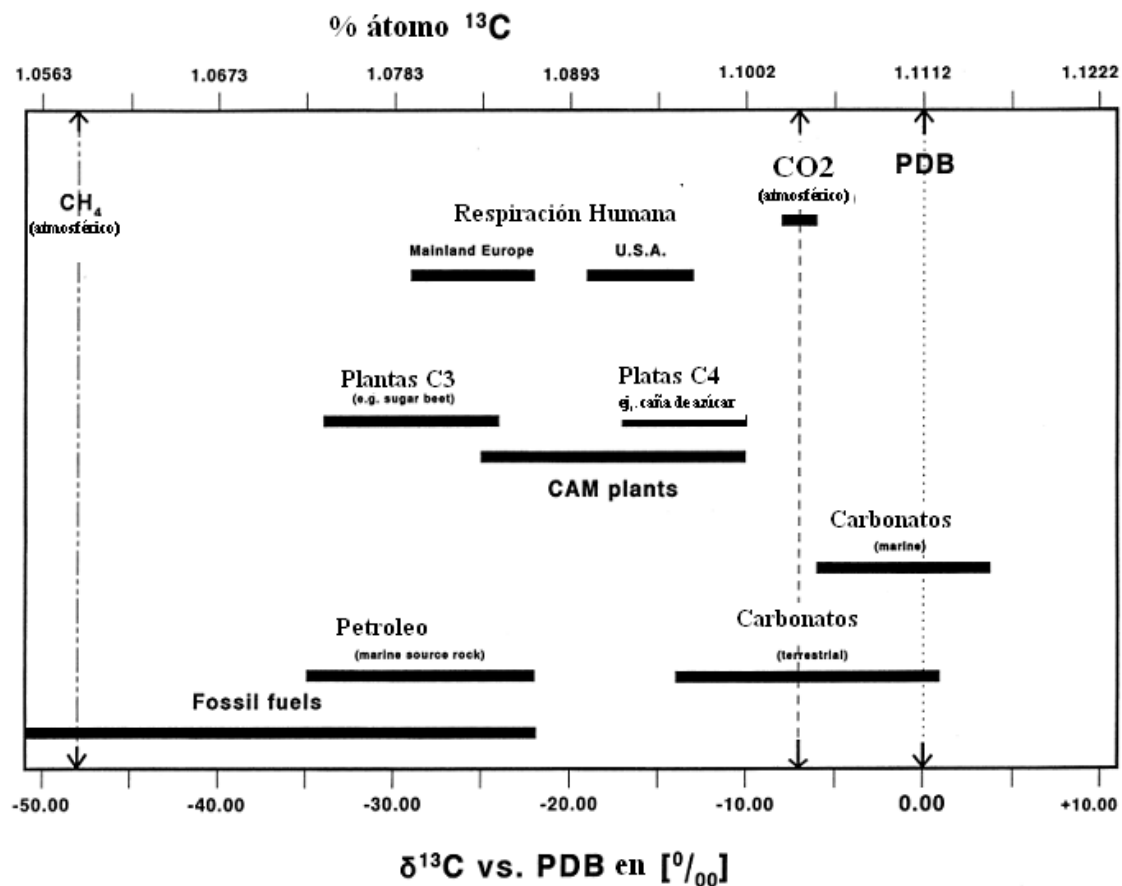


Figura No. 8: % de  $^{13}\text{C}$  en diversos componentes.

## 8. LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE RELACIONES ISOTÓPICAS (IRMS)

Con el paso del tiempo diferentes tecnologías han sido implementadas para realizar todo tipo de análisis usando la espectrometría de composición elemental en los campos de la proteómica y la metabolómica. Sin embargo, esta fuera de este proyecto de tesis cubrir todos los instrumentos o tecnologías, por lo que nos limitaremos a la espectrometría de masas de relación isotópica (IRMS). Mediante esta técnica se puede llevar a cabo el análisis de los isótopos estables de los principales elementos ligeros de la biosfera (C, H, N, O, S). La espectrometría de masas de relación isotópica permite el análisis de relaciones isotópicas de estos elementos ligeros ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , D/H,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ,  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ ) con la precisión y la exactitud necesarias para medir las pequeñas variaciones en la abundancia isotópica (fraccionamiento), provocadas por múltiples procesos naturales, tanto físicos como químicos. Estos elementos que tienen una gran importancia desde el punto de vista biológico y geológico, presentan dos o más isótopos estables, de los cuales el más ligero es el más abundante. No obstante, para establecer los criterios de este instrumento, debemos tratar algunos temas importantes antes de examinar esta técnica con mayor profundidad. Estos temas abarcan la definición de átomo, isótopo, la fotosíntesis y otros procesos cíclicos naturales.

### 8.1. Definición de átomo

En química y física, un átomo del Griego átomos, significa “la partícula más pequeña de materia que es indivisible, es decir, algo que no puede ser dividido”. (Platzner IT, et al., 1997).

Un átomo consiste de un núcleo denso de partículas cargadas positivamente llamadas protones y de partículas eléctricamente neutras llamadas neutrones, rodeado por una nube más grande de electrones de carga negativa. Por lo tanto, un átomo es eléctricamente neutro dado que contiene el mismo número de protones que de electrones.

El número de protones en un átomo define el elemento químico al cual pertenece, sin embargo, el número de neutrones determina el isótopo del elemento, como veremos más adelante.

### **8.1.1. Definición de “isótopo”**

Para poder definir el concepto de un isótopo, es importante conocer que la masa atómica (A) de un átomo es definida por el peso del número de protones y neutrones que contiene en su núcleo. Los electrones no son tomados en cuenta para el peso, ya que como es conocido su masa es 2000 veces menor que la de los protones. (Coplen TB., 1984). Los átomos son muy ligeros en su peso; un átomo de oxígeno pesa solo  $2.7 \times 10^{-23}$  g. Dado que tal número es muy impráctico de usar, los químicos usaron en su lugar una unidad basada en un átomo estándar de referencia, el carbón de masa 12, el cual se escribe como  $^{12}\text{C}$ .

Otro concepto sobre un átomo es su número atómico, el cual corresponde a el número de protones (que es igual al número de electrones), denominado como Z. (Coplen TB. 1996).

Debido a que la masa atómica está determinada por la suma del número de protones y neutrones contenidos en su núcleo, dos átomos por decir carbono deben de tener diferente número de neutrones y por lo tanto diferente masa, son referidos como isótopos de carbono.



Por ejemplo, el carbono-12 y carbono-13 son referidos como diferentes isótopos del carbono ya que el  $^{13}\text{C}$  tiene un neutrón extra en su núcleo. Ya que ambos átomos contienen el mismo número de protones (y por lo tanto de electrones), los isótopos tienen las mismas propiedades químicas. Sin embargo, las propiedades nucleares y atómicas de los isótopos pueden ser diferentes. Los niveles energéticos electrónicos de un átomo dependen de su masa nuclear. Por lo tanto, los correspondientes niveles atómicos de los isótopos están ligeramente desplazados unos de otros.

Desde la construcción de la tabla periódica de los elementos iniciada por Mendeleev, más de 120 elementos han sido confirmados desde entonces. De estos, 81 elementos tienen al menos un isótopo estable, sin embargo, el resto solo existe en la forma de nucleidos radioactivos. Algunos de estos nucleidos ( $^{115}\text{In}$ ,  $^{232}\text{Th}$ ,  $^{235}\text{U}$ ,  $^{238}\text{U}$ ) han existido desde el tiempo en que los elementos fueron formados.

De los 83 elementos que existen de manera natural en cantidades significantes en la Tierra, 20 son encontrados como isótopos únicos (y se les conoce como mononuclídicos), y los otros existen como mezclas que contienen de 2 a 10 isótopos. (Skoog DA, et al.). En la nomenclatura de la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), los isótopos y los nucleidos son especificados por el nombre del elemento, implícitamente dando el número atómico, el cual siempre es el mismo para un elemento en particular, seguido por un guión y el número de masa (ej. Helio-3, Iodo-131, Uranio-238). En la forma simbólica, el número de nucleones es denotada como un superíndice y el símbolo químico del elemento (ej.  $^3\text{He}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{238}\text{U}$ ).

Como mencionábamos anteriormente, cada elemento tiene un isótopo ligero dominante (ej.  $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{32}\text{S}$  y  $^1\text{H}$ ), y uno o dos isótopos pesados (ej.  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$  y  $^2\text{H}$ ) con una abundancia natural de un pequeño tanto por ciento o menor. En la **Tabla No. 7** se muestran las abundancias relativas de los isótopos naturales de los elementos comúnmente más analizados por el equipo IRMS. (Sarah Benson, et al., 2006).

**Tabla No. 7:** Datos de abundancia relativa para los isótopos estables de los elementos más usados en IRMS

Elemento	Isótopo	%Abundancia relativa
Hidrógeno	$^1\text{H}$	99.984
	$^2\text{H}$	0.0156
Carbono	$^{12}\text{C}$	98.892
	$^{13}\text{C}$	1.108
Nitrógeno	$^{14}\text{N}$	99.635
	$^{15}\text{N}$	0.365
Oxígeno	$^{16}\text{O}$	99.756
	$^{17}\text{O}$	0.037
	$^{18}\text{O}$	0.204
Azufre	$^{32}\text{S}$	95.02
	$^{33}\text{S}$	0.76
	$^{34}\text{S}$	4.22
	$^{36}\text{S}$	0.014

### 8.1.2. Isótopos del carbono

Los dos isótopos estables del carbono  $^{12}\text{C}$  y  $^{13}\text{C}$ , son los principales componentes de las entidades biológicas fósiles o vivas, moléculas orgánicas naturales o sintéticas. De estos dos isótopos, el  $^{12}\text{C}$  es el isótopo prevalente ya que representa una abundancia relativa natural del 98.9% mientras que el  $^{13}\text{C}$  representa solo el 1.1%. Sin embargo, esta abundancia relativa no está fijada de forma constante, ya que puede mostrar una variación significativa, siendo la proporción de los átomos de  $^{13}\text{C}$  menores al 0.1%.

La distribución de la molécula puede ser obtenida con un alto grado de exactitud y precisión por un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (IRMS). De hecho, esta herramienta es posible para determinar la relación isotópica (R) o la abundancia isotópica (A). (Meier-Augenstein W. 1999).

Dado que las variaciones isotópicas del carbono son relativamente débiles (del 0.03% en plantas), se utiliza una notación específica para el IRMS para interpretar los resultados. Los valores de la relación isotópica están dados en comparación con una Referencia Internacional, y los resultados son expresados en delta por mil ( $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ ). (Craig, H., 1957). Originalmente esta referencia fue el PDB (*Pee Dee Belemnite*), es un pequeño fósil de belemnite de la formación Pee Dee situada en S. Carolina (E.U); carbonato de calcio rico en carbono-13, con un valor de 1.1237199 % del isótopo de carbono-13, pero el PDB comenzó a agotarse, por lo que la IUPAC en 1994 recomendó que los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  iban a ser informados en relación a VPDB (*Vienna PDB*), asignándole un valor de +1.95‰ en la escala de VPDB con el material de referencia de la IAEA, (Agencia Internacional de Energía Atómica); NBS-19 ( $\text{CaCO}_3$ ).

En 1995, la Comisión en Pesos Atómicos y Abundancias Isotópicas (CAWAIA, por sus siglas en inglés), compuesta por expertos de varios países, publicaron un reporte sobre la necesidad de renunciar al uso de PDB para la expresión de las variaciones isotópicas del carbono. El valor del NBS-19 relacionado con el VPDB fue adoptado por varios grupos de expertos en los estándares de isótopos estables en geoquímica e hidrología. Estos expertos, reunidos por la IAEA desde mediados de los 80's, han reconocido la pérdida de un material de referencia disponible expresada en una escala estandarizada. En 1996, Coplen publicó un artículo donde definió oficialmente a VPDB como la Referencia Internacional para la medición de las relaciones isotópicas del carbono. (Coplen TB., 1996). Los resultados se expresan en delta por mil comparado con VPDB ( $\delta_{VPDB}^{13}C$ ) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\delta_{VPDB}^{13}C = \frac{(R_{muestra} - R_{VPDB})}{R_{VPDB}} \times 10^3$$

Donde  $R_{muestra}$  es la relación  $^{13}C/^{12}C$  medida para una muestra dada, y  $R_{VPDB}$  es la relación de  $^{13}C/^{12}C$  medida para el estándar comparado con la escala de VPDB. Dado que el material de referencia NBS-19, está disponible solo en pequeñas cantidades, las soluciones estándar tales como mezclas de alcanos, cuyos valores se han calibrado en relación al VPDB, son usados para calibrar el equipo. (Eakin P, et al., 1992).

## 8.2 El Fraccionamiento isotópico del carbono en plantas

Como vimos anteriormente existen dos isótopos del carbono que se encuentran estables en la naturaleza que son  $^{12}\text{C}$  y  $^{13}\text{C}$  con un porcentaje de 98.9% y 1.1% respectivamente. Estos isótopos se encuentran distribuidos de manera desigual en diferentes compuestos y es precisamente esta distribución la que nos puede proporcionar información sobre los procesos físicos, químicos y metabólicos involucrados en la transformación del carbono.

La abundancia de  $^{13}\text{C}$  respecto a  $^{12}\text{C}$  en plantas es generalmente menor que en  $\text{CO}_2$  atmosférico, indicando que la discriminación isotópica del carbono ocurre durante la incorporación del  $\text{CO}_2$  en la biomasa de la planta. Dado que los isótopos son estables, la información inherente de la relación de las abundancias de los isótopos del carbono, representado por convención como  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , no cambia siempre y cuando ningún carbón se elimine.

En esta sección discutiremos las bases de la discriminación isotópica durante la fotosíntesis para que podamos entender porque el análisis de la relación isotópica del carbono ha sido usado para diferenciar la testosterona endógena de la sintética. Este aspecto es importante, ya que la testosterona disponible es generada a partir de semisíntesis usando intermediarios obtenidos de plantas para tal propósito.

### 8.2.1. La fotosíntesis

El aspecto más importante de la fotosíntesis es la conversión de la energía luminosa en energía química en forma de ATP. En la fotosíntesis, la luz cae sobre una molécula de pigmento (clorofila) y un electrón se excita y sube a un nivel de mayor energía. Cuando el electrón regresa a su estado basal, cede energía y esa energía se usa para traslocar protones que atraviesan membrana. Estas reacciones se conocen como reacciones luminosas porque dependen por completo de la luz solar.

Con frecuencia, las especies fotosintéticas usan su abundante reserva de ATP (y NADPH) para sintetizar carbohidratos a partir de CO<sub>2</sub>. La fijación del CO<sub>2</sub> no requiere de luz, y no se acopla en forma directa a las reacciones luminosas. Por esta razón este tipo de reacciones se conocen como reacciones oscuras. (Horton, H. et al., 2008).

La abundancia natural de <sup>13</sup>C en el esqueleto de las moléculas varía de un organismo a otro. Estas diferencias se deben a la existencia de varias formas de fijar y asimilar el carbono durante la fotosíntesis. Durante este proceso, los isótopos pesados (<sup>13</sup>C) y los isótopos ligeros (<sup>12</sup>C) del mismo elemento tienen diferentes constantes de reacción cinética, un fenómeno conocido como fraccionamiento isotópico natural. (Farquhar, G.D., et al., 1989). Así, las moléculas con mayor cantidad de <sup>13</sup>C en su estructura están enriquecidas con <sup>13</sup>C, mientras que aquellas que tienen menor cantidad de <sup>13</sup>C están empobrecidas en <sup>13</sup>C.

Las plantas generan moléculas de carbón mediante la integración del carbono atmosférico en tres principales categorías que son conocidas como: el ciclo de Calvin-Benson (C3), el ciclo Hatch-Slack (C4) y metabolismo del ácido crassulaceanico (CAM). (O'Leary H., 1981).

La composición isotópica del carbono formado en la planta se correlaciona fuertemente con el tipo de ciclo fotosintético seguido por determinado organismo. (Fourcroy L. 2009).

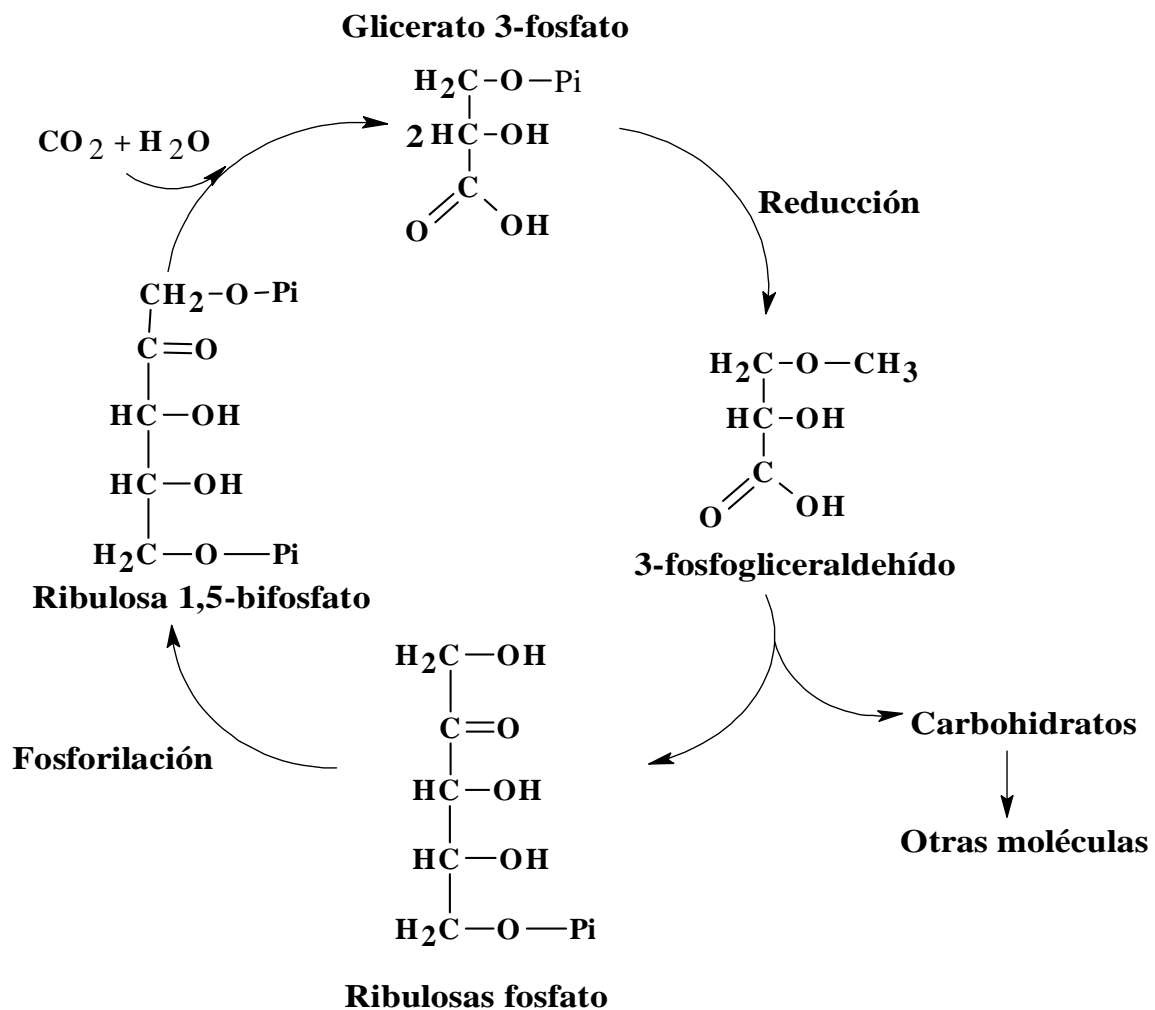
### 8.2.2 Plantas tipo C3

El ciclo de reducción fotosintética del CO<sub>2</sub> toma lugar en las plantas tipo C3 y se conoce como ciclo de Calvin-Benson. Este ciclo incluye 13 reacciones catalizadas por 11 enzimas, que se llevan a cabo durante la fase oscura de la fotosíntesis. Este ciclo se resume en el **Esquema No. 5**. (Fridlyand L.E., etl al., 1999), (Furbank R. T. et al., 1995), (Horton, H. Robert; et al., 2008).

En la primera etapa el CO<sub>2</sub> atmosférico reacciona con un azúcar fosfato con 5 átomos de carbono, la ribulosa-1,5-bifosfato. El primer producto estable identificado en esta reacción es el glicerato-3-fosfato, el cual contiene 3 átomos de carbono (de aquí es de donde viene la designación C3). La incorporación del CO<sub>2</sub> es llevada a cabo por la acción de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenada, mejor conocida como Rubisco, mediante una oxidoreducción intramolecular, o reacción de dismutación. (Horton, H. Robert; et al., 2008).

La segunda etapa es de reducción, donde el 3-fosfoglicerato se convierte en gliceraldehído-3-fosfato. En la tercera etapa, la mayor parte del gliceraldehído-3-fosfato se convierte en ribulosa-1,5-bifosfato. (Horton, H. Robert; et al., 2008).

Como se observa en el **Esquema No. 5**, este primer compuesto característico de las plantas C3 es transformado en varios azúcares vía complejas reacciones enzimáticas. Eventualmente se regresa al producto de partida, la ribulosa-1,5-bifosfato. Este ciclo ocurre en el 80-90% de las plantas de cultivo, incluido el arroz, la papa, la soya y el trigo.

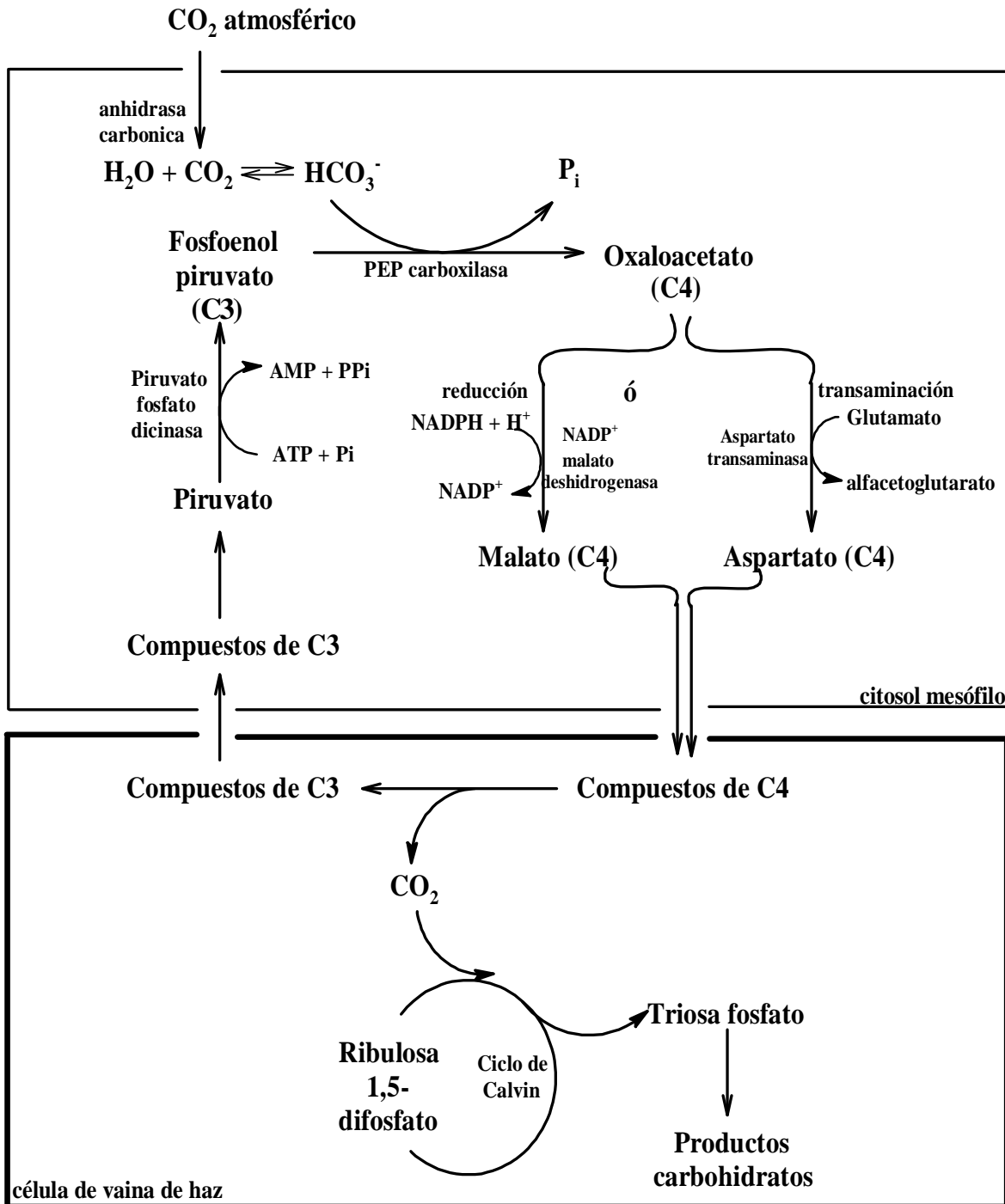


**Esquema No. 5:** Ruta metabólica de fotosíntesis en plantas C3. (Ciclo Calvin-Benson).



### 8.2.3. Plantas tipo C4

El ciclo de la reducción fotosintética del CO<sub>2</sub> en las plantas tipo C4, se conoce como ciclo de Hatch- Slack. **Esquema No. 6.** En este tipo de plantas se requiere de dos carboxilaciones sucesivas. La primera toma lugar en las células de las hojas mesófilas, usando el CO<sub>2</sub> atmosférico. Bajo la acción de la fosfoenolpiruvato carboxilasa el CO<sub>2</sub> es fijado en un sustrato, fosfoenolpiruvato para dar oxaloacetato (el cual tiene 4 átomos de carbono). Este compuesto estable se convertirá en malato y aspartato bajo la acción de enzimas específicas, posteriormente en piruvato y consecuentemente en fosfoenolpiruvato. El CO<sub>2</sub> liberado durante estas reacciones es liberado una vez más sobre la ribulosa-1,5-bifosfato bajo la acción de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa y luego reducido por las siguientes reacciones del ciclo de Calvin-Benson. Las plantas características de fijar el CO<sub>2</sub> por esta vía son el maíz, la caña de azúcar, etc. (Furbank R. T. et al., 1995), (Horton, H. Robert; et al., 2008).



Esquema No. 6: Ciclo de reducción del CO<sub>2</sub> en plantas C4.

#### 8.2.4. Plantas CAM

El tercer grupo de plantas corresponde a las Crassulaceas. Estas especies son caracterizadas por su doble proceso fotosintético, el cual es una mezcla de la combinación de los ciclos de Calvin-Benson y Hatch-Slack. En la oscuridad, estas plantas son capaces de fijar grandes cantidades de CO<sub>2</sub>, dando lugar a una gran cantidad de malato mediante la vía de la fosfoenolpiruvato carboxilasa. El malato de esta forma acumulado en la oscuridad, es descarboxilado en la luz bajo la acción de la malato deshidrogenasa. De esta forma el CO<sub>2</sub> liberado vuelve a reaccionar con la ribulosa-1,5-bifosfato en una reacción catalizada por la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa y es reducido mediante el ciclo de Calvin-Benson. Para resumir, en este tipo de plantas el CO<sub>2</sub> es capturado en la noche mediante el ciclo C<sub>4</sub> y es liberado en las hojas para ser fijado vía C<sub>3</sub> durante el día. (Horton, H. Robert; et al., 2008).

Aun cuando todo este tipo de plantas usan el ciclo de Calvin-Benson para la reducción fotosintética del CO<sub>2</sub>, existen diferencias. Para las plantas C<sub>3</sub>, la carboxilación es irreversible. Esta reacción inicial desempeña un papel importante en la determinación del fraccionamiento en este tipo de plantas. De hecho, la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa discrimina con respecto al <sup>13</sup>C. El resultado es que, comparando las especies C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub> y frecuentemente pero no siempre, las especies tipo CAM, aparentemente son enriquecidas en <sup>13</sup>C. El relativo enriquecimiento de <sup>13</sup>C en las plantas tipo CAM es un hecho muy variable ya que conociendo que, dependiendo de las condiciones el CO<sub>2</sub> puede ser fijado ya sea predominantemente por la fosfoenolpiruvato carboxilasa o por la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa.

Así, de acuerdo al tipo de planta examinada, las desviaciones isotópicas obtenidas serán relativamente enriquecidas para las plantas C4 y relativamente empobrecidas para las plantas C3. Por lo que es esta diferencia fisiológica el origen de las desviaciones isotópicas medidas para diferentes compuestos. Las moléculas naturales resultantes de este tipo de plantas mantienen una específica relación isotópica, derivados de su medio ambiente y de los tipos de su fotosíntesis. (Platzner IT, et al., 1997).

## 9. DETECCIÓN DE ESTEROIDES ANABÓLICOS Y SUS METABOLITOS EN EL ANÁLISIS DEL DOPAJE

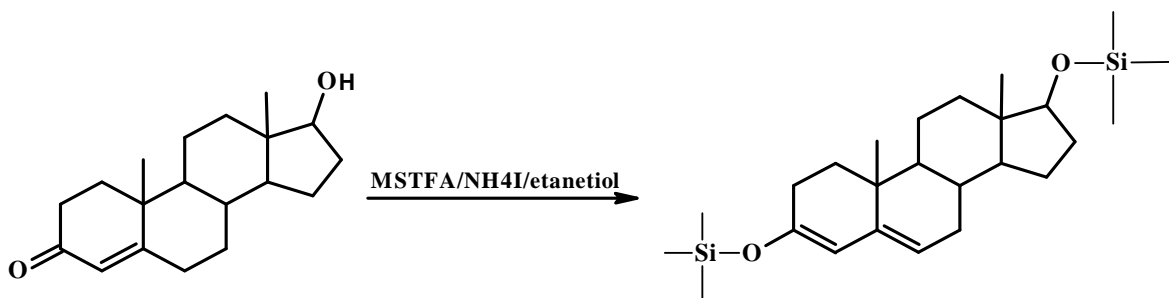
### 9.1. Pasos críticos en el análisis de esteroides anabólicos

El método de cribado involucra la hidrólisis, purificación, preconcentración de los analitos y finalmente un paso de derivatización. Hoy en día, la mayoría de esos métodos de rutina usados para la detección de esteroides o para la caracterización de sus metabolitos están basados en estos conceptos. (Mareck U., et al., 2008), (Van Reterghem P., et al., 2008), (Ayotte, C., et al., 1996), (Bowers L. D., et al., 1996), (Kazlauskas R., et al., 2000), (Marcos J., et al., 2002). Como se muestra en el **Diagrama de flujo No. 1**.

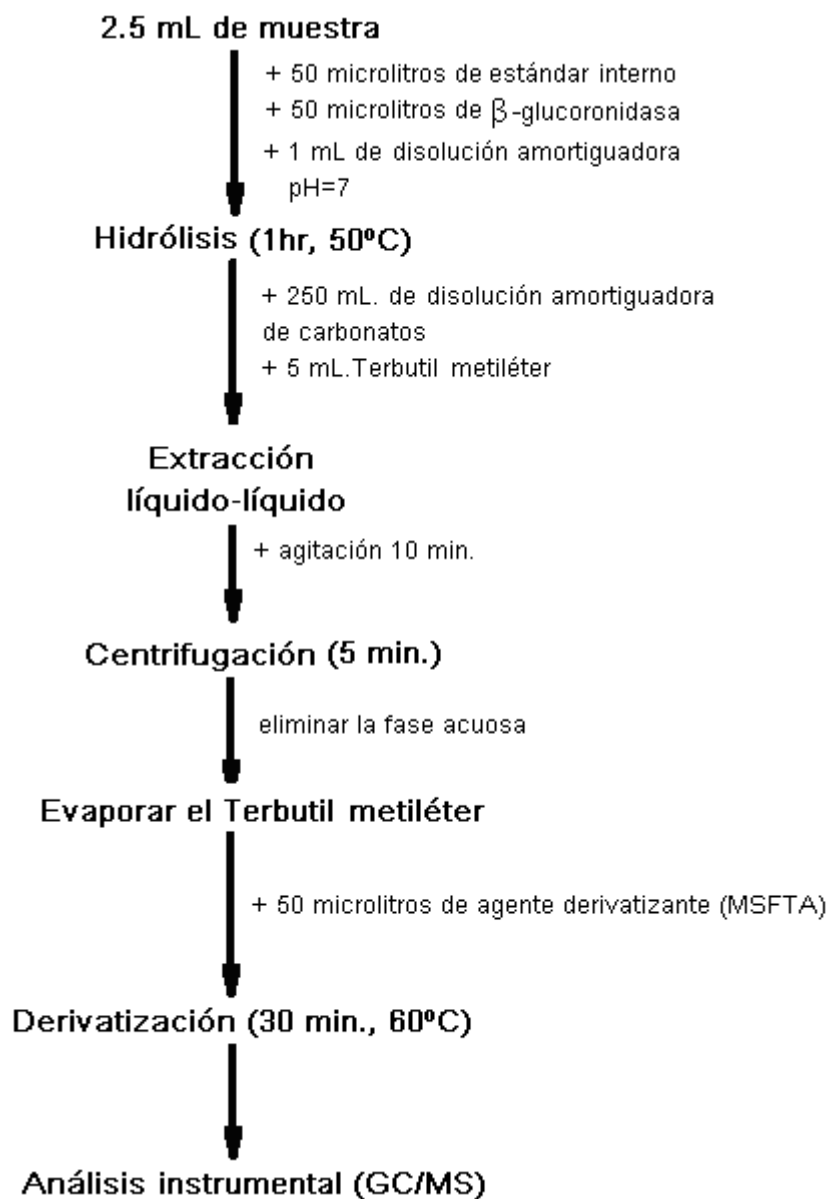
El análisis de esteroides en la prevención y control del dopaje es realizado generalmente usando como muestra biológica, una muestra de orina de los deportistas como matriz biológica. Los métodos rutinariamente usados en el cribado de esteroides esta principalmente enfocado en aquellos metabolitos que 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  $\beta$ -glucuronidasa. Posteriormente se realiza la extracción de los esteroides libres (no conjugados) de la matriz biológica y la concentración de los analitos realizando una extracción líquido-líquido o mediante una extracción en fase sólida (SPE). Consecutivamente como propuso Donike, (M. Donike, 1969); la mayoría de los laboratorios utilizan el compuesto *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSFTA) como agente derivatizante antes de la separación mediante GC.

El paso de derivatización es necesario para el análisis mediante GC/MS para mejorar el comportamiento cromatográfico al igual que las propiedades espectrométricas de los esteroides anabólicos. (Thevis M., et al., 2007). La mayoría de los métodos desarrollados están basados en el análisis de los derivados trimetilsilados. (Mareck U., et al., 2008), (Van Reterghem P., et al., 2008), (Gomes, R. L., et al., 2009). La trimetilsilación es llevada a cabo con una mezcla que contiene *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA), Ioduro de amonio y etanetriol. Bajo estas condiciones tanto los grupos hidroxilo como los ceto son derivatizados. **Esquema No. 7.**

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 o TMSIm como catalizadores. (S.G. Webster., 1985). 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, etanetriol 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 No. 7.**



**Esquema No. 7:** Reacción de derivatización de la testosterona



**Diagrama de flujo No. 1:** Pretratamiento de la muestra previo al análisis mediante GC/MS

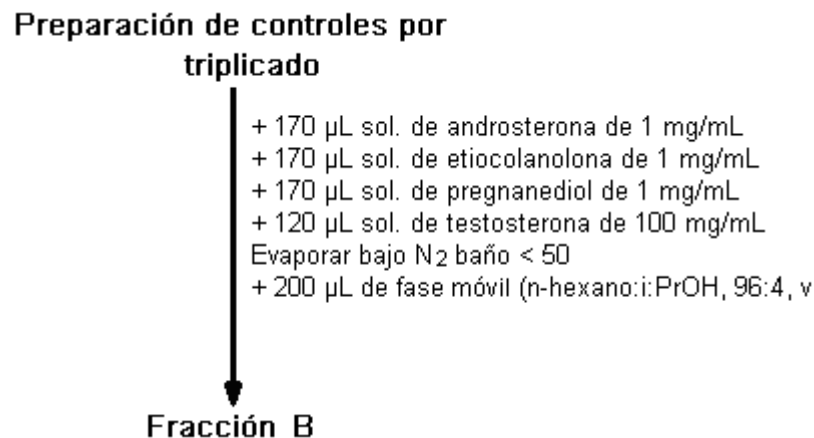
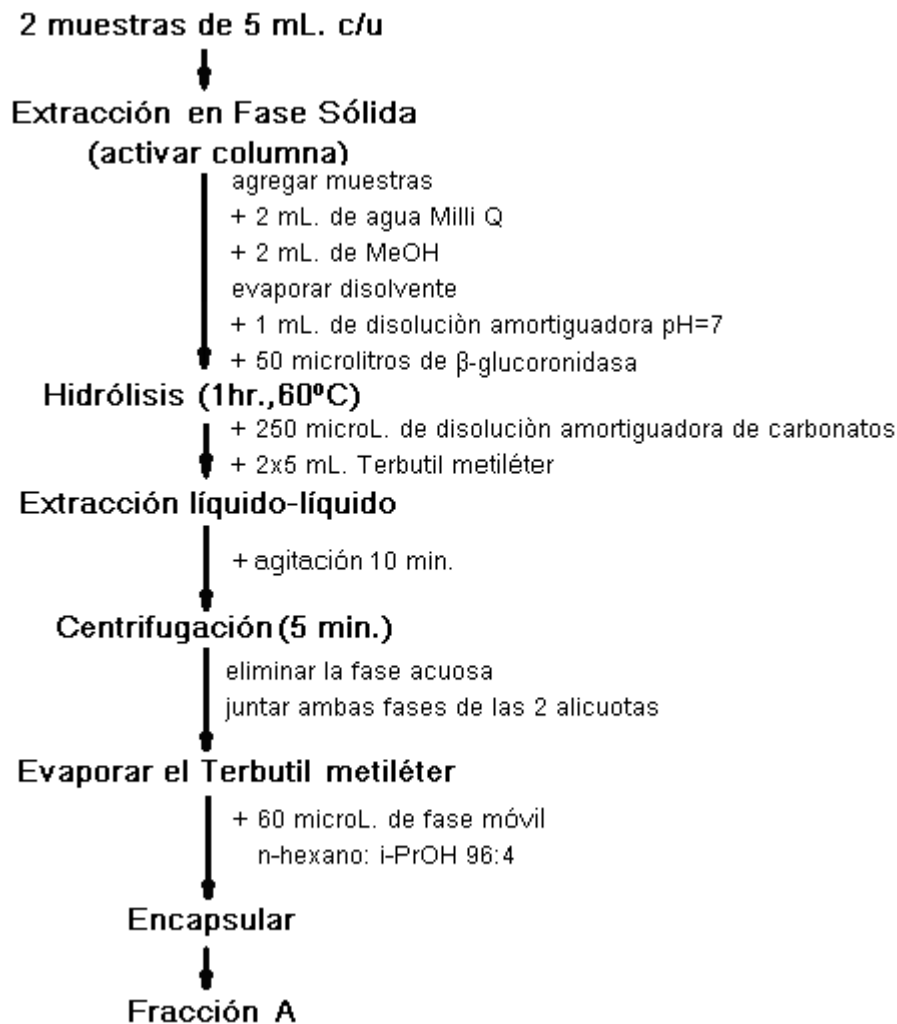
Mientras la simple detección de esteroides anabólicos exógenos es suficiente para reportar un caso analítico adverso, experimentos adicionales deben ser llevados a cabo para establecer el origen de un esteroide endógeno. La primera indicación de la ingesta de esteroides endógenos es la medida de la relación entre la testosterona y la epitestosterona.

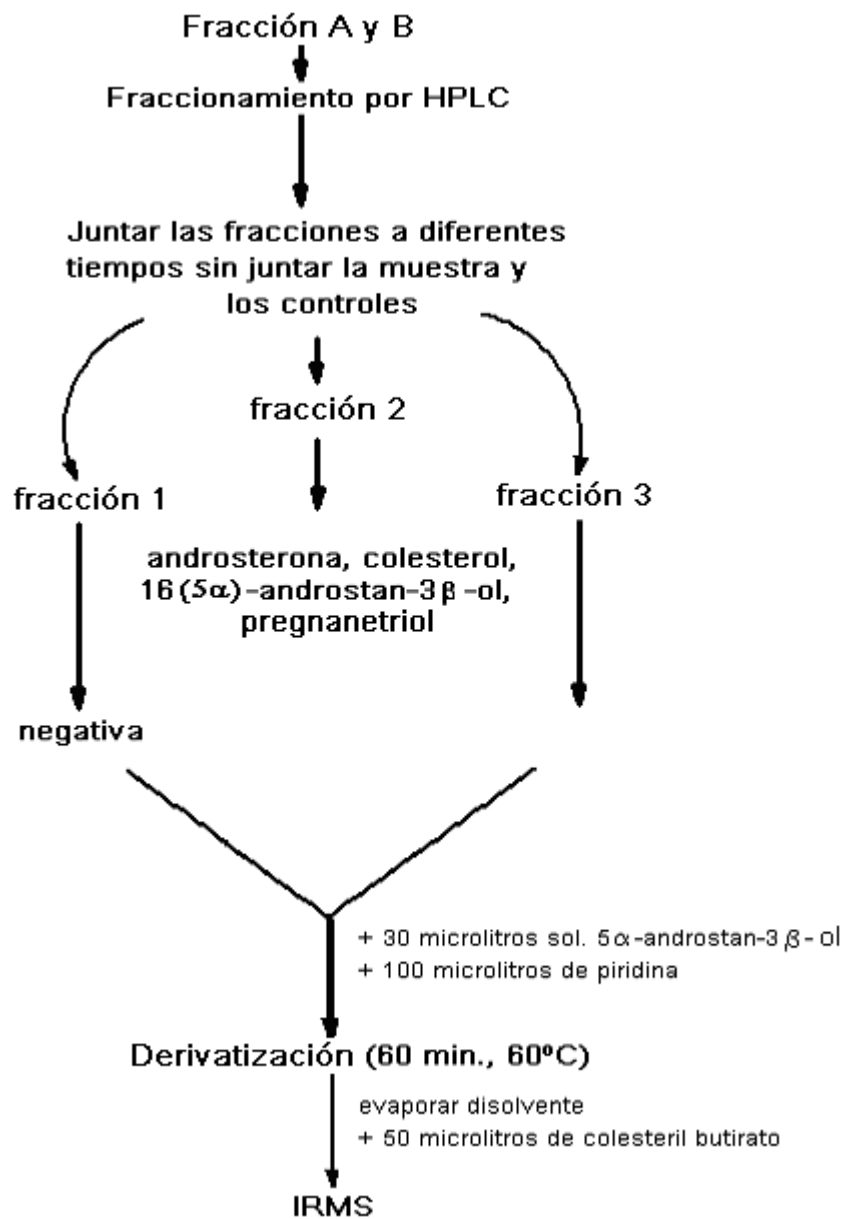
### **9.2. Confirmación de la administración de esteroides endógenos mediante GC/C/IRMS**

La espectrometría de masas de relaciones isotópicas acoplada a un espectrómetro de masas con celda de combustión (GC/C/IRMS), representa una nueva técnica para el análisis y determinación del origen de las sustancias orgánicas. Numerosos estudios preliminares han establecido que esta técnica podría determinar la administración exógena de este tipo de compuestos.

Como se menciona anteriormente cuando hay evidencia de un perfil esteroide anormal se continúa el análisis mediante el IRMS. **Diagrama de Flujo No. 2.**







**Diagrama de Flujo No. 2:** Confirmación de esteroides anabólicos mediante IRMS.

### 9.3. Condiciones analíticas de los equipos

Las condiciones analíticas en los diferentes equipos que se usan previos al IRMS son las siguientes:

#### 9.3.1. Condiciones de trabajo para el HPLC

- Columna: Columna de cromatografía líquida (fase estacionaria: EC 250/4 NUCLEOSIL 100-5 N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).
- Volumen de inyección: 50 µL
- Fase móvil: A: n-hexano 96%  
B: isopropanol
- Flujo : 1 mL/min
- Gradiente:

15 min.	4% B
19 min.	80% B
28 min.	80% B
30 min.	4% B
40 min.	4% B
- Tiempo : 40 minutos
- Detección : DAD, 210 nm  
DAD, 200 nm

### 9.3.2. Condiciones de trabajo para el cromatógrafo de gases y para el IRMS

Las condiciones instrumentales son las siguientes:

Columna:	Columna capilar de cromatografía de gases (fase estacionaria: 50% fenilmetilsilicona, diámetro interno: 0.25 mm, espesor de película: 0.25 $\mu$ m, longitud: 30 m.)
Gas portador:	helio.
Flujo gas portador:	2 mL/min. (Modo de flujo constante).
Temperatura del inyector:	280°C.
Inyección:	en splitless
Volumen de inyección:	1 $\mu$ L o 2 $\mu$ L (en función de las concentraciones encontradas por GC/MS)
Programa de temperaturas:	
Temperatura inicial:	150°C.
Tiempo inicial:	1 min.
Gradiente 1:	20 °C/min.
Temperatura final:	260°C.
Gradiente 2:	1.5 °C/min.
Temperatura final:	280 °C.
Gradiente 3:	2 °C/min.
Temperatura final:	290 °C.
Tiempo final:	4.5 min
Gradiente 4:	5 °C/min.
Temperatura final:	300 °C.
Tiempo final:	4 min.
Tiempo de análisis:	35.33 min
Temperatura del detector:	250°C

## 10. DISCUSIÓN

Con la información que se tiene en la actualidad se puede mencionar que:

- Los esteroides anabólicos son los compuestos más ampliamente usados por los deportistas para aumentar su desempeño físico y existen una gran variedad de nuevos agentes anabólicos derivados de la testosterona, sin embargo, todos estos compuestos denominados exógenos, presentan la misma actividad farmacológica que su predecesor.
- Las normas son cada vez con más estrictas dado que cada vez aparecen nuevos agentes dopantes en el mercado y pueden ser accesibles para los deportistas. Lamentablemente, en nuestro país el tema del dopaje es relativamente nuevo.
- Con respecto a las técnicas, podemos observar que se utilizan equipos más avanzados en el análisis de fármacos. En relación más específica al IRMS, es una técnica que puede ser aplicada a varias áreas de investigación y en el caso particular de los esteroides endógenos determina el origen de dichas sustancias.
- Finalmente podemos mencionar que la confirmación de esteroides endógenos administrados de forma exógena abarca no solo la parte analítica, sino que también se ven involucradas otras áreas de la ciencia como lo es la toxicología, la farmacología, la química orgánica, entre otras.
- Según lo presentado en este trabajo de tesis, las personas que consumen una sustancia prohibida darán resultados positivos en los análisis realizados en un Laboratorio de Control y Prevención del Dopaje.

## 11. CONCLUSIONES

El deseo de realizar una tesis que contemplara un tema poco investigado en México y que contemplara los aspectos sociales, farmacológicos, toxicológicos y analíticos se cumplió con este trabajo de investigación.

Se abordaron todos los temas vistos en los objetivos, presentando un panorama general de la confirmación de esteroides mediante el equipo de GC/C/IRMS y con el resurgimiento de la importancia de la Federación Deportiva ante el tema del dopaje y de las medidas estrictas ante las violaciones al código mundial del dopaje; fue importante dar a conocer la reglamentación actual, así como las sustancias prohibidas para este año 2010.

Sin embargo, cabe señalar que México es uno de los países que presenta poca o nula información en el ámbito deportivo, sobre todo en el tema del análisis de sustancias prohibidas, por tal motivo sigue siendo de particular interés generar especialistas en estos temas relacionados con el deporte.

# LITERATURA CITADA

1. A. Bernreuther, J. Koziat, P. Brunerie, G. Krammer, N. Christoph, P. Schreier, Z. Lebensm. Unters. Forsch. 191. (1990) 299–301.
2. A. T. Kicman, Pharmacology of anabolic steroids. *Br. J. Pharmacol.* 2008, 154, 502-521.
3. Adam T. Cawley and Ulrich Flenker The application of carbon isotope ratio mass spectrometry to doping control. *J. Mass Spectrom.* 2008; 43: 854–864
4. Ann S. Clarka,, Leslie P. Henderson. Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 27 (2003) 413–436
5. Basaria S, Wahlstrom JT, Dobs AS. Clinical review 138: anabolicandrogenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(11):5108–17.
6. Braithwaithe, A. & Smith J.F. *Chromatographic Methods*. Chapter 1. 4th Ed. Chmpman Hall. London (1985):3-8.
7. Brief History of Antidoping , Wada, v.6.0, 2009
8. Brooks RV (1975) Androgens. *Clin Endocrinol Metab* 4:503-520.
9. [Cabañero AI](#), [Recio JL](#), [Rupérez M](#). *J Agric Food Chem.* 2006 Dec 27;54(26):9719-27. Liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry: a new perspective on honey adulteration detection.
10. C Saudan, N Baume, N Robinson, L Avois, P Mangin, M Saugy. Testosterone and doping control. *Br J Sports Med* 2006;40 (Suppl I):i21–i24.
11. C. Ayotte, D. Goudreault, A. Charlebois. Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine. *J. Chromatogr. B* 1996, 687, 3-25.
12. Cawley, A.T., Flenker U. The application of carbon isotope ratio mass spectrometry to doping control. *J. Mass Spectrom.* 2008; 43: 854–864.
13. [Cedric H. L. Shackleton, Andy Phillips, Tony Chang, Ye Li. Confirming testosterone administration by isotope ratio mass spectrometric analysis of urinary androstanediols. \*Steroids\* 62:379-387, 1997](#)



14. Coert A, Geelen J, de Visser J, et al. The pharmacology and metabolism of testosterone undecanoate (TU), a new orally active androgen. *Acta Endocrinol* 1975;79:789–800.
15. Coplen TB. New guidelines for reporting stable hydrogen, carbon, and oxygen isotope-ratio data. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1996; 60(17):3359-60
16. Coplen TB. Reporting of stable hidrógeno, carbon, and oxygen isotopic abundances. *Pure and Applied Chemistry*. 1984;66:273-6.
17. Craig H. Isotopic standars for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometry análisis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1957; 12:133-49
18. D.M. Jones, J.F. Carter, G. Eglinton, E.J. Jumeau, C.S. Fenwick, *Biol. Mass Spectrom*. 20 (1991) 641–646.
19. Detlef Thieme, Peter Hemmersbach, *Doping in Sports*. 2010. Springer
20. Eakin P, Fallick A, Gerc J. Some instrumental effects in the determination of stable carbon isotope ratios by gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry. *Chemical Geology*. 1992; 101:71-9
21. F. Hartgens, H. Kuipers, *Effects of Androgenic-Anabolic Steroids in Athletes. Sports Med*. 2004, 34, 513-554.
22. Farquhar, G.D., Ehleringer, J.R., Hubick, K.T. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 1989; 40:503-37
23. Fourcroy L. Jean. *Pharmacology, Doping and Sports. A scientific guide for athletes, coaches, physicians, scientists and administrators*. Ed. Routledge. 2009
24. Fried, Edgar. *Tasks and objectives of the int. Olympic Committee Since 1884*. International Olympic Committee 2009
25. H. O’Leary, M. Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry*. 1981; 20(4):553-567
26. H.L. Schmidt, M. Butzenlechner, A. Rossmann, S. Schwarz. H. Kexel, K. Kempe, *Z. Lebensm. Unters. Forsch*. 196 (1993) 105–110

27. Harold, M. McNair, James M. Miller. Basic Gas Chromatography. Second Edition. A JOHN WILEY & SONS, INC., PUBLICATION. 2009
28. Horton, H. Robert; Moran, Laurence A.; Scrimgeour, K. Gray; Perry, Mark D.; Rawn, J. David. Principios de Bioquímica. 4<sup>th</sup> Ed. Pearson Education, México. 2008
29. <http://www.wada-ama.org/en/dynamic.ch2?pageCategory.id=312> Consultado el 3 de Febrero de 2010
30. [http://www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-Prohibitedlist/WADA\\_Prohibited\\_List\\_2010\\_EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibitedlist/WADA_Prohibited_List_2010_EN.pdf)
31. [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
32. [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 15 de Febrero del 2010
33. <http://www.wada-ama.org/en/dynamic.ch2?pageCategory.id=312> Consultado el 18 de Febrero 2010
34. <http://www.wada-ama.org/en/Science-Medicine/Anti-Doping-Laboratories/Technical-Documents/>
35. <http://www.wada-ama.org/en/World-Anti-Doping-Program/Sports-and-Anti-Doping-Organizations/International-Standards/> Consultado el 3 de Febrero del 2010
36. International Olympic Committee, The fight against doping and promotion of athletes' health, IOC, Switzerland, 2007, 5/5
37. J. Marcos, J. A. Pascual, X. de la Torre, J. Segura. Fast cribado of anabolic steroids and other banned doping substances in human urine by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2002, 37, 1059-1073.

38. J. Sheider Angela., Friedmann Theodore. Gene Doping in Sports. The Science and Ethics of Genetically Modified Athletes. Elsevier 2006.
39. Klaassen, C.D.; Casarett & Doull's. Toxicology: The Basic science of poison; 6<sup>o</sup> Ed.; McGrall-Hill: E.U., 2001
40. L. D. Bowers, D. J. Borts. Separation and confirmation of anabolic steroids with quadrupole ion trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 1996, 687, 69-78.
41. L. Dehennin and A. M. Matsumoto. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1993 (44):179-189
42. Leonid E. Fridlyand, Renate Scheibe. Regulation of the Calvin cycle for CO<sub>2</sub> fixation as an example for general control mechanisms in metabolic cycles. *BioSystems*. 1999 (51) 79–93.
43. M. Donike, N-methyl-n-trimethylsilyl-trifluoroacetamide a new silylating agent from series of silylated amides, *J. Chromatogr.* 42 (1) (1969) 103–104.
44. M. Saugy, C. Cardis, N. Robinson, C. Schweizer. Test methods: anabolics. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2000, 14, 111-133.
45. M. Thevis, W. Schänzer. Mass spectrometry in sports drug testing: structure characterization and analytical assays. *Mass Spectrom. Rev.* 2007, 26(1), 79-107.
46. M.E.C. Moers, D.M. Jones, P.A. Eakin, A.E. Fallick, H. Griffiths, S.R. Larter, *Org. Biochem.* 20 (1993) 927–933.
47. Martin, Mayes Rodwell. *Bioquímica de Harper* 9<sup>a</sup> Ed. Editorial El manual Moderno. 1984. Pag 502.
48. Mc Nair, H.M. & Miller, J.M. *Basic Gas Chromatography*. Ed Jonh Wiley & Sons Inc. New York. USA. 1998.
49. Meier-Augenstein W, Watt P, Langhans C. Influence of gas chromatographic parameters on measurement of <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C isotope ratios by gas-liquid chromatography-combustion isotope ratio mass spectrometry. I. *Journal of Chromatography A*. 1996; 752:233-41

50. Meier-Augenstein W. Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1999; 842:351-71
51. Meier-Augenstein W. The chromatographic side of isotope ratio mass spectrometry: pitfalls and answers. *LC-GC International*. 1997; 17-25
52. Mueller Klaus, et al., *Chromatographic Techniques- The Basis of Doping Control*, Institute of doping Analysis and Sports Biochemistry, Germany, 1-11.
53. *Museum, the Olympic Games in Antiquity*, International Olympic Committee 2007
54. Myriam O.B., Viviana G.T., *Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías*. *Rev. Med. Chile*. 2004; 132, pp 85-94.
55. Nieschlag E, Mauss J, Coert A, et al. Plasma androgen levels in men after oral administration of testosterone or testosterone undecanoate. *Acta Endocrinol* 1975;79:366–74.
56. O’Leary John *Drugs and Doping in Sport. Socio-Legal Perspectives*, Ed. Cavendish Publishing, Anglia Polytechnic University, London. 2001.
57. P. Van Reterghem, P. Van Eenoo, W. Van Thuyne, H. Geyer, W. Schänzer, F. T. Delbeke, Validation of an extended method for the detection of the misuse of endogenous steroids in sport, including new hydroxylated metabolites. *J. Chromatogr. B*, 2008, 876, 225-235.
58. P. Van Reterghem, P. Van Eenoo, W. Van Thuyne, H. Geyer, W. Schänzer, F. T. Delbeke, Validation of an extended method for the detection of the misuse of endogenous steroids in sport, including new hydroxylated metabolites. *J. Chromatogr. B*, 2008, 876, 225-235.
59. Payne AH, Hales DB. *Endocrine Rv*. 2004: 25:947.
60. Platzner IT, Habfast K, Walder AJ, Goetz A. In: Wineforder JD, ed *Modern isotope ratio mass spectrometry*. New York; J. Wiley: 1997
61. R. Kazlauskas, G. Trout. *Drugs in sports: Analytical trends*. *Ther. Drug. Monit.* 2000, 22, 103-109.

62. R.A. Day, A.L. Underwood. *Química Analítica Cuantitativa*, Ed. 5ª Ed. Pearson Education, México
63. R.P. Evershed, K.I. Arnot, J. Collister, G. Eglinton, S. Charters, *Analyst* 119 (1994) 909–914.
64. Rachel L. Gomes, Will Meredith, Colin E. Snape, Mark A. Sephton. Analysis of conjugated steroid androgens: Deconjugation, derivatisation and associated issues. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2009), doi:[10.1016/j.jpba.2009.01.027](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.01.027)
65. Robert T. Furbank and William C. Taylor. Regulation of Photosynthesis in C3 and C4 Plants: A Molecular Approach. *The Plant Cell*, 1995. Vol. 7, 797-807
66. Sarah Benson, Chris Lennard, Philip Maynard, Claude Roux, Schanzer W, Forensic applications of isotope ratio mass spectrometry—A review. *Forensic Science International* 157 (2006) 1–22
67. Opfermann G, Donike M. Metabolism of stanozolol: identification and synthesis of urinary metabolites. *J Steroid Biochem* 1990;36(1/2):153–74.
68. R. Massé, et al., *J. Chromatogr.* 489(1989):23.
69. Shahidi NT. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin Ther* 2001;23(9):1355–90.
70. S.G. Webster., *J. Chromatogr.* (1985) 333:186
71. Skoog DA, West DM, Holler FJ. *Chimie Analytique*. 7th ed. Paris: De Boeck Universite.
72. Skoog, D. *Principios de Análisis Instrumental*. Mc Graw Hill, 5ª Ed. España. 2001. Pag 537-573, 759-782.
73. Toscano V. Dihydrotestosterone metabolism. *Clin Endocrinol Metab* (1986) 15:279-292.
74. Toshimitsu Niwa. Basic theory of mass spectrometry. *Clinical Mass Spectrometry. (Clinical Chemica Acta)* 1995 (241-242):15-71.
75. U. Mareck, H. Geyer, G. Opfermann, M. Thevis, W. Schänzer, Factors influencing the steroid profile in doping control analysis. *J. Mass Spectrom.* 2008, 43, 877-891.

- 76.V. Hauke, R. Graff, P.Wehrung, J.M. Trendel, P. Albrecht, A. Riva, G. Hopfgartner, F.O. Gulacar, A. Buchs, P.A. Eakin, *Geochim. Cosmochim. Acta* 56 (1992) 3595–3602.
- 77.R. Meyer Verónica. *Practical High-performance Liquid Chromatography*, John Wiley and Sons. University of Berne. 1988
- 78.W. Schänzer. Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clin. Chem.*1996, 42, 1001-1020
- 79.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.
- 80.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.
- 81.WADA Technical Document TD2004MRPL version 1.0, (2010) disponible en [http://wada-ama.org/rtecontent/document/pref\\_limits\\_2.pdf](http://wada-ama.org/rtecontent/document/pref_limits_2.pdf)
- 82.[WADA. The World Anti-Doping Code publicado en http://www.wadaama.org/rtecontent/document/code\\_v3.pdf, visitado el 20 de Abril de 2010](http://www.wadaama.org/rtecontent/document/code_v3.pdf)
83. Willard, H., Merritt, L., Dean, J. *Métodos de Análisis Instrumental*. Compañía Editorial Continental. 1988. Cap. 15-19. pp 477-628.
- 84.Y.Q. Zeng, H. Mukai, H. Bandow, Y. Nojiri, *Anal. Chim. Acta* 289 (1994) 195–204. S.A. Baylis, K. Hall, E.J. Jumeau, *Org. Geochem.* 21 (1994) 777–785.