

La importancia de la cuantificación exacta en la caracterización del perfil esteroideo

Soledad Vargas García-Tenorio y Jesús A. Muñoz-Guerra Revilla

El consumo de esteroides anabolizantes, sean de origen natural o sintético, en el deporte está prohibido porque incrementa la potencia muscular y es nocivo para la salud del deportista. La detección del consumo de sustancias que pueden ser producidas por el organismo, compuestos endógenos, se basa en la estimación de la concentración del producto o de sus metabolitos y la comparación de estas frente a valores de referencia "normales".

En el caso de la Testosterona y de sus prohormonas (productos que una vez ingeridos generan testosterona) los metabolitos indicadores del consumo son; testosterona, epitestosterona, dehidroepiandrosterona (DHEA), androsterona, eticolanolona, 5 α -androst-3 α ,17 β -diol y 5 β -androst-3 α ,17 β -diol, este conjunto de compuestos define lo que se llama perfil esteroideo.

La Agencia Mundial Antidopaje (WADA) establece mediante el Documento Técnico WADA TD2004EAAS los

valores a partir de los cuales el resultado se aparta de la "normalidad", ver Tabla I. Las concentraciones de los esteroides endógenos se calculan a partir del análisis de la muestra de orina con técnicas de alta selectividad, como es la cromatografía de gases acoplada con la espectrometría de masas.

Con el fin de que el método de análisis sea eficaz la cuantificación del perfil esteroideo debe ser precisa, exacta y coherente entre los Laboratorios Acreditados por WADA, de tal modo, que el error de la medida (incertidumbre) sea lo menor posible.

Con el fin de que el método de análisis sea eficaz la cuantificación del perfil esteroideo debe ser precisa, exacta y coherente entre los Laboratorios Acreditados por WADA, de tal modo, que el error de la medida (incertidumbre) sea lo menor posible.

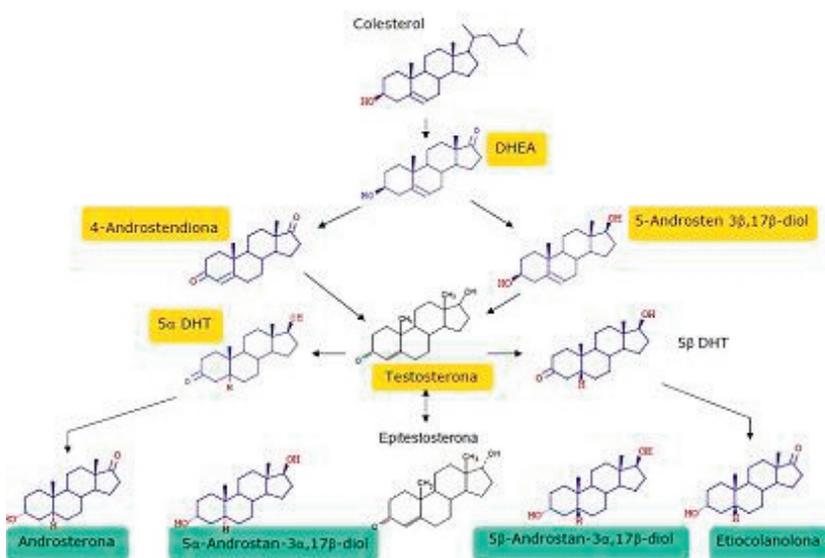


Figura 1: Ruta de metabolización de los esteroides anabolizantes de carácter endógeno

A continuación se va a presentar el estudio que ha sido efectuado en el Laboratorio de la Agencia Estatal Antidopaje para el diseño de un método de cuantificación que con su implementación en Febrero de 2011 permitirá incrementar notablemente la fiabilidad en el cálculo de las concentraciones de los esteroides anabolizantes androgénicos y que definen el perfil esteroideo.

MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL ESTEROIDEO

Como diseño de partida para el estudio se definen cuatro métodos diferentes para estimar las concentraciones, con cada uno de ellos se estudiarán un número de muestras de concentración conocida. Las tandas de análisis se llevan a cabo de tal forma que a una misma muestra se le puedan aplicar cada uno de los métodos de cuantificación a estudiar.



- $T/E > 4$.
- Concentración *Eti* o *A* > 10000 ng/ml.
- Concentración *T* o *E* > 200 ng/ml.
- Concentración *DHEA* > 100 ng/ml..

Tabla 1: Parámetros, estandarizados frente a población "normal", indicativos de un posible consumo de esteroides endógenos.

El análisis instrumental se lleva a cabo por cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas, modo de adquisición SIM. La cromatografía ha sido previamente optimizada de modo que se mejora la resolución, separación entre cada uno de los compuestos estudiados, es suficiente como para evitar el solapamiento de las señales cromatográficas de los analitos (ver figura 2).

Los métodos de cuantificación examinados son:

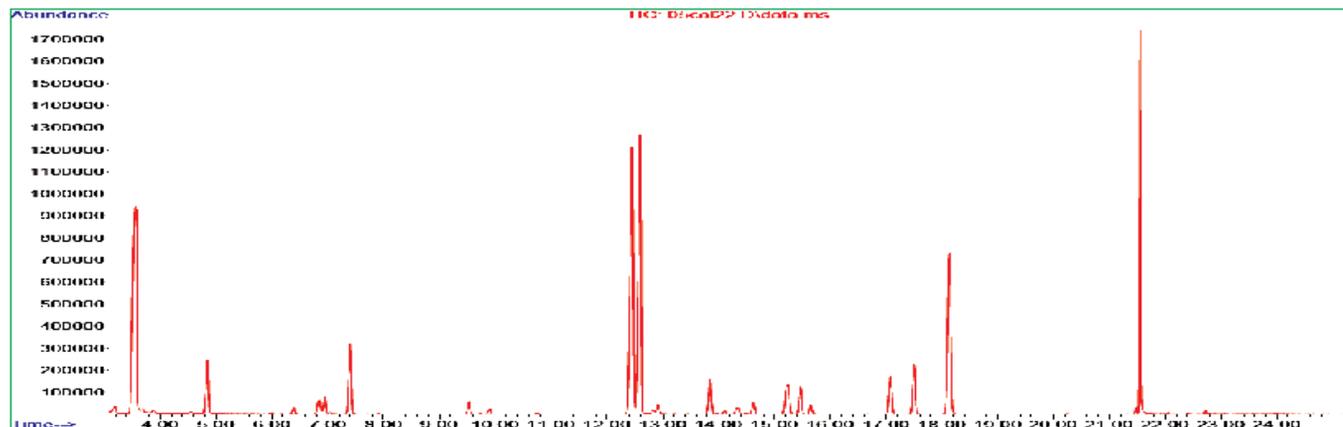


Figura 2: Cromatograma obtenido tras el análisis por GC-MS de una muestra control que contiene los esteroides anabolizantes objeto de estudio. Cada "pico" corresponde con un compuesto, la altura de la señal es relativa a la concentración del analito.

MÉTODO 1

La cuantificación se basa en la comparación de la factores de respuesta de cada uno de los compuestos (factores de respuesta frente a una estándar interno, que en este caso será el compuesto Testosterona-d3) entre la muestra a cuantificar y un calibrador. El calibrador, CALENDO, es una muestra preparada en orina sintética con los siete esteroides objeto de estudio. Se trata por tanto de una cuantificación unipuntual mediante estándar externo.

MÉTODO 2

La cuantificación se basa en la comparación directa de áreas de señal cromatográfica entre el compuesto a cuantificar y su homólogo deuterado dentro de cada muestra. El calibrador en este caso es una mezcla de estándares internos, formada por cada uno de los siete esteroides homólogos deuterados. Este calibrador es añadido a cada una de las muestras. Se trata por tanto de una cuantificación unipuntual mediante estándar interno deuterado para cada esteroide.

MÉTODO 3

En este caso el sistema de análisis es calibrado previo al uso, de tal modo que las muestras QC permiten conocer el estado de calibración del equipo. En este punto es clave caracterizar la estabilidad del estado de calibración del sistema. Para cada muestra QC se establecerá un rango de aceptación que no puede ser superior al 20% para cada analito.

La calibración del sistema de análisis se lleva a cabo mediante una recta de calibrado de seis niveles de calibra-

MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL ESTEROIDEO

ción para cada uno de los compuestos a cuantificar. La ecuación de la recta se construye mediante los factores de respuesta del compuesto frente a su homólogo deuterado. La cuantificación de la muestra se basa en la interpolación del factor de respuesta en la recta de calibrado para cada uno de los compuestos a determinar. Se trata por tanto de una metodología de cuantificación multipuntual (seis niveles) mediante estándar interno deuterado para cada esteroide.

COMPUESTO	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4
Androsterona	48%	14%	30%	14%
Etiocolanolona	45%	8%	23%	7%
5 α Diol	60%	27%	19%	26%
5 β Diol	47%	6%	25%	6%
Testosterona	7%	7%	32%	7%
Epitestosterona	18%	16%	32%	15%
DHEA	27%	27%	12%	18%

Tabla 2: Incertidumbre asociada al método de cuantificación para cada uno de los compuestos. En rojo aquellos valores que según WADA no son aceptables. El método 4 es con diferencia el mejor.

MÉTODO 4

Este método se basa en la misma metodología que el método 1, sólo que en lugar de un único estándar interno se emplea el homólogo deuterado correspondiente para cada uno de los siete esteroides a determinar. Es también una cuantificación unipuntual mediante estándar externo, sólo que en este caso la corrección del factor de respuesta se hace frente a un estándar interno específico para cada compuesto.

COMPARACIÓN DE MÉTODOS

Comparando los datos obtenidos para la cuantificación de cada uno de los siete compuestos a lo largo de las dieciséis tandas de análisis se observa que en términos de precisión el método menos preciso es el método 1, donde la desviación estándar relativa (RSD) es superior al 10%, excepto para Testosterona y Epitestosterona, en cuyo caso se encuentra entre 1% y 6% en función del nivel que se observe.

En el caso del método 2 la precisión es en general inferior al 5% a excepción de Androsterona y 5 α -diol a nivel bajo (7%

y 9% respectivamente) y a nivel alto (8% y 6% respectivamente). Tampoco en el caso del 5 α -diol a nivel bajo (13%).

En el caso del método 3 la precisión es superior al 10% a nivel de concentración bajo en todos los casos excepto para Etiocolanolona y Testosterona (6% en ambos casos) e inferior a 5% en los niveles medio y alto excepto en los casos de Androsterona y 5 α diol (8% y 6% respectivamente).

El método más preciso en términos generales resulta ser el método 4 para el cual se obtiene una RSD inferior al 5% en todos los casos, excepto para Androsterona, 5 α -diol y 5 β -diol al nivel bajo de concentración (7%, 9% y 13% respectivamente). En la Tabla II se muestra la estimación de la incertidumbre expandida para cada uno de los compuestos evaluados, en el nivel medio de concentración y para cada uno de los cuatro métodos estudiados. El método con menor incertidumbre de medida, independientemente del nivel de concentración y prácticamente para los siete compuestos evaluados es el método 4. Si evaluamos los métodos en términos de exactitud, podemos observar también que, en ge-

MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL ESTEROIDEO

veles de concentración estudiados, es decir más exactos, es el método 4. En la figura 3 se representa la cuantificación de 5 β diol en cada una de las tandas de análisis.

neral, el método de cuantificación que da lugar a resultados más próximos al valor teórico en cada uno de los ni-

Como consecuencia de la variabilidad inherente al método de análisis, la caracterización del perfil esteroideo mediante diferentes métodos de cuantificación en un mismo deportista puede dar lugar a valores de concentración diferentes que en caso extremos pueden ser de gran importancia.

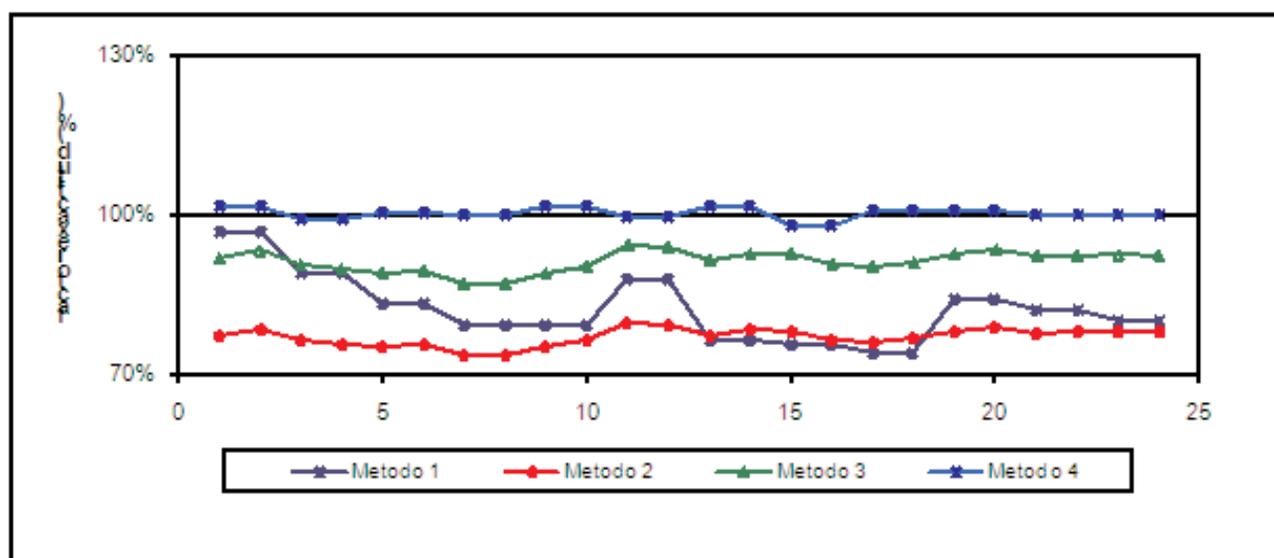


Figura 3: Factor de exactitud de la determinación de 5 β -diol en control, dopado a 110 ng/mL, en función del método de cuantificación. Se puede comprobar como el uso de un método u otro de cuantificación puede introducir un factor de error muy importante.

EN EL PRÓXIMO NÚMERO ...

Evolución de los estimulantes dentro de la Lista de Sustancias Prohibidas

El Laboratorio de Control del Dopaje de la Agencia Estatal Antidopaje supera la auditoria de la Acreditación ENAC