

Estudio del efecto de la ingesta de una sola dosis de dos inhibidores de la aromataasa sobre el perfil hormonal sexual de voluntarios sanos

Gloria Gallo*, Lucrecia Rodríguez, Diana Malaver, Tatiana Zapata

*Laboratorio de Control al Dopaje, calle 63 N° 47-06, Bogotá, D. C., Colombia. Fax: 6083316.

Correos electrónicos: *gigal2003@yahoo.es*; *lucrecia_rod@yahoo.es*.

Autora para correspondencia: Gloria Gallo, correo electrónico: *gigal2003@yahoo.es*.

Recibido para evaluación: 16 de noviembre de 2011.

Aceptado para publicación: 8 de junio de 2012.

RESUMEN

Este trabajo pretende estudiar las modificaciones del perfil hormonal inducidas por el producto que contiene 1,4,6-androstatrien-3,17-diona (ATD) y 3-hidroxi-4-androsten-6,17-diona (3-OHAT), suplemento dietario utilizado por los deportistas con el fin de incrementar las concentraciones de testosterona endógena al inhibir su metabolismo y consiguiente transformación en estradiol. Aunque este producto actualmente se encuentra discontinuado en los Estados Unidos, se han detectado algunos hallazgos analíticos adversos en deportistas colombianos que evidenciaban el consumo de este producto. Para lograr nuestro objetivo, se propuso hacer un estudio de dos voluntarios hombres, evaluar su perfil hormonal antes de la ingesta y compararlo después de la misma. Además, se desarrollaron técnicas analíticas para detectar los componentes del producto mencionado.

Palabras clave: 1,4,6-androstatrien-3,17-diona (ATD) y 3-hidroxi-4-androsten-6,17-diona (3-OHAT), inhibidores de la aromataasa, perfil hormonal, testosterona.

SUMMARY

Study of the effect of ingesting a single dose of two aromatase inhibitors on sex hormone profile of healthy volunteers

This work aims to study the hormonal profile changes induced by Attitude[®], dietary supplement used by athletes to increase endogenous testosterone levels by inhibiting its metabolism and subsequent transformation into estradiol. Although this product is now discontinued in the United States, It has have detected some adverse analytical findings that revealed that Colombian athletes consume this product. To achieve our objective we performed a study of two male volunteers, to evaluate their hormonal profile before and compare after of the intake. Furthermore analytical techniques were developed to detect the components of Attitude[®].

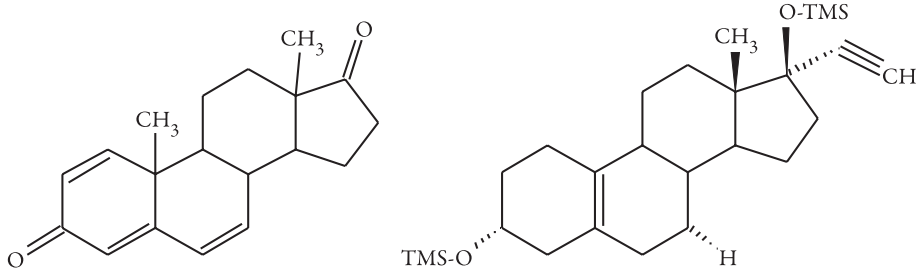
Key words: 1,4,6-androstatrien-3,17-dione (ATD) y 3-hydroxy-4-androsten-6,17-dione (3-OHAT), aromatase inhibitors, hormonal profile, testosterone.

INTRODUCCIÓN

Attitude[®] es el nombre comercial de un suplemento dietario estudiado en el presente trabajo, el cual es promocionado en Internet (1) como un poderoso agente que mantiene los niveles de testosterona elevados por largos períodos, sin producir los efectos colaterales derivados de su conversión en estradiol, como la feminización en varones con aparición de galactorrea, ginecomastia, cambios en la voz, alteraciones en la piel, entre otros efectos (2).

Los productos mayoritarios de este suplemento son 1,4,6-androstatrien-3,17-diona (ATD) y 3-hidroxi-4-androsten-6,17-diona (3-OHAT) (figura 1); ambos compuestos son potentes inhibidores de la enzima aromatasa.

El mecanismo de acción de esta enzima consiste en aromatizar el anillo A de la estructura ciclopentano perhidrofenantreno de la testosterona para convertirla en la hormona femenina estradiol (figura 2), y el papel de los inhibidores ATD y 3-OHAT consiste en inactivarla ligándose a ella irreversiblemente en los tejidos periféricos y adiposos.



1,4,6-androstatrien-3,17-diona 3-hidroxi-4-androsten-6,17-diona

Figura 1. Estructuras moleculares de los esteroides considerados.

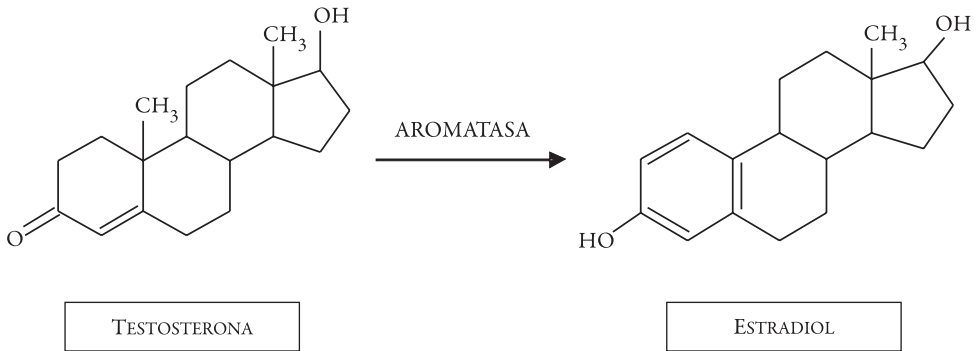


Figura 2. Conversión de testosterona en estradiol.

Normalmente, estos inhibidores de la aromatasa son usados en tratamientos médicos para evitar la síntesis de estrógenos y controlar enfermedades relacionadas con desórdenes endocrinológicos como algunos tipos de cáncer en mujeres. Sin embargo, en el ámbito deportivo, puede hacerse un inadecuado uso de éstos con la finalidad de inhibir la ruta de biotransformación de la testosterona mediante su aromatización y posterior conversión a estradiol (3, 4, 5). De esta forma, los deportistas consiguen un aumento en la concentración de testosterona circulante que puede llevar a mejorar su desempeño. Asimismo, su uso puede tener como objetivo disminuir o tratar efectos adversos indeseables como feminización en atletas hombres, provocados por el excesivo consumo de esteroides anabolizantes.

El suplemento alimenticio que contiene 1,4,6-androstatrien-3,17-diona (ATD) y 3-hidroxi-4-androsten-6,17-diona (3-OHAT) lo discontinuó en Estados Unidos, hace poco tiempo, la empresa que inicialmente lo había lanzado al mercado. Sin embargo, otros

laboratorios farmacéuticos lo promocionan con otros nombres químicos no estándar que intentan confundir a las entidades regulatorias, como sucede con el producto “XT”, que declara como componentes (descritos en inglés): 6,17 keto-etiocholeva-3-Ol tetrahydropyranol, 3,17 keto-etiochol-triene, and 3',5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavanone, cuando en realidad su composición es idéntica en cuanto a los antiestrogénicos a la del producto estudiado en este artículo: 3-hidroxi-4-androsten-6,17-diona —también conocida como 3-OHAT (en la forma de éter THP)—, y 1,4,6-androstatrien-3,17-diona —también conocida como “ATD” y hesperitina— (6). Estudios realizados por Willoughby *et al.*, mostraron que la ingesta de este suplemento por hombres jóvenes y sanos indujo a un incremento promedio de más del 100% de testosterona total, testosterona libre y dihidrotestosterona (DHT), junto con una disminución de la grasa corporal (7).

Uno de los dos principios activos del producto en estudio, la 1,4,6-androstatrien-3,17-diona (ATD) fue sintetizada en la década de los ochenta e introducida en el mercado como un producto revolucionario en el tratamiento de tumores estrógeno-dependientes tales como el cáncer de mama o la endometriosis (3). Apareció en la lista de sustancias prohibidas en el deporte de la Agencia Mundial Antidopaje (WADA) en el 2010, en el grupo S4 de antagonistas y moduladores hormonales (8), debido a que se demostró que incrementa los niveles de testosterona en el cuerpo de una manera indirecta y que se había convertido en uno de los suplementos favoritos de los atletas y fisicoculturistas por sus efectos farmacológicos y su difícil detección; pues este compuesto presenta inconvenientes para ser analizado por cromatografía de gases-espectrometría de masas, tecnología usual en los laboratorios de control al dopaje, debido a que genera poliderivados (9). La técnica de elección para detectar esta sustancia es la cromatografía líquida acoplada a detectores de masas, la cual al ser costosa no estaba muy disponible en los laboratorios y, por tanto, era imposible detectar el ATD en las muestras biológicas. Este compuesto se promociona en Internet por ofrecer los siguientes beneficios: mejora la fertilidad masculina, mejora el ánimo, recuperación corta en caso de traumas, y por ser considerado como la sustancia antiaromatasa más efectiva que incrementa los niveles de testosterona en el cuerpo disminuyendo, a la vez, la aparición de estrógenos en hombres (10).

El otro componente, la 3-hidroxi-4-androsten-6,17-diona (3-OHAT) es un metabolito de la 4-androsten-3,6,17-triona, comúnmente conocida como 6-Oxo, sustancias descritas como “sustratos suicidas de la aromatasa”, que actúan a través de la formación de un enlace irreversible, probablemente con los átomos de azufre de la enzima, en una reacción tiempo-dependiente en presencia de NADPH (11).

Algunos autores como Pablo Knoblovits (12), informan que la deficiencia de estrógenos en varones puede dar lugar a infertilidad generada por hipoespermatozoides, problemas óseos como osteoporosis, aumento de las gonadotropinas (LH y FSH), niveles altos de triglicéridos y colesterol LDL con bajos niveles de colesterol HDL, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia. En definitiva, los estrógenos en el hombre favorecerían un perfil lipídico normal, una mejor acción de la insulina y un efecto protector vascular, disminuyendo el riesgo de problemas cardíacos, efectos positivos de los que no gozarían deportistas que consuman inhibidores de la aromatasa.

En los análisis de control al dopaje es muy frecuente encontrar perfiles hormonales sexuales alterados, debido al consumo de sustancias endógenas en forma exógena o al consumo de prohormonas que entran en la ruta metabólica de los esteroides naturales, o a la ingesta de sustancias como los antiestrogénicos que facilitan la acumulación de testosterona natural. Es necesario determinar la causa de estas variaciones para establecer en forma inequívoca la sustancia que dio origen al hallazgo analítico adverso. Por eso es importante conocer el efecto que puedan tener los esteroides sobre el metabolismo humano y determinar mediante una técnica analítica los metabolitos o compuestos padres. De esta necesidad surgió el estudio que hemos planteado de analizar la variación del perfil hormonal sexual de individuos sanos y determinar cuáles son los metabolitos mayoritarios en la orina, después del consumo de dosis únicas del producto en estudio. Los endógenos que se analizan frecuentemente para evaluar la variación del perfil hormonal son los siguientes:

- Concentraciones de testosterona, epitestosterona, dihidrotestosterona (DHT) y sus principales metabolitos: androsterona, etiocolanolona, 5α -diol y 5β -diol.
- Relaciones, 5α -diol/ 5β -diol, androsterona/etiocolanolona, testosterona/epitestosterona (T/E). Esta última es la principal medida del abuso de testosterona o algún precursor de ella. Basados en estudios poblacionales se pudo establecer que el abuso de esta sustancia se podría detectar a través de la medida de la relación entre la concentración de la testosterona (T) y la concentración de su epímero epitestosterona (E), el cual se produce sólo a partir de la testosterona de origen endógeno. El valor normal de esta relación (T/E) es 1 y el máximo aceptado es de 4. Cuando un individuo presenta valores de relación T/E mayores que 4, se deben hacer investigaciones posteriores para determinar si el incremento de la testosterona en esta relación es debido a factores biológicos o a la ingesta de sustancias sintéticas. Estas investigaciones incluyen estudios de los perfiles hormonales durante un período de tres meses para determinar el comportamiento de las concentraciones de testosterona y sus metabolitos (androsterona, etiocolanolona, 5α -diol y 5β -diol), o la utilización de espectrometría de isótopos

estables (C^{13}/C^{12}), la cual con la medición de la relación isotópica del delta C^{13}/C^{12} permite identificar el origen de las sustancias, puesto que este delta presenta valores diferentes si los compuestos son de origen endógeno o exógeno. El análisis para confirmar el consumo de testosterona o de alguno de sus precursores se hace evaluando el delta de C^{13}/C^{12} de los metabolitos mayoritarios androsterona y eticolanolona, porque son los más fáciles de detectar debido a las concentraciones en las que se excretan (13).

Cuando los precursores o las sustancias inhibitoras modifican la concentración de testosterona, todo el perfil se ve alterado, pero cuando modifican la concentración de DHT, solo se alteran los metabolitos alfa (androsterona, 5α -diol). Una vez ingerido el producto, se puede determinar si éste actúa acumulando testosterona o DHT, que es un metabolito activo de ella.

METODOLOGÍA

Estudio de excreción

Se administró una cápsula de 200 mg de suplemento a dos voluntarios hombres sanos (función renal y hepática normal), con un rango de edad entre 35-45 años. Las muestras de orina se recolectaron en diferentes tiempos, hasta un total de 45 horas posteriores a la administración, incluyendo una orina anterior a la toma (0 horas) como referencia para el perfil hormonal basal.

Preparación de la muestra

Análisis por cromatografía de gases/espectrometría de masas GC/MS

Se hidrolizó una alícuota de 3 mL de las muestras recolectadas después de la administración del suplemento con β -glucuronidasa de *E. coli*, seguido de una extracción líquido-líquido con metilterbutileter a pH 9 y, finalmente, una derivatización con MSTFA:TMSI (del original en inglés: N-methyl-N-trimethylsilyl-2,2,2-trifluoroacetamide, trimethylsilyliodide) e inyectadas por GC/MS.

Análisis por cromatografía líquida/espectrometría de masas LC/MS

Se hidrolizó una alícuota de 3 mL de las muestras recolectadas después de la administración del suplemento con β -glucuronidasa de *E. coli*, seguido de dos extracciones líquido-líquido con metilterbutileter a pH 9 y una extracción líquido-líquido a pH 5,2 con acetato de etilo. Finalmente, se reconstituyeron las muestras en mezcla de acetonitrilo y ácido acético 0,1%, 30:70 e inyectadas por LC/MS.

Instrumentación analítica

GC/MS

El análisis por GC/MS se llevó a cabo en un cromatógrafo Agilent Technologies 6890N acoplado a un detector selectivo de masas Agilent 5975V con automuestreador Agilent 7683. La separación cromatográfica se realizó en una columna HP ULTRA 1 (longitud 25 m × 0,2 mm I.D × 0,11 mm “film thickness”). Las condiciones cromatográficas de la corrida fueron las validadas en el laboratorio para la detección de esteroides anabólicos. En la tabla 1 obsérvense los iones monitoreados en modo SIM para la cuantificación del perfil hormonal sexual.

Tabla 1. Iones monitoreados para la cuantificación del perfil hormonal sexual.

Sustancia	Iones
Testosterona	432
Epitestosterona	432
5 α -diol	241
5 β -diol	241
DHT	434
Androsterona	434
Etiocolanolona	434

Todas las muestras se analizaron por “full scan” para identificar las sustancias en estudio a través del espectro de masas.

LC/MS

El análisis por LC/MS se llevó a cabo en LC/MSD Agilent Technologies de la serie 1100. La separación cromatográfica se realizó en una columna Zorbax SBC8 con una fase móvil de acetonitrilo y ácido acético 0,1% en gradiente. Por esta técnica se evaluó la excreción de 1,4,6- androstatrien-3,17-diona (ATD) a través del ion m/z 283.

RESULTADOS

Resultados GC/MS

Perfil hormonal

Para obtener los valores de concentración de la testosterona, epitestosterona, DHT y metabolitos por GC-MS, se utilizaron los cromatogramas los cuales permiten relacio-

nar el área bajo la curva con la concentración. Para calcular las concentraciones de los endógenos en estudio, se preparó un calibrador que contenía dichas sustancias en las concentraciones de referencia establecidas por nuestro laboratorio para los deportistas colombianos (tabla 2).

Tabla 2. Valores de referencia establecidos para los deportistas colombianos.

Endógeno	Concentración hombres (ng/mL)	Concentración mujeres (ng/mL)
Testosterona	40	16
Epitestosterona	40	16
DHT	40	20
Androsterona	1.500	850
Etiocolanolona	1.500	800
5 α -diol	50	15
5 β -diol	100	30
T/E	1	1
Andros/Etio	1	1
5 α -diol/5 β -diol	0,5	0,5
Andros/Testo	37,5	68,7

Se hallaron los valores basales para cada uno de los individuos que participaron en el ensayo y la relación entre los endógenos cuantificados (tablas 3 y 4).

Tabla 3. Valores de las concentraciones basales de endógenos de cada individuo antes de la administración del suplemento.

Endógeno	Individuo 1 (ng/mL)	Individuo 2 (ng/mL)
Testosterona	34	55
Epitestosterona	50	50
DHT	4,2	9
Androsterona	965	1.500
Etiocolanolona	1.133	1.750
5 α -diol	59	50
5 β -diol	80	90

Tabla 4. Valores de las relaciones basales de endógenos de cada individuo antes de la administración del suplemento.

Endógeno	Individuo 1	Individuo 2
T/E	0,68	1,10
Andros/Etio	0,85	0,86
5 α -diol/5 β -diol	0,74	0,56

Después de la administración del suplemento se hallaron los tiempos de máxima excreción y las concentraciones de los endógenos en éstos (tablas 5 y 6).

Tabla 5. Valores de las concentraciones de endógenos alcanzadas en los tiempos de máxima excreción.

Endógeno	Individuo 1		Individuo 2	
	Concentración ng/mL	Tiempo máximo (horas)	Concentración ng/mL	Tiempo máximo (horas)
Testosterona	98	34	155	37
Epitestosterona	177	34	130	37
DHT	12	34	37	37
Androsterona	6.377	34	10.600	37
Etiocolanolona	5.075	34	10.500	37
5 α -diol	256	34	270	37
5 β -diol	477	34	450	37

Tabla 6. Valores de las relaciones de endógenos en los tiempos de máxima excreción.

Endógeno	Individuo 1	Individuo 2
T/E	0,55	1,19
Andros/Etio	1,26	1,01
5 α -diol/5 β -diol	0,54	0,60

DISCUSIÓN

Los dos compuestos que conforman el suplemento estudiado, ATD y 3-OHAT, se administran en forma combinada para asegurar que todas las moléculas de aromatasa sean

inactivadas. Su uso en el deporte se hace en forma indiscriminada, buscando sólo lograr los beneficios anabólicos de la acumulación de testosterona, por los que son promocionados sin tener en cuenta que existen muy pocos estudios sobre los efectos adversos a largo plazo o la toxicidad de estos compuestos, que debe ser similar a la de la administración crónica de esteroides.

En las mediciones realizadas a los dos individuos que consumieron la sustancia en cuestión, se observa que hubo un incremento marcado de la concentración de la testosterona, epitestosterona, DHT y metabolitos después de la administración de una dosis. En los dos casos, estas concentraciones aumentaron casi el 200% con relación a los valores basales. Sin embargo, la relación T/E, que es el principal medio para diagnosticar el abuso de testosterona o alguno de sus precursores, no se incrementó dramáticamente debido, seguramente, a que también se incrementó la concentración de epitestosterona, la cual sólo se produce a partir de testosterona endógena. Los valores de los endógenos que permitirían configurar un posible hallazgo analítico adverso para esteroides anabólicos son los siguientes:

- Individuos 1 y 2: 5α -diol y 5β -diol que superaron el valor de 250 ng/mL, dado por la Agencia Mundial Antidopaje (WADA) para sospechar del consumo de testosterona.
- Individuo 2: la androsterona y la eticolanolona que superaron el valor de 10.000 ng/mL, reportado por la Agencia Mundial Antidopaje (WADA) para sospechar del consumo de testosterona (14).

Sin embargo, cuando se hicieron los estudios de espectrometría de isótopos estables (IRMS), como lo recomienda WADA en estos casos, tampoco se pudo confirmar el consumo de una sustancia prohibida, pues los deltas de C^{13}/C^{12} para la testosterona y sus metabolitos fueron similares a los de las sustancias endógenas, porque el aumento en las concentraciones no se debe a consumo sino a acumulación de la testosterona endógena y sus metabolitos.

La única alternativa en este caso para poder dar un resultado positivo, es confirmar la presencia de los compuestos padre o de los metabolitos de los componentes del Attitude® (ATD y 3-OHAT). En los ensayos realizados inicialmente por GC/MS, sólo pudimos detectar la presencia de la 3-hidroxi-4-androsten-6,17-diona (3-OHAT) como derivado TMS, monitoreando el ion m/z 518, obtenido por la entrada de tres grupos TMS en los oxígenos de la molécula (figura 3).

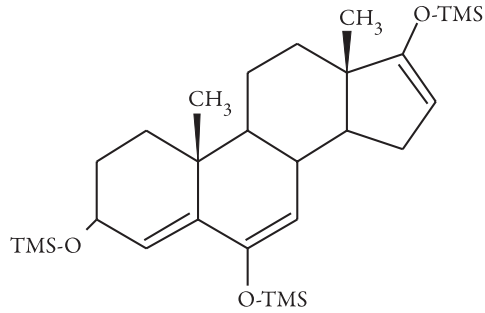


Figura 3. Estructura molecular de 3-hidroxi-4-androsten-6,17-diona.

La gráfica de eliminación de la sustancia en la orina *vs.* tiempo, presenta un comportamiento como se muestra en las figuras 4 y 5, con un máximo de excreción coincidente en los dos individuos a las 20 horas y con una cantidad remanente menor al 10% a las 45 horas.

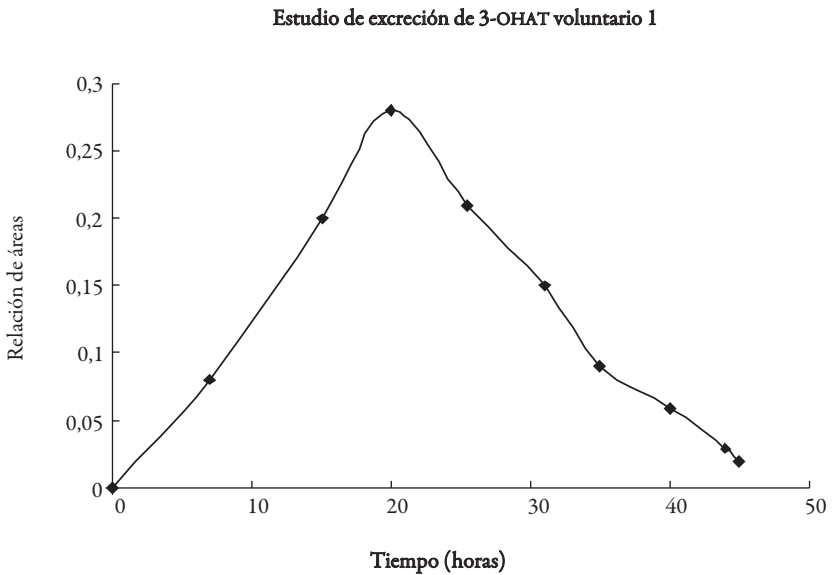


Figura 4. Relación de áreas para la eliminación de la sustancia en el voluntario 1.

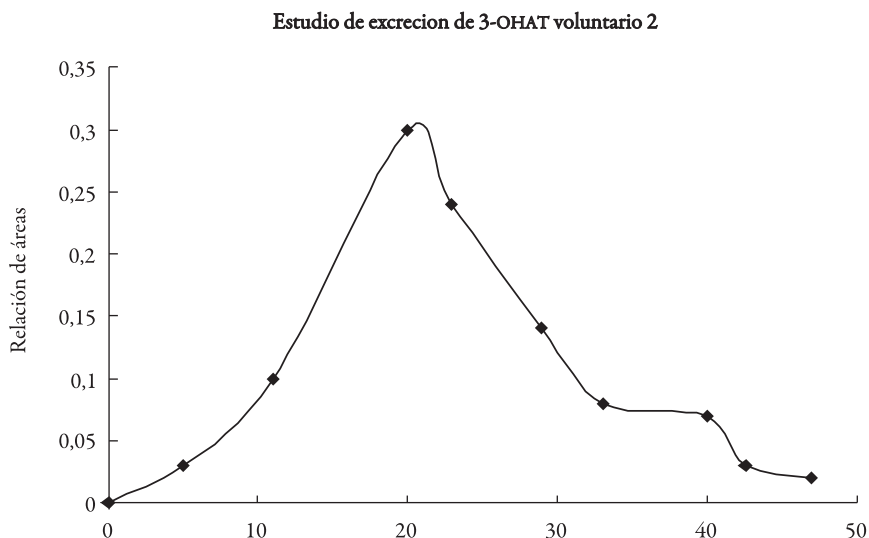


Figura 5. Relación de áreas para la eliminación de la sustancia en el voluntario 2.

El ATD sólo se pudo analizar por medio de HPLC-MS, debido a que presenta problemas de poliderivatización con TMS por la presencia de múltiples dobles enlaces. Su detección se hizo a través de un “full scan” monitoreando el ion m/z 283 que corresponde al peso molecular más un protón, ya que el análisis se hace mediante la ionización positiva (figura 6).

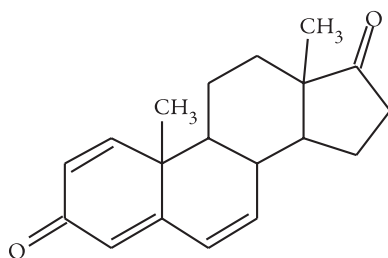


Figura 6. Estructura molecular de 1,4,6-androstatrien-3,17-diona.

La curva de excreción presentó un comportamiento similar al del 3-OHAT, teniendo su máximo a las 20 horas y finalizando su excreción antes de las 45 horas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio, nos permiten concluir que la ingesta del suplemento estudiado provocó una gran variación en el perfil hormonal sexual de los voluntarios, modificando drásticamente la concentración de los metabolitos de testosterona. Sin embargo, este hallazgo no proporciona evidencia suficiente para establecer con certeza un caso positivo, debido a que el aumento en las concentraciones se debe a la acumulación de testosterona endógena. Por tanto, la mejor manera de probar la ingesta de Attitude® es buscando en las muestras de orina los compuestos padre o los metabolitos si los hubiera, por las técnicas analíticas descritas. Es necesario realizar estudios más detallados en un futuro, para identificar los metabolitos de las sustancias estudiadas.

REFERENCIAS

1. http://www.supplements101.com/Attitude_p/sanattitude.htm. Página propiedad de *Supplements 101, INC.* All rights reserved. Copyright© 2002-2009. Página que ofrece suplementos dietarios. Consultada en octubre de 2011.
2. J. Hardman, L. Limbird, A. Gilman, Goodman & Gilman, “Las bases farmacológicas de la terapéutica”, 10 ed., McGraw-Hill, New York, 2003.
3. M. Motta, S. Zoppi, A.M. Brodie, L. Martini, Effect of 1,4,6-androstatriene-3,17-dione (ATD), 4-hydroxy-4-androstene-3,17-dione (4-OH-A) and 4-acetoxy-4-androstene-3,17-dione (4-Ac-A) on the 5 alpha-reduction of androgens in the rat prostate, *J. Steroid Biochem.*, **25**, 593-600 (1986).
4. H. Inano, Y.C. Lin, M. Dym, Effects of age and 1,4,6-androstatriene-3,17-dione on activities of hCG-induced 19-hydroxylase and aromatase of rat testes, *J. Steroid Biochem.*, **17**, 181-184 (1982).
5. A. Slama, F. Gogan, A. Sarrieau, M. Vial, W. Rostene, C. Kordon, Effect of an inhibitor of aromatization, 1,4,6 androstatriene-3,17-dione (ATD) on LH release and steroid binding in hypothalamus of adult female rats, *Exp. Brain. Res.*, **64**, 407-410 (1986).
6. <http://bodybuilding.ultimatefatburner.com/novedex-test-booster.html>. Página que ofrece suplementos dietarios. Consultada en octubre de 2011.

7. D.S. Willoughby, C. Wilborn, L. Taylor, W. Campbell, Eight weeks of aromatase inhibition using the nutritional supplement Novedex XT: Effects in young, eugonadal men, *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.*, **17**, 92-108 (2007).
8. <http://www.wada-ama.org/en/World-Anti-Doping-Program/Sports-and-Anti-Doping-Organizations/International-Standards/Prohibited-List>. Página oficial de la Agencia Mundial Antidopaje (WADA). Consultada en mayo de 2012.
9. R. Kazlauskas *et al.* Recent advances in doping analysis (15), Koln, pp. 31-40, (2007).
10. http://www.isteroids.com/bodybuilding/Potent_Irreversible_Aromatase_Inhibitor.html. Página propiedad de iSteroids, empresa que ofrece esteroides anabólicos. Consultada en octubre de 2011.
11. M. Numazawa, M. Tsuji, A. Mutsumi, Studies on aromatase inhibition with 4-androstene-3,6,17-trione: its 3 beta-reduction and time-dependent irreversible binding to aromatase with human placental microsomes, *J. Steroid Biochem.*, **28**, 337-344 (1987).
12. P. Knoblovits, Rol de los estrógenos en el varón, *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*, **40**, 57-59 (2003).
13. G.I. Gallo, L. Rodríguez, D. Malaver, Modificaciones del perfil hormonal sexual como resultado de la administración conjunta de dos sustancias que inhiben el metabolismo de la testosterona, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **38**, 59-77 (2009).
14. <http://www.wada-ama.org/en/World-Anti-Doping-Program/Sports-and-Anti-Doping-Organizations/International-Standards/Laboratories/Technical-Documents>. Página oficial de la Agencia Mundial Antidopaje (WADA). Consultada en mayo de 2012.