



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Estudio del metabolismo de la
metandienona a través de un modelo
in vitro de incubación con el hongo
*Cunninghamella elegans***

Lucía Toscano Bayona

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología
Bogotá, Colombia
2021

Estudio del metabolismo de la metandienona a través de un modelo *in vitro* de incubación con el hongo *Cunninghamella elegans*

Lucía Toscano Bayona

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Toxicología

Director (a):

Msc., Diana Carolina Chaves Silva

Codirector (a):

Ph.D., Paola Andrea Cárdenas Cuadros

Codirector (a):

Esp. Farmacología, Q.F., Jorge Ariel Martínez Ramírez

Línea de Investigación:

Comportamiento de variables toxicológicas y de salud relacionadas con el consumo de sustancias psicoactivas.

Grupo de Investigación:

Grupo de investigación en sustancias psicoactivas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología

Bogotá, Colombia

2021

A mi familia.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Nombre: Lucía Toscano Bayona

Fecha 24/Mayo/2021

Agradecimientos

A Dios por ser uno conmigo en este instante llamado vida.

A mis padres, por su apoyo y amor incondicional en cada momento.

A mi hermano, por su amistad, su paciencia, escucha, abrazo y consejo en los momentos más complejos.

A la Universidad Nacional de Colombia por ser mi casa y permitir formación de pregrado y maestría.

A la Maestría en toxicología por la formación académica recibida.

Al Laboratorio de Control al Dopaje-Bogotá, por permitir el desarrollo del proyecto en sus instalaciones.

A los Laboratorios de Microbiología y Análisis Instrumental del Departamento de Farmacia, por permitir el desarrollo de la investigación.

Al profesor Jorge Ariel Martínez por compartir su conocimiento y experiencia.

A la profesora Diana Chaves por su guía.

A Paola Cárdenas por su guía y apoyo en todo el proceso.

A Gustavo Rodríguez, por su amistad y sus conocimientos y enseñanzas en masas.

A Anyi, por estar, escuchar y motivarme cada vez que era necesario.

A Vivi y Yess por las risas y la motivación mutua.

A mis amigas y compañeras de maestría Marisol, Alejandra, Karen y Elizabeth por acompañar en el camino.

A mis amigos Paola, Aleja, Laura, Sergio, Susana y Diana por su apoyo constante.

A Anahid y OlgaLu, por acompañarme a hacer CLIC.

Resumen

La metandienona uno de los anabolizantes más reportado en los hallazgos analíticos adversos de los laboratorios de control al dopaje a nivel mundial. La molécula fue inicialmente usada para el tratamiento para el hipogonadismo, sin embargo, tiempo después su uso se expandió con el fin de obtener mayor masa muscular y un mejor rendimiento a nivel deportivo. Su metabolismo ha sido estudiado a través de diferentes modelos *in vivo*, con ratones y humanos e *in vitro* con fragmentos celulares del hígado, esto con el fin de establecer los metabolitos que indiquen su uso a corto y largo plazo que permitan su detección en las muestras de control al dopaje.

Con este trabajo se busca estudiar el metabolismo de la metandienona a través de un modelo *in vitro* de biotransformación con el hongo *Cunninghamella elegans*, el cual ha sido utilizado con gran variedad de moléculas debido a que su sistema enzimático es similar al de los mamíferos. Con el desarrollo del modelo se proponen cuatro metabolitos monohidroxilados en las posiciones 6,7,14,15, esto se realizó a través de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas GC-MS/EI, se plantearon las posibles rutas de fragmentación y se compararon con los reportados para otros modelos de biotransformación.

Palabras clave: metabolismo, metandienona, *Cunninghamella elegans*, esteroides anabolizantes, biotransformación.

Abstract

Methandienone is one of the most reported anabolics in the adverse analytical findings of doping control laboratories worldwide. The molecule was initially used for the treatment of hypogonadism, however, later its use expanded to obtain greater muscle mass and better performance at the sports level. Its metabolism has been studied through different *in vivo* models, with mice and humans and *in vitro* with liver cell fragments, this to establish the metabolites that indicate its use in the short and long term that allow its detection in the samples. doping control.

This work seeks to study the metabolism of methandienone through an *in vitro* model of biotransformation with the fungus *Cunninghamella elegans*, which has been used with a great variety of molecules because its enzymatic system is like mammals. With the development of the model, four monohydroxylated metabolites were identified at positions 6,7,14,15, this was done through the gas chromatography technique coupled to mass spectrometry (GC-MS / EI), the possible routes of fragmentation and were compared with those reported for other biotransformation models.

Keywords: Metabolism, methandienone, *Cunninghamella elegans*, anabolic steroids, biotransformation.

Contenido

	Pág.
1. Marco Teórico.....	18
1.1. Esteroides Androgénicos Anabolizantes	18
1.1.1 Toxicocinética de los anabolizantes.....	19
1.1.1.1 Absorción	19
1.1.1.2 Distribución.....	20
1.1.1.3 Metabolismo	20
1.1.1.4 Eliminación	23
1.1.2 Toxicodinámia	23
1.1.2.1 Mecanismo de acción	23
1.1.2.2 Efecto Tóxicos	24
1.2. Metandienona	25
1.2.1. Metabolismo	26
1.2.2. Toxicodinamia	27
1.3. Marco legal de los anabolizantes	27
1.4. Detección de los AAS.....	28
1.4.1. Preparación de la muestra	29
1.5. <i>Cunninghamella</i>	30
2. Justificación	32
3. Objetivos.....	34
3.1. Objetivo general	34
3.2. Objetivos específicos	34
4. Materiales y Equipos.....	35
4.1. Materiales	35
4.2. Equipos	35
4.3. Microorganismos.....	36
4.4. Soluciones.....	36
5. Métodos	37
5.1. Biotransformación	37
5.1.1 Controles usados durante la biotransformación	37
5.2. Extracción de metandienona y sus metabolitos.....	38
5.2.1. Derivatización de extractos	39
5.3. Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	39
6. Resultados y discusión	40
6.1. Desarrollo del modelo de biotransformación.....	40
6.1.1. Actividad metabólica del modelo.....	42
6.2. Extracción de los metabolitos de metandienona.....	44
6.3. Identificación de metabolitos de metandienona a través del modelo <i>C. elegans</i>	44
6.3.1. Análisis por espectrometría de masas de la metandienona derivatizada	47
6.3.2. Identificación del metabolito 1 (M1).....	50
6.3.3. Identificación del metabolito 2 (M2).....	53

6.3.4.	Identificación del metabolito 3 (M3)	55
6.3.5.	Identificación del metabolito 4 (M4)	61
6.4.	Comparación de metabolitos producidos por <i>C. elegans</i> con los reportados en la literatura	64
7.	Conclusiones y recomendaciones	67
	Conclusiones	67
	Recomendaciones	68
	Limitaciones	68

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Ciclopentanoperhidrofenantreno, estructura base de los esteroides.....	18
Figura 1-2: Modificaciones a la estructura de la testosterona para dar mayor actividad anabolizante. Figura adaptada de <i>Kicman y Growe</i> (10)	19
Figura 1-3: Formación Testosterona glucurónido.	23
Figura 1-4: Formación Testosterona glucurónido.	23
Figura 1-5: Mecanismo de acción de los esteroides androgénicos anabolizantes. Creado por la autora con BioRender.com	24
Figura 1-6: Estructura química de la metandienona	26
Figura 1-7: Metabolismo de la metandienona.....	27
Figura 1-5: Procedimiento general de preparación de muestras.....	30
Figura 6-1: <i>C. elegans</i> después de 4 días de incubación a 26 °C en agar PDA.....	41
Figura 6-2: <i>C. elegans</i> después de 4 días de crecimiento a 26°C en caldo PDA.	41
Figura 6-3: Perfil cromatográfico del metabolismo de metandienona con <i>C. elegans</i> , después de 5 días de incubación.	43
Figura 6-4: (a) Metandienona sin derivatizar, (b) Metandienona derivatizada con TMS, (c) metabolito 1 sin derivatizar, (d) metabolito 1 derivatizado con TMS	45
Figura 6-5: Perfil cromatográfico de los controles Control 1, Control 2, Control 3, comparados con las muestras Muestra 1, Muestra 2, Muestra 3, después de 5 días de incubación a 26°C.	46
Figura 6-6: Perfil cromatográfico ion extraído 532 (EIC), de los controles Control 1, Control 2, Control 3, comparados con las muestras Muestra 1, Muestra 2, Muestra 3 y Muestra 4 después de 5 días de incubación a 26°C.....	46
Figura 6-7: Espectro de masas metandienona <i>bis</i> -TMS	48
Figura 6-8: Patrón de fragmentación propuesto de la metandienona <i>bis</i> -TMS parte 1...	49
Figura 6-9: Patrón de fragmentación propuesto de la metandienona <i>bis</i> -TMS parte 2...	49
Figura 6-10: Patrón de fragmentación propuesto de la metandienona <i>bis</i> -TMS parte 3.	50
Figura 6-11: Espectro de masas del metabolito 1 (TR 15.30).....	51
Figura 6-12: Patrón de fragmentación del metabolito 1 parte 1	52
Figura 6-13: Patrón de fragmentación del metabolito 1 parte 2	53
Figura 6-14: Espectro de masas del metabolito 2 (TR 15.63).....	54
Figura 6-15: Patrón de fragmentación propuesto para el metabolito 2.....	55
Figura 6-16: Patrón de fragmentación del metabolito 3 (TR 15,88).....	56
Figura 6-17: Patrón de fragmentación de la 6β-hidroximetandienona material de referencia (TR 15,88)	57
Figura 6-18: Patrón de fragmentación del metabolito 3 parte 1	58
Figura 6-19: Patrón de fragmentación del metabolito 3 parte 2	59
Figura 6-20: Patrón de fragmentación del metabolito 3 parte 3	60
Figura 6-21: Espectro de masas del metabolito 4 (TR 15,93).....	62
Figura 6-22: Patrón de fragmentación propuesto para el metabolito 4.....	63

Figura 6-23: Biotransformación de fase I propuesta para metandienona (MET) incubados con *C. elegans* (líneas punteadas) en comparación con los identificados en estudios con otros modelos metabólicos (líneas continuas)..... 66

Lista de gráficas

	Pág.
Gráfica 6-1: Metabolización de la metandienona después de 5 días de incubación	42
Gráfica 6-2: Respuesta analítica para metabolitos mayoritarios después de 5 días incubación	43

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 5-1. Resumen muestras y controles usados para la biotransformación	38
Tabla 5-2. Programa de secado <i>Rapidvap</i>	38

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
AAS	<i>Anabolic Androgenic Steroids</i>
AMA	Agencia Mundial Antidopaje
COI	Comité Olímpico Internacional
<i>C.elegans</i>	<i>Cunninghamella elegans</i>
CYP	Citocromo P450
EI	Impacto Electrónico
EIC	<i>Extracted ion chromatogram</i>
FDA	<i>U.S. Food & Drug Administration</i>
GC	Cromatografía de gases
LC	Cromatografía Líquida
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MSTFA	N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida
MS	Espectrometría de masas
MET	Metandienona
M1	Metabolito 1
M2	Metabolito 2
M3	Metabolito 3
M4	Metabolito 4
MRPL	<i>Minimum Required Performance Levels</i>
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
NAT	N-acetiltransferasa
PAPS	Fosfo-adenosin-fosfo-sulfato.
RMN	Resonancia magnética nuclear
PDA	Agar papa dextrosa
TMS	Trimetilsilano
TMSI	Yodotrimetilsilano
TIC	<i>Total ion chromatogram</i>
TR	Tiempo de retención
UDPGT	UDP- glucuroniltransferasa
UDPGA	Ácido UDP-glucurónico

Introducción

Uno de los causales de dopaje es el uso de una sustancia o método prohibido para ilegalmente mejorar el rendimiento deportivo. Esta práctica ha estado presente en la humanidad desde tiempos antiguos, relacionada principalmente al uso de sustancias. Uno de los grupos de sustancias más usados para este fin, se refiere a los anabolizantes, prohibidos en el deporte desde 1970(1), por el Comité Olímpico Internacional (COI) y que constituyen cerca del 50% de los hallazgos analíticos adversos en el deporte reportados por la Agencia Mundial Antidopaje (AMA)(2).

Por otro lado, en el análisis de muestras de control al dopaje no solo se detecta el compuesto padre, sino también sus metabolitos, aumentando el tiempo de detección de cualquier sustancia, lo que deriva en un incremento del número de sustancias a evaluar durante un análisis por los laboratorios acreditados para tal fin, siendo un análisis multianalito que presenta retos a nivel de desarrollo y validación de métodos analíticos. No obstante, es necesario profundizar en el conocimiento de los metabolitos que evidencien el consumo de una sustancia de manera inequívoca. Por esta razón, es importante el desarrollo de estudios de metabolismo en diferentes modelos diseñados para tal fin.

Es sabido, que para los estudios de metabolismo se han desarrollado diferentes modelos *in vivo* e *in vitro*, con el fin de establecer rutas metabólicas, metabolitos y mecanismos de toxicidad. Los modelos *in vivo* son aquellos que tienen lugar principalmente en animales y los modelos *in vitro*, se llevan a cabo en órganos, tejidos o células aisladas. Estos modelos tradicionales presentan algunas desventajas, pues normalmente requieren una infraestructura compleja, con condiciones ambientales controladas que permitan un manejo adecuado de los modelos usados, lo cual incrementa los costos de mantenimiento y experimentación.

Debido a lo anterior, se han planteado modelos alternativos con hongos como *Cunninghamella elegans* (*C. elegans*), cuyas ventajas son costos de mantenimiento menores, infraestructura para su desarrollo es sencilla, se evitan las consideraciones éticas y permiten investigar cómo se metaboliza una sustancia, información de gran importancia en el análisis de control al dopaje y en el análisis forense.

Entre las sustancias más usadas en dopaje se encuentra la metandienona, que representa cerca del 10% de los hallazgos analíticos adversos por anabolizantes a nivel mundial. Su metabolismo ha sido estudiado en humanos por *Donike et al.*(3), en caballos por *Hagedorn et al.*(4), en modelos de ratones con células de hígado humano por *Lootens et al.*(5) y en hongos filamentosos por *Khan et al.*(6). En este estudio se utiliza *C. elegans* como modelo de biotransformación para metandienona, se identifican los metabolitos producidos y se hace una comparación con los reportados en la literatura.

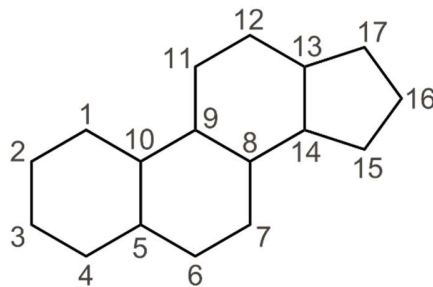
1. Marco Teórico

1.1. Esteroides Androgénicos Anabolizantes

Los esteroides androgénicos anabolizantes (AAS, *del inglés Anabolic Androgenic Steroids*) están definidos como sustancias naturales, sintéticas o semisintéticas derivadas de la testosterona, capaces de generar la maduración de la actividad del sistema reproductor en hombres y mujeres por su acción androgénica y, a través de su acción anabólica, promoviendo la síntesis de nuevos tejidos(7,8).

Los esteroides son moléculas orgánicas con un sistema de anillo tetracíclico, ver **Figura 1-1**. Hay cuatro clases de hormonas esteroides: andrógenos, corticoides, estrógenos y progestágenos, de las cuales la testosterona es el principal andrógeno masculino(9).

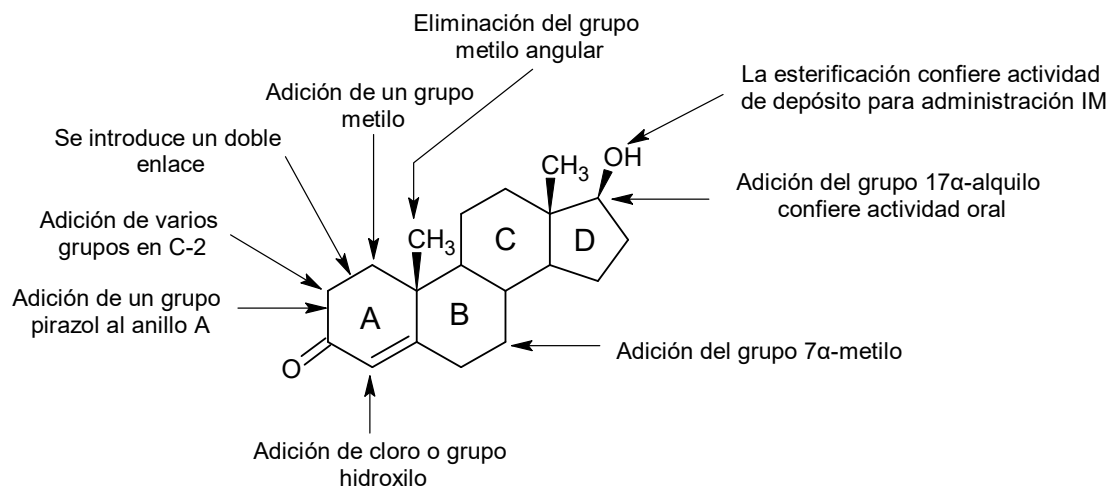
Figura 1-1: Ciclopentanoperhidrofenantreno, estructura base de los esteroides.



El descubrimiento de estructura de la testosterona, ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** hacia la década de 1930 permitió el inicio de investigaciones que comprobaron su acción anabólica cuando era administrada en el organismo humano. Con el fin de buscar prolongar la vida media de la testosterona, se realizan modificaciones estructurales a la misma, dando así origen a los esteroides de diseño. Algunas de estas modificaciones fueron introducidas con el fin de aumentar el efecto anabólico de la

molécula y disminuir el efecto androgénico, las modificaciones más comunes se muestran en la **Figura 1-2**.

Figura 1-2: Modificaciones a la estructura de la testosterona para dar mayor actividad anabolizante. Figura adaptada de *Kicman y Growe*(10)



1.1.1 Toxicocinética de los anabolizantes

La mayoría de los datos disponibles sobre la cinética de la testosterona y los AAS, está dada por el estudio de estas moléculas en modelos animales o por consumidores de estas en dosis terapéuticas, hay pocos datos en personas que abusan de las sustancias(1).

1.1.1.1 Absorción

Su absorción se da vía oral, intramuscular, dérmica y a través de mucosas, dependiendo del tipo de modificación que se le haya hecho a la molécula de la testosterona. En el caso de la testosterona, aunque su absorción es rápida, su biodisponibilidad en el organismo es baja debido al efecto metabólico del primer paso hepático. Los derivados sintéticos tienen mayor biodisponibilidad, la alquilación de la posición 17 α , produce AAS con posibilidad de administración oral, mientras que la esterificación de la posición 17 β , produce AAS inyectables. Los AAS también tienen la posibilidad de difundirse a través de la piel y las mucosas, permitiendo así la administración en parches transdérmicos, aerosoles nasales y tabletas bucales(1).

1.1.1.2 Distribución

Se distribuyen uniéndose en plasma a las globulinas fijadoras de hormonas sexuales en un 98%, siendo la albúmina y la globulina las principales transportadoras de esteroides(1).

1.1.1.3 Metabolismo

Cuando un xenobiótico ingresa en un organismo vivo, este es metabolizado para facilitar su eliminación del sistema, haciéndolo generalmente más hidrofílico. El metabolismo de medicamentos se divide en dos fases, la fase I que son reacciones de funcionalización, donde se realizan modificaciones estructurales a las moléculas que involucran, oxidaciones, hidroxilaciones, reducciones o ciclaciones y la fase II que son reacciones de conjugación, en donde la molécula se une a moléculas como el ácido glucurónico o sulfúrico(11).

El metabolismo de xenobióticos puede ser un proceso de desintoxicación, produciendo sustancias farmacológicamente inactivas, o un proceso de activación generando sustancias con una actividad farmacológica mayor que el compuesto inicial, que en algunos casos pueden ser tóxicos para el organismo(12).

Reacciones de Fase I:

Reacciones de Oxidación

La mayoría de las reacciones de fase I se llevan a cabo gracias a la acción de citocromo P450 (CYP450)(13), una familia de enzimas, que está localizada mayoritariamente en el retículo endoplasmático hepático. Todas las enzimas CYP son hemoproteínas que catalizan la monoxigenación de un átomo de oxígeno para un sustrato, mientras el otro átomo de oxígeno es reducido gracias a la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Se puede encontrar en animales, plantas y hongos como el *Cunninghamella*(14).

NADPH es el cofactor del citocromo oxidorreductasa que dona un electrón a la enzima CYP durante las reacciones de oxidación. Las principales reacciones del CYP450 son:

1. Hidroxilación de carbonos alifáticos o aromáticos
2. Epoxidación de enlaces dobles
3. Oxigenación y N-hidroxilación de heteroátomos

4. Desalquilación de grupos alquilo unidos a heteroátomos de N, O o S

Hay algunas reacciones de oxidación que son llevadas a cabo por enzimas como alcohol deshidrogenasa, la xantina oxidasa, la amino oxidasa microsomal, la monoamino oxidasa, la diaminoxidasa y las peroxidases(12,15).

Reacciones de Reducción

En estas reacciones participan la NADPH reductasa microsomal y enzimas citosólicas, que se encargan de reducir grupos nitro, azo, carbonilos, disulfuros, y realizar deshalogenaciones(12).

Hidrólisis

La hidrólisis de ésteres, ácidos carboxílicos y amidas se da principalmente por la acción de las esterasas y amidasas respectivamente(12).

Ejemplo de reacciones de fase I en los EAAS

Los principales procesos metabólicos de fase I en el caso de la testosterona son la reducción del doble enlace C4-C5 del anillo A, con la participación de la 5 α y 5 β reductasa, además se puede presentar una 1,2 hidrogenación o 1,2 deshidrogenación. La 6 β -hidroxilación, es una vía metabólica menor en el caso de boldenona y 17 α -metilt testosterona, sin embargo, en el caso de la clormetandienona, fluoximesterona y metandienona, es una vía metabólica mayor debido al doble enlace en C1-C2. En el anillo C puede haber una hidroxilación en C12. En el anillo D se da una oxidación enzimática de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa para formar el correspondiente 17-cetoesteroide y es una vía metabólica importante para la testosterona y todos los AAS con grupos 17 β -hidroxi secundarios(1).

Reacciones de Fase II:

Glucuronidación

La glucuronidación es la reacción de fase II cuantitativamente más importante y consiste en la unión del ácido glucurónico al xenobiótico. Esta reacción utiliza la enzima UDP-glucoronil transferasa (UDPGT) como catalizador y el éster uridíndifosfato del ácido glucurónico (UDPGA) como cofactor. Los sitios de unión son generalmente heteroátomos nucleofílicos ricos en electrones como O-, N- y S(12,15).

Sulfatación

La conjugación con sulfato es catalizada por las sulfotransferasas (SULT), que utilizan como cofactor el fosfoadenosil-fosfosulfato (PAPS) y generalmente producen ésteres con ácido sulfúrico altamente solubles en agua. Consiste en la transferencia de un grupo sulfato a un grupo hidroxilo o amino en el xenobiótico(12,15).

Otras reacciones de conjugación

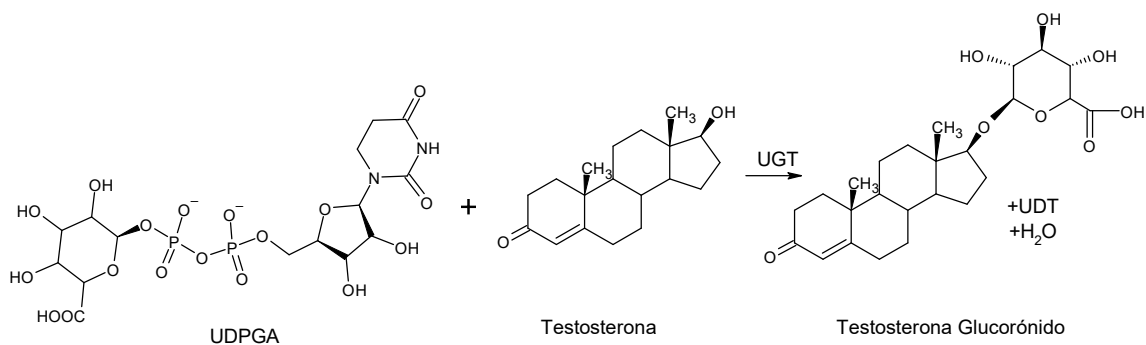
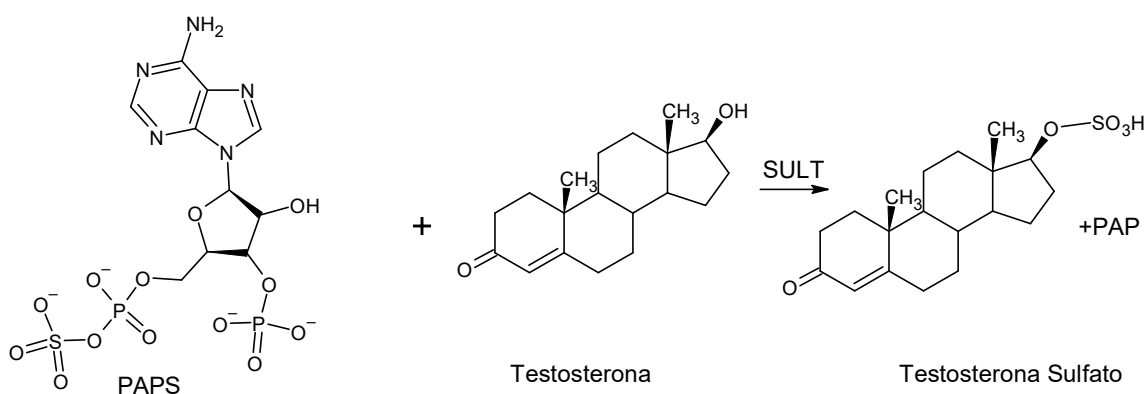
Conjugación con glutatión: Está catalizada por las glutatióntransferasas (GST), que están presentes en la mayoría de los tejidos localizados en el citoplasma y en el retículo endoplasmático. Los conjugados con glutatión, son tioeteres que se eliminan directamente por la bilis, y en menor medida por la orina(15).

Conjugación con aminoácidos: Los xenobióticos que contienen grupos carboxílicos pueden ser conjugados por una variedad de aminoácidos, sin embargo, los más frecuentes son glicina y cisteína(15).

Acetilación: Las N-acetil transferasas (NAT) catalizan la acetilación de aminas aromáticas y heterocíclicas. N-acetilación de aminas y O-acetilación de hidroxilaminas, son dos tipos de reacciones muy frecuentes en el metabolismo de las aminas aromáticas(15).

Ejemplo de reacciones de fase II en los EAAS

En cuanto a los EAAS las rutas metabólicas mayoritarias en fase II son la glucuronidación y la sulfatación. La mayoría de los metabolitos de EAAS son excretados como glucurónidos conjugados. Dentro de las reacciones principales que se pueden dar en el anillo A, está la sulfonación y la glucuronidación en el grupo 3 β hidroxil. En cuanto al anillo D se pueden presentar glucuronidación y sulfonación del grupo 17 β -hidroxil secundario, además glucuronidación y sulfonación del grupo 17 β -hidroxil terciario(16). En la **Figura 1-3** y en la **Figura 1-4**, se pueden ver las reacciones de formación de los conjugados de la testosterona.

Figura 1-5: Formación Testosterona glucurónido.**Figura 1-6:** Formación Testosterona sulfato.

1.1.1.4 Eliminación

Finalmente, la eliminación de los esteroides androgénicos anabolizantes se da cerca de un 90% en orina como glucurónidos conjugados. El tiempo de vida media de eliminación puede ir de 3-16 días dependiendo de si la molécula está acompañada de modificaciones estructurales que incrementen la liposolubilidad(1).

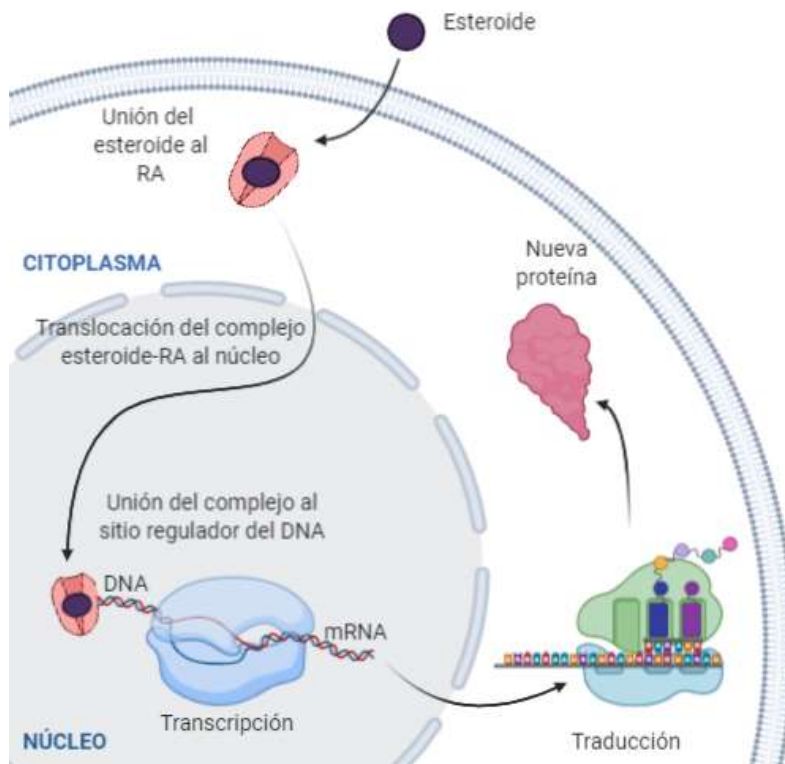
1.1.2 Toxicodinámica

1.1.2.1 Mecanismo de acción

Los esteroides androgénicos anabolizantes actúan en el cuerpo en dosis terapéuticas uniéndose a los receptores de andrógenos presentes en el citoplasma de la célula, formando un complejo esteroide-receptor que pasa al núcleo de la célula donde se une al

ADN y permite la transcripción de RNA mensajero, que posteriormente emite la señal para la síntesis de proteínas(1), ver **Figura 1-7**. Estos compuestos son utilizados en tratamiento de enfermedades como hipogonadismo, endometriosis, infertilidad, caquexia, entre otras(7).

Figura 1-7: Mecanismo de acción de los esteroides androgénicos anabolizantes. Elaboración propia con BioRender.com



1.1.2.2 Efecto Tóxicos

El uso de dosis superiores a las terapéuticas de los AAS puede llevar a la presencia de efectos adversos en quién lo usa, como eventos cardiovasculares, hepáticos, endocrinos y comportamentales.

Entre los efectos adversos cardiovasculares causados por esteroides anabolizantes se encuentran hipertensión, hipertrofia del ventrículo izquierdo, trombosis, llenado diastólico deteriorado entre otros (17). Estudios clínicos sugieren la asociación del consumo de esteroide con la aparición de enfermedad arterial coronaria prematura y disfunción del

ventrículo izquierdo (18). Se han reportado casos en los que la muerte súbita por falla cardíaca se ha asociado al uso prologando se anabolizantes (19,20).

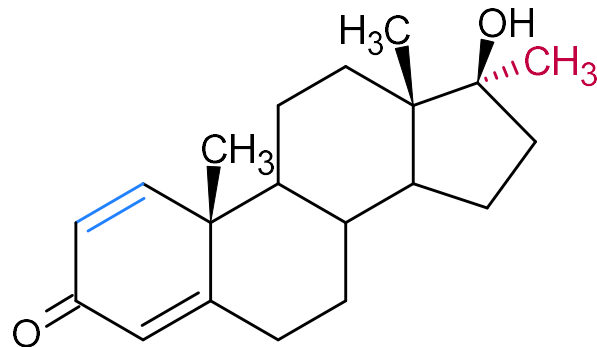
En cuanto a los efecto hepáticos, se tiene que puede presentar elevación de las aminotransferasas, bilirrubina e proteínas séricas (21), por otra parte se ha observado la presencia de tumores hepáticos posiblemente asociados al consumo de estas sustancias, algunas de estas patologías se revierten con el tiempo una vez se elimina su consumo (22,23).

Con respecto a los efectos endocrinos se pueden diferenciar en hombres y mujeres, en los hombres se ha observado la aparición de ginecomastia debido a que una parte de los anabolizantes son convertidos en estrógenos, cambios en las características de los espermatozoides, reducción del volumen testicular (24), disminución de la producción de testosterona por retroalimentación negativa del hipotálamo así como un descenso en los niveles hormona luteinizante y la gonadotropina coriónica (24,25). En las mujeres se han asociado con irregularidades menstruales, clitoromegalia y masculinización; la infertilidad está presente en ambos casos (24,26).

Y finalmente, los cambios comportamentales en usuarios de AAS que se han observado con frecuencia son la psicosis, comportamientos agresivos, delirios y depresión en algunos casos. También se han observado el desarrollo de dependencia generalmente acompañada del consumo de otras sustancias (21,26).

1.2. Metandienona

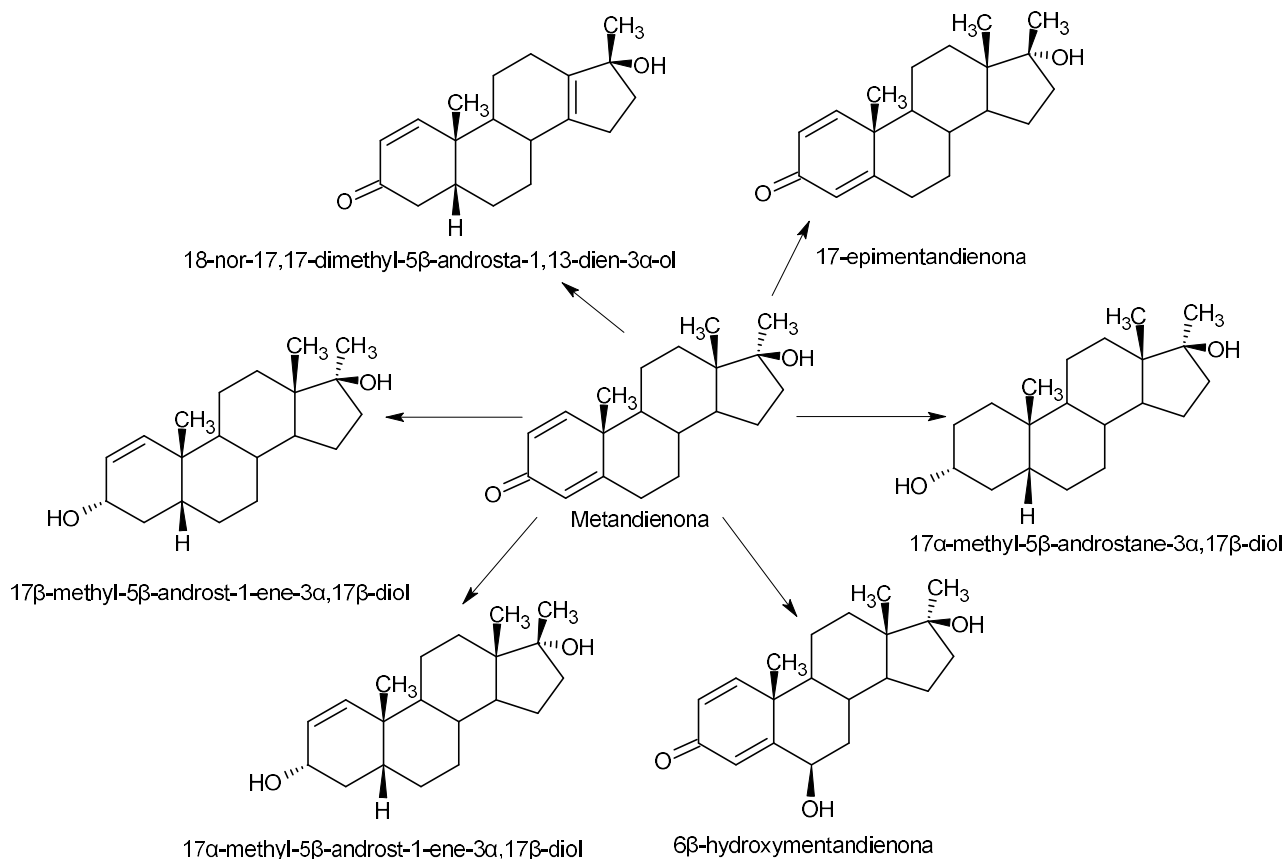
La metandienona, también conocida como metandrostenolona y dianabol, fue desarrollada por *Ciba Specialty Chemical* y aprobada hacia 1958 por la FDA (*U.S. Food & Drug Administration*) para el tratamiento del hipogonadismo. Su mecanismo de acción incluye la unión y activación del receptor de andrógenos por lo cual aumenta la síntesis de proteínas, gluconeogénesis y la fuerza muscular (7). La introducción de un doble enlace en la posición C1-C2 de la molécula, aumenta la selectividad por la actividad anabólica y la adición de un grupo metilo en la posición 17, le confiere actividad oral, como se puede ver en la **Figura 1-8**.

Figura 1-8: Estructura química de la metandienona

1.2.1. Metabolismo

La metandienona tiene una alta biodisponibilidad oral al ser un derivado de la testosterona alquilado en la posición 17. Tienen un metabolismo hepático parecido, sin embargo, la metandienona no produce metabolitos reducidos en 5 α , debido a la presencia de su doble enlace C1. Se ha reportado la presencia de metabolitos 6-hidroxiados (3), 17-epimerizados (3,27), también se presenta una reducción grupo ceto de la posición 3 (17); además se reportó un metabolito de largo termino que puede ser detectado hasta 21 días después de su administración, denominado 18-nor-17 β -hydroxymethyl,17 α -methyl-5 α -androst-1,13-dien-3-one (28). Los metabolitos 6-hidroxiados han sido detectados en su forma libre (3); mientras que la 17-epimentandienona y 17 β -methyl-5 β -androst-1-ene-3 α ,17 α -diol, se han reportado conjugados con sulfatos y con el ácido glucurónico (1,17); en la **Figura 1-87** se puede ver un esquema general de los metabolitos de metandienona en humanos.

Figura 1-9: Metabolismo de la metandienona en humanos (3)



1.2.2. Toxicodinamia

No hay reportes de intoxicación aguda por metandienona, sin embargo, al igual que con los demás anabolizantes, su uso a largo plazo puede presentar efectos tóxicos. Los más comunes son: daño hepático en todos los consumidores, impotencia, enfermedad cardiovascular prematura e hipertrofia prostática en los hombres, irregularidades menstruales y virilización en las mujeres. Además, existen reportes de cambios comportamentales al interrumpir el uso de estos(21,29,30).

1.3. Marco legal de los anabolizantes

La legalidad de los anabolizantes es un tema controversial alrededor del mundo, puesto que en algunos países se encuentran prohibidos por ley y en otros se pueden vender libremente sin ninguna restricción.

El control de los esteroides surge después que, en la década de los 60 cuando salieron al mercado la mayoría de ellos, su consumo se aumentara indiscriminadamente en la población general, sin tener una razón médica para ello, convirtiéndose en un problema de salud pública. Por otro lado, también se populariza su consumo entre los deportistas que buscaban mejoras en su rendimiento.

Para el año de 1964 el Comité Olímpico Internacional vota para prohibir el dopaje en el deporte y en 1967 genera una lista con las sustancias prohibidas. Sin embargo, es hasta el año de 1974 en que los esteroides anabolizantes entran a formar parte de esa lista.

En Estados Unidos están catalogados en la lista III de sustancias controladas -bajo la ley de sustancias controladas de los Estados Unidos (1,31), la misma categoría de medicamentos como la ketamina o la morfina, por lo que el uso o posesión de cualquier anabólico es ilegal sin una receta médica.

Se encuentran también prohibidos en países como Canadá (32), Reino Unido(33), Australia(34), y Brasil(35), en donde su uso solo es autorizado bajo prescripción médica, y su compra o venta es ilegal. En países como México se pueden adquirir libremente en las farmacias, sin que genere alguna infracción legal y, en el caso de Colombia sucede algo similar, pues no están contemplados dentro de la resolución 1478 de 2006, sin embargo, no se encuentran comercialmente disponibles en las farmacias a excepción de la testosterona, por lo cual muchos de ellos son adquiridos a través de páginas de internet.

1.4. Detección de los AAS

Para la detección de sustancias dopantes existen dos matrices, de acuerdo con el Estándar Internacional para Laboratorios (*ISL, del inglés International Standard for Laboratories*) de la AMA. Los anabolizantes se detectan en orina, matriz escogida debido a que muchas sustancias y sus metabolitos se detectan en mayor concentración en ella, además de ser menos invasiva en el momento de recolección de la muestra(36).

En general el análisis de AAS es complejo, debido al gran número de compuestos existentes, su labilidad térmica y su baja volatilidad. Sin embargo, se han desarrollado métodos de *screening* y confirmación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)(1). El uso de monitoreo de reacciones múltiples (MRM), de las

reacciones de fragmentación características de los compuestos de interés, permite la detección cualitativa y cuantitativa de los AAS, que requieren límites de detección tan bajos como 1-2 ng/mL de acuerdo con los MRPL establecidos por la AMA(37).

Las ventanas de detección de los anabolizantes dependen de la concentración y el tipo de AAS que haya sido administrado. Se ha observado que la excreción de los AAS puede variar de días-semanas para esteroides orales y hasta un año después para los ésteres inyectables de acción prolongada(1), además algunos metabolitos pueden aparecer en los primeros días después del consumo y otros son excretados en etapas posteriores; por lo anterior, es importante identificar los metabolitos de las sustancias para ampliar los tiempos en que pueden ser detectadas(38).

Adicionalmente, la lista de sustancias prohibidas, emitida cada año por la AMA, está en constante crecimiento, lo que reta a los laboratorios a estar en un proceso de mejora continua de sus métodos de detección para cumplir con los requisitos exigidos. Esta mejora no solo involucra la continua actualización tecnológica, sino, además, la elucidación del metabolismo de fármacos y la identificación de metabolitos(38).

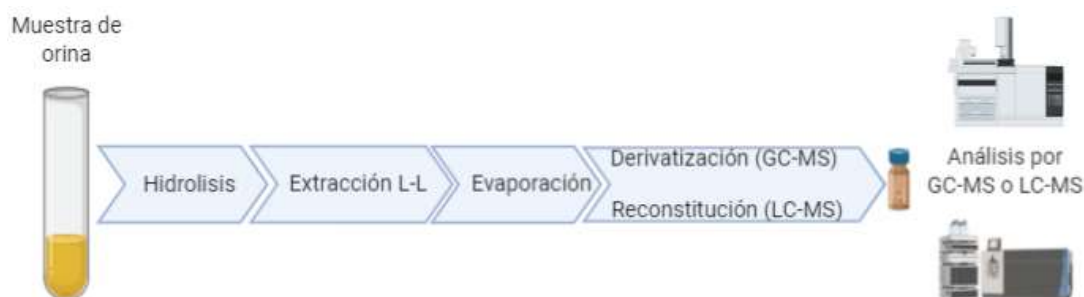
1.4.1. Preparación de la muestra

Los métodos de tamizaje disponibles buscan abarcar la mayor cantidad de sustancias con una sola preparación de la muestra. Para el caso de los anabolizantes la preparación consiste en una hidrólisis de las muestras de orina, donde se rompen los metabolitos conjugados de las sustancias de interés y se lleva a cabo utilizando la enzima β -glucuronidasa. Posteriormente se realiza una extracción un disolvente orgánico apolar como el metil terbutil éter, que una vez realizado el proceso es evaporado(39).

Los extractos secos son reconstituidos y llevados a un vial con inserto en el caso en que el análisis se realice por LC-MS. Cuando el análisis se realiza por GC-MS es necesario realizar una derivatización para darle mayor volatilidad a los AA; en este proceso se realiza la trimetilsililación de la molécula, con la mezcla N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA), 2-mercaptoetanol y yoduro de amonio (NH_4I). Con la derivatización se convierten las funciones hidroxilo y ceto de AAS en sus derivados de éter y enol de trimetilsililo (TMS)(10). Las funciones hidroxilo se derivatizan fácilmente agregando MSTFA, sin embargo, para las funciones ceto es necesario un catalizador que en este caso es el yodotrimetilsilano (TMSI), que es generado *in situ* al agregar NH_4I al MSTFA y hacerlos

reaccionar. El 2-mercaptoetanol se agrega como antioxidante para evitar formación de yodo en la reacción(10). En la **Figura 1-10** se puede ver el esquema general de preparación.

Figura 1-10: Procedimiento general de preparación de muestras



1.5. *Cunninghamella*

Cunninghamella spp. es un hongo filamentoso del orden de Mucorales, escasamente septado, de crecimiento rápido, habitante del suelo y saprófito, especialmente en zonas mediterráneas y subtropicales(14). Se encuentran 14 especies, solo una de ellas es considerada como patógena para los humanos la *Cunninghamella bertholletiae*.(14).

Se sabe que, las especies de este género tienen la capacidad de metabolizar una amplia variedad de xenobióticos de manera regio y estéreo selectiva que son similares a las de los sistemas enzimáticos de mamíferos(14,40).

Por lo general, las cepas más usadas como modelos de biotransformación son *C. elegans* y *Cunninghamella blakesleeana*, estas han sido probadas con distintos tipos de sustancias como anabolizantes(41–43), β -bloqueantes(44), antihistamínicos(45), entre otros, donde se ha obtenido resultados que indican que el modelo es adecuado y permite la predicción de los posibles metabolitos.

El crecimiento del hongo se obtiene en aproximadamente 4 días a una temperatura que oscila entre los 25-27°C.

C. elegans ha sido estudiado como modelo de biotransformación desde hace más de 30 años con diferentes tipos de moléculas, mostrando resultados que se han comparado con

el metabolismo de los mamíferos, en los que se han observado en su mayoría metabolitos de fase I, como hidroxilaciones(42), n-desmetilaciones(46), glucosilaciones(43), oxidaciones(47); en cuanto a metabolitos de fase II se ha reportado la actividad de monooxigenasas(48) y la presencia de UDP-glucuronidasa(49), sin embargo, no hay estudios posteriores que lo confirmen.

Adicionalmente, *C. elegans* puede producir los mismos metabolitos que se encuentran en mamíferos, ya que posee enzimas CYP que le permiten realizar un metabolismo de fase I como las NADH-DCIP reductasa, N-demetilasa, 11- β -hidroxilasa(50), y otras encargadas de las reacciones de fase II, como la UDP-glucosiltransferasa y sulfotransferasa(49).

De acuerdo con *J. Ferris et al.*(48), al evaluar las transformaciones producidas por *C. elegans* en 4-nitroanisole y α -naphthol, se encontraron reacciones de N-desmetilación, O-desmetilación, reducciones de grupo nitro y azo de las moléculas. Además se observaron hidroxilaciones, las cuales son características de las monooxigenasas presentes en el citocromo CYP-450 en células hepáticas(48). Por otra parte, Smith y Rosazza proponen diferentes microorganismos como modelos microbianos del metabolismo en mamíferos, entre ellos *Cunninghamella* y reportan que identifican metabolitos semejantes a los del sistema CYP-450(51).

También, S. Asha, M. Vidyavathi refieren que “el género *Cunninghamella* tiene la capacidad de imitar el metabolismo de los mamíferos y realizar nuevas biotransformaciones”(14), por lo cual se considera que es un modelo apropiado para la evaluación del metabolismo de diferentes sustancias.

2. Justificación

La AMA, define el dopaje como “la ocurrencia de una o más violaciones de las normas antidopaje establecidas en los artículos 2.1 al 2.11 del Código mundial antidopaje, dentro de las cuales se encuentra la presencia de una sustancia prohibida/ métodos o sus metabolitos o marcadores en la muestra de un atleta”. Los esteroides androgénicos anabolizantes constituyen el grupo de sustancias por el cual se reportan cerca del 50% de los hallazgos analíticos adversos a nivel mundial, según los propios reportes de la AMA (52,53).

Los AAS son usados con el fin de mejorar el rendimiento deportivo, aumentar fuerza, disminuir tiempo de recuperación muscular, entre otros(1,54). Sin embargo, puede tener consecuencias en la salud a mediano o largo plazo en aquellas personas, deportistas o aficionados que las consumen. En diversos estudios se ha demostrado que el uso de AAS puede causar depresión y trastornos del comportamiento que incluyen un aumento de la irritabilidad y agresividad, además de otros efectos físicos como atrofia muscular, masculinización en mujeres, efectos sobre el sistema reproductor(25), daño hepático(55,56) y algunas cardiopatías(57,58).

Asimismo, se ha evidenciado que pueden generar adicción fisiológica o psicológica lo que aumenta los riesgos de salud para la población(54).

Por otra parte, la metandienona es uno de los esteroides anabolizantes exógenos más usados en el dopaje, de acuerdo con los reportes de la AMA(4,5), cerca del 10% de los hallazgos analíticos adversos por anabolizantes corresponden a metandienona, de allí el interés de su estudio.

Su metabolismo ha sido estudiado en humanos, permitiendo conocer los metabolitos que se producen durante la biotransformación(3) y estableciendo así los posibles marcadores

de uso, no obstante, para su identificación se requieren técnicas como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y materiales de referencia de las sustancias de interés, estos últimos constituyen tal vez el mayor obstáculo en el momento del análisis pues la síntesis de los mismos se hace compleja debido a la naturaleza de la sustancia y la especificidad que se requiere de la misma.

Por lo anterior, los estudios de metabolismo son necesarios en el análisis de control al dopaje, ya que permiten la identificación de posibles metabolitos, aumentando así la confianza en los resultados emitidos; pues al detectar un metabolito en la muestra indica que la sustancia ha pasado por un proceso de biotransformación en el organismo, lo cual amplía la ventana de detección del compuesto a nivel analítico. En este caso se propone estudiar el metabolismo de la metandienona a través del hongo *C. elegans*, y realizar la identificación de los metabolitos a través de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La actividad metabólica de *Cunninghamella* permite obtener diferentes metabolitos que convergen con la biotransformación humana, sirviendo como soporte en el campo de la investigación de nuevas sustancias químicas(40) y estudios toxicológicos de metabolitos asociados a drogas de abuso(59).

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Estudiar el metabolismo de la metandienona a través de un modelo *in vitro* usando el hongo *Cunninghamella elegans*.

3.2. Objetivos específicos

- Extraer los metabolitos producidos por *Cunninghamella elegans* para metandienona.
- Identificar los metabolitos producidos de metandienona en el modelo metabólico de *Cunninghamella elegans* a través de cromatografía.
- Comparar los metabolitos de metandienona producidos por *Cunninghamella elegans* con los reportados en la literatura.

4. Materiales y Equipos

4.1. Materiales

El material de referencia de metandienona (pureza > 98%) fue obtenido de Sigma-Aldrich y el estándar interno de testosterona-d3 fue obtenido de NMI-Australia. Los medios de cultivo agar de papa dextrosa (PDA) y caldo de papa dextrosa (PDA) fueron adquiridos de Scharlau (Barcelona, España), β -Glucuronidasa de *E. coli* K12 fue obtenida de Roche (Indianapolis, IN, USA) y el dimetilsulfoxido (DMSO) fue obtenido de Sigma-Aldrich. El n-pentano fue obtenido de MerckMillipore y el N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) fue obtenido de Oakwood Products, Inc. El yoduro de amonio (NH_4I) y el 2-mercaptoetanol fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. El buffer de carbonato de sodio (pH 10) y el buffer de fosfato de potasio (0.1 M, pH 7.05) fueron preparados en el Laboratorio de Control al Dopaje, Bogotá, Colombia. El agua fue purificada usando un Sistema de purificación Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, USA).

4.2. Equipos

Cromatógrafo de gases GC 7890B acoplado a un detector selectivo de masas en tándem 5977A marca Agilent Technologies (Delaware, EE. UU.), equipado con una columna capilar HP-1MS (25m x 0,2mm x 0,11 μm).

Software Mass Hunter Acquisition (version B.10.1)

Agitador tipo Vortex

Baño seco con calentamiento digital, Thermo Scientific™

Pipeta repetidora HandyStep™ electronic, Brand®

Baño termostático con recirculación de etanol

Centrífuga ROTANTA 460 R, Hettich

RapidVap Vacuum Evaporation System - Labconco

Incubadora con agitación marca Labtech Modelo LSI-3016A / LSI-3016R, velocidad de agitación: 0 -300rpm, rango de temperaturas 10 – 60 °C con compresor 1/8 HP.

Autoclave Market Forge Sterilmatic.

Micropipeta rango 100-1000µL marca BOECO Germany GP-Series

4.3. Microorganismos

La cepa de referencia utilizada fue *Cunninghamella elegans* FSU 307, obtenida mediante donación del "Hans KnöllInstitut" de la ciudad de Jena – Alemania en cooperación internacional. Las cepas de reserva fueron obtenidas a partir de cepas de referencia. Para el desarrollo del trabajo se hacen repiques periódicos en agar PDA, se incuban a 26°C por 4 días para que ocurra la esporulación del hongo.

4.4. Soluciones

Se empleó metandienona (1µg/mL) preparada en una mezcla de DMSO: agua en una proporción 80:20 y se almacenó a 4°C hasta la realización del ensayo. Se utilizó testosterona-d3 (100 µg/ml) como estándar interno, preparado en metanol y almacenado a 4°C.

5. Métodos

5.1. Biotransformación

La biotransformación se llevó a cabo siguiendo la metodología de Martínez *et al.* (60), modificando la forma de cultivo de la siguiente manera: Una porción de agar de aproximadamente de 1 cm² de área, proveniente de un repique fresco de agar PDA con *C. elegans* FSU 307 fue sembrado en un matraz de 25 mL, que contenía 9 mL de caldo fresco PDA. La incubación de los cultivos se realizó a 26 °C, usando un agitador rotatorio a 20 rpm, durante 4 días, después de los cuales se agregó 1 mL de solución de metandienona (1 mM), para una concentración final de 0,1 mM y se continuó con la incubación por 5 días más. Se tomaron muestras de 500 µL del sobrenadante en el día 1,3 y 5 respectivamente. Paralelamente en cada proceso de biotransformación se realizaron tres controles.

Se realizaron tres réplicas del ensayo, cada una con tres muestras, en dos de ellas se pudo evidenciar el mismo resultado, sin embargo, la última replica no fue posible analizarla debido a las medidas de contingencia decretadas en el marco de la pandemia por covid-19.

5.1.1 Controles usados durante la biotransformación

Se llevaron a cabo tres controles durante todos los procesos de biotransformación de forma paralela: Un control 1 (blanco) solo con caldo fresco PDA sin inoculación con *C. elegans* y sin metandienona para caracterizar las señales generadas por el medio de cultivo. Un control 2 con caldo fresco PDA y metandienona en la misma concentración a la que se realizaron todos los ensayos, sin ser inoculado con *C. elegans*, para evaluar estabilidad y descartar metabolismo "*in situ*" de la metandienona sin el hongo. Un control 3 (negativo) conteniendo caldo fresco PDA inoculado con *C. elegans* FSU 307 y sin metandienona para excluir la posible interferencia generada por el metabolismo del hongo y demás

interacciones con el medio de cultivo. En **Tabla 5-1** se puede observar un resumen de las muestras y controles utilizados durante cada ensayo.

Tabla 5-1. Resumen muestras y controles usados para la biotransformación

	Caldo PDA	<i>C.elegans</i>	Metandienona
Control 1	+	-	-
Control 2	+	-	+
Control 3	+	+	-
Muestras	+	+	+

5.2. Extracción de metandienona y sus metabolitos

La extracción fue realizada siguiendo el procedimiento validado del Laboratorio de Control al Dopaje-Bogotá. Las muestras de 500 μ L de sobrenadante fueron colocadas en un tubo de ensayo, al que se le agregó 750 μ L de Buffer fosfatos pH \sim 7.0, 50 μ L de β -glucuronidasa y 20 μ L de testosterona-d3 (10 μ g/ml), se homogenizó en vortex y se dejó en hidrólisis durante 1 hora, a 60 °C. Una vez hidrolizado se ajustó pH con 250 μ L buffer carbonato pH 9-11. Se adicionaron 5 mL de n-pentano, se tapa y se llevan a un agitador durante 10 min a 20 rpm. Se centrifugó y posteriormente se llevó a un baño termostático frío (\sim -30°C), donde se congela la fase acuosa y se obtiene la fase orgánica que es transferida a un tubo de ensayo nuevo. Se evapora en *rapidvap* con el programa que se muestra en la **Tabla 5-2**.

Tabla 5-2. Programa de secado *Rapidvap*

Paso	Presión(mbar)	RPM	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
1	750-350	200	3	40
2	350	200	10	40
3	350-20	200	2	40
4	20	200	20	40

5.2.1. Derivatización de extractos

Los extractos se derivatizaron con 50µL una mezcla de MSTFA: NH₄I: 2-mercaptoetanol (1000:2:6, v:m: v). Los tubos de ensayo se calentaron a 65 °C durante 30 min. Posteriormente se transfirió a un inserto colocado dentro de un vial para luego ser analizados por GC-MS donde se inyectaron 2 µL.

5.3. Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

El análisis GC-MS se realizó en un cromatógrafo de gases GC 7890A acoplado a un detector selectivo de masas 5977A marca Agilent Technologies (Delaware, EEUU), equipado con una columna capilar HP-1MS (25 m x 0,2 mm x 0,11 µm de tamaño de partícula), en modo de inyección *split* (1:10 a 250°C), con una rampa de temperatura inició a 180 °C durante 2 min, aumentó a 238 °C a 10°C/min. Luego se continuó incrementando a 310 °C a 40 °C/min y se mantuvo por 3,5 min. El tiempo total de corrida fue de 20 min. El gas transportador fue helio en el modo de presión constante. La ionización de la muestra se realizó por impacto electrónico a 70 eV en modo *scan*, monitoreando las masas entre 50 y 700 uma, pues se esperaban metabolitos mono y bi hidroxilados. La temperatura de la fuente de ionización y del cuadrupolo fue de 230 °C y 150 °C respectivamente. El análisis se realizó en las instalaciones del laboratorio de control al dopaje, tomando como referencia el método disponible en el equipo para el mismo analito de metandienona.

El análisis de los datos se llevó a cabo con el software Agilent Mass Hunter Workstation Qualitative Analysis (Versión 10.0.1).

6. Resultados y discusión

En el estudio se identificaron la metandienona y los metabolitos correspondientes producidos después del proceso de biotransformación con *C. elegans*, para lo cual se utilizó GC-MS/EI.

6.1. Desarrollo del modelo de biotransformación

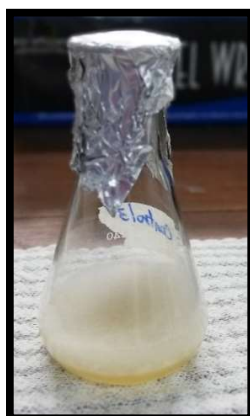
El desarrollo del modelo de biotransformación se llevó a cabo siguiendo la metodología de Martínez et al.(60), se modificó la forma de cultivo, tomando una porción de agar de aproximadamente de 1 cm² de área proveniente de un repique fresco de agar PDA, con *C. elegans* FSU 307, con el fin de facilitar el proceso y obtener un mejor crecimiento del hongo en el caldo. Diferentes autores habían reportado agar *Saboreaud* como medio para el crecimiento del hongo, pues se le considera diferencial para este tipo de microorganismos ya que tiene peptona en su composición, con un pH final de 5,6 (42,61,62), sin embargo, según la literatura el agar PDA también es considerado apto, ya que la infusión de papa provee los una base de nutrientes para el crecimiento de la mayoría de los hongos y su pH final también es de 5,6, siendo uno de los medios más usados para este fin (63); por lo anterior y dada la disponibilidad que se tenía del medio se decide usar este, obteniendo un crecimiento adecuado como se puede apreciar en la en los mismos tiempos reportados por otros autores con el agar *Saboreaud* (61,64,65). En la **Figura 6-1** podemos ver el hongo una vez ha crecido después de 4 días de incubación a 26 °C.

Figura 6-2: *C. elegans* después de 4 días de incubación a 26 °C en agar PDA.



La incubación de los cultivos se realizó a 26°C, temperatura óptima de crecimiento reportada por diferentes autores (66,67), usando un agitador rotatorio a 20 rpm, velocidad agitación que favoreció la esporulación y al mismo tiempo garantizó la disponibilidad de nutrientes permitiendo el crecimiento de la especie, estas condiciones se mantuvieron durante 4 días, después de los cuales se observó el hongo como una capa algodonosa sobre el caldo como se puede ver en la **Figura 6-3**, esto fue el indicador para agregar la metandienona y comenzar el proceso de biotransformación con el que se llevaron a cabo todos los ensayos.

Figura 6-3: *C. elegans* después de 4 días de crecimiento a 26 °C en caldo PDA.



El desarrollo de este modelo tiene diferentes ventajas como son simplificación del sistema de estudio, siendo específico de acuerdo con el interés deseado, su infraestructura y mantenimiento son económicos respecto de otros modelos que requieren condiciones

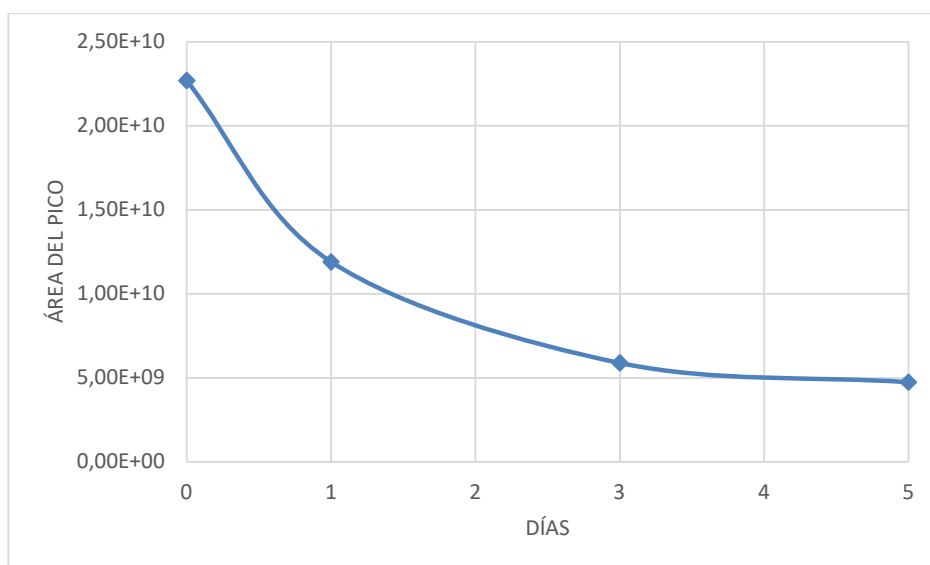
ambientales específicas y finalmente evita los problemas éticos asociados al uso de modelos animales.

6.1.1. Actividad metabólica del modelo

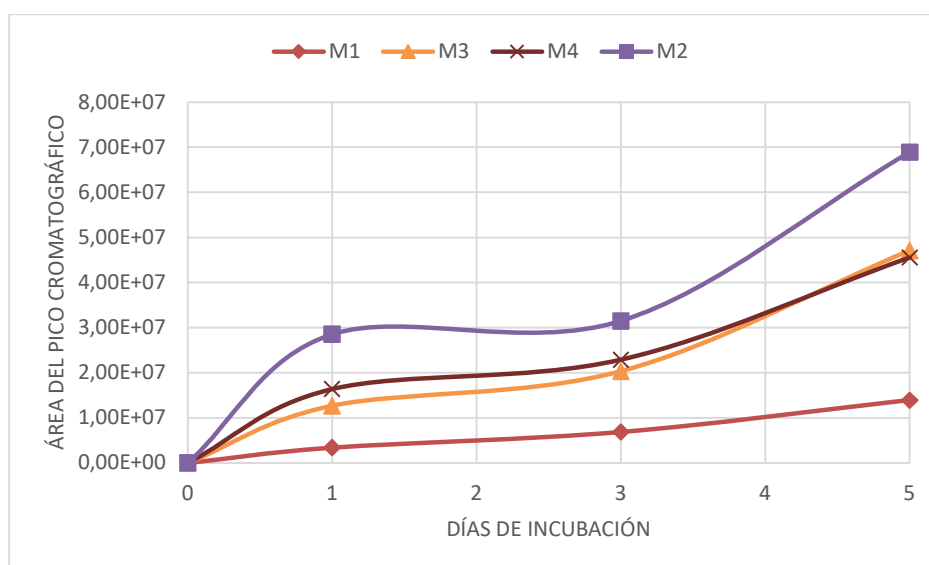
Se determinó gracias a los controles establecidos en los experimentos que el porcentaje de metabolización de la metandienona fue del 84 % después de un tiempo de incubación de 5 días como se puede observar en la **Gráfica 6-1**, donde visualiza que área bajo la curva del pico cromatográfico va disminuyendo con el pasar de los días, lo que está relacionado con las reacciones metabólicas que ocurrieron por el sistema enzimático presente en el hongo.

También se evidenció que los metabolitos comenzaron a aparecer desde el día 1 de la incubación, hay un aumento del área en los mismos a medida que pasan los días como se puede apreciar en la **Gráfica 6-2**, lo que coincide con la disminución en el área de la metandienona que se describió previamente. Se observa también que el metabolito 2 (M2) es que tiene mayor área de pico, el metabolito 3 (M3) y el metabolito (M4) tienen la intensidad de sus áreas parecidas entre ellos y el metabolito 1 (M1), es el que aparece en menor intensidad.

Gráfica 6-1: Metabolización de la metandienona después de 5 días de incubación

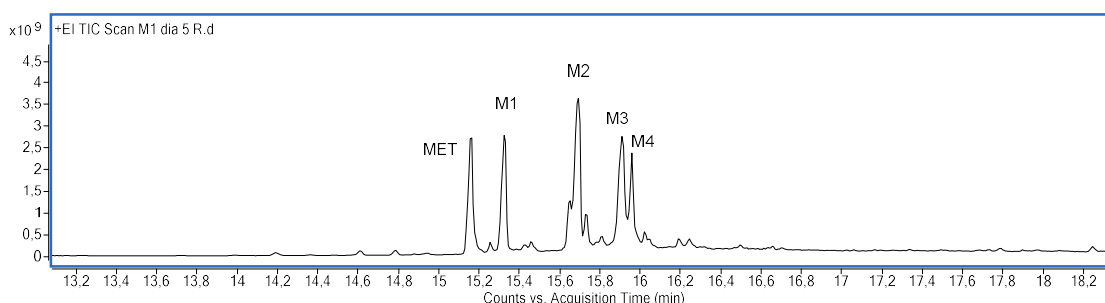


Gráfica 6-2: Respuesta analítica para metabolitos mayoritarios después de 5 días incubación



Se evaluó también el perfil cromatográfico en el día 5 producto del proceso de biotransformación llevado a cabo por *C. elegans* que se puede apreciar en la **Figura 6-4**, donde se identificaron cuatro metabolitos principales de la metandienona, para esto se tuvieron en cuenta los patrones de fragmentación que se presentaron en cada caso y se plantearon los patrones de fragmentación correspondientes. Con base en la literatura, la especie *Cunninghamella* posee enzimas monooxigenasas análogas al del sistema citocromo p450 de los mamíferos(14), por lo que se plantea que los metabolitos obtenidos en su mayoría son derivados monohidroxilados de la metandienona en distintas posiciones.

Figura 6-4: Perfil cromatográfico del metabolismo de metandienona con *C. elegans*, después de 5 días de incubación.



6.2. Extracción de los metabolitos de metandienona

La extracción de los metabolitos obtenidos se realizó siguiendo el procedimiento del Laboratorio de Control al Dopaje-Bogotá, sin embargo, este no permite la identificación de metabolitos de fase II, debido a que lleva implícita la hidrólisis de la muestra; razón por la cual se realizaron experimentos omitiendo el paso de la hidrólisis y pasando directamente a realizar una extracción líquido-líquido a pH básico, según lo descrito por Schänzer(16). Se utilizó n-pentano como disolvente de extracción debido a que el porcentaje de recuperación de la metandienona es mayor al usar ese disolvente. Se obtuvieron así los mismos metabolitos ya mencionados, lo que indica que los metabolitos producidos se excretan en forma libre y corresponden a metabolitos de fase I.

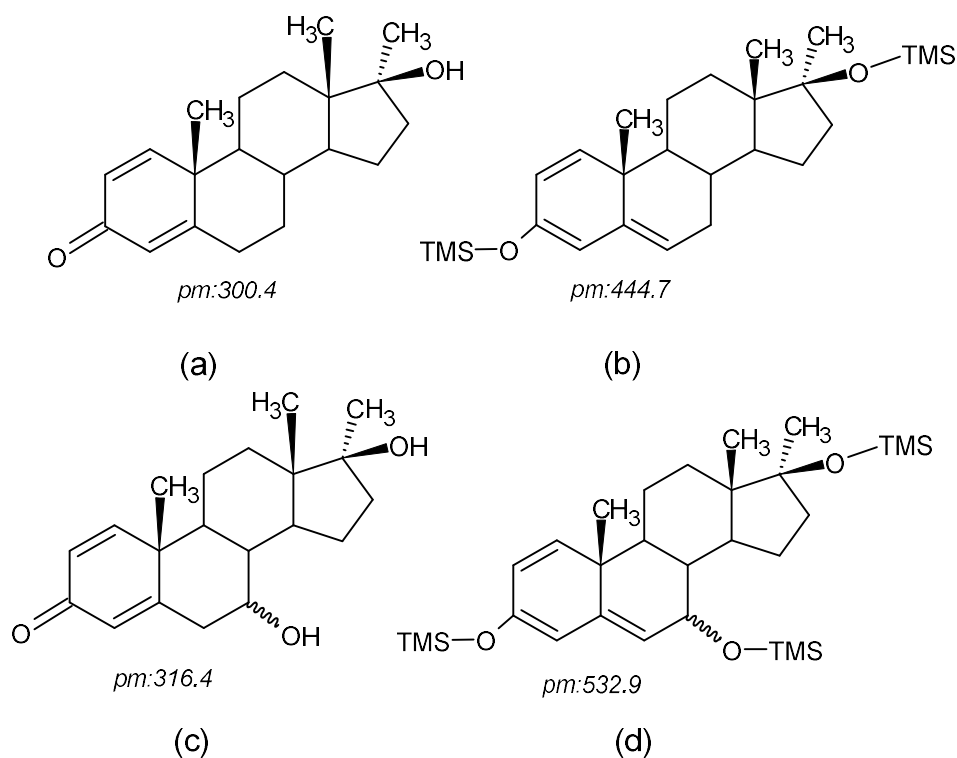
Estos resultados concuerdan con lo reportado en literatura para la metandienona ya que la mayoría de sus metabolitos son excretados en forma libre y corresponden a metabolitos de fase I(3), además también coincide con lo reportado para *C.elegans* y la capacidad enzimática con la que cuenta para generar este tipo de reacciones (14).

6.3. Identificación de metabolitos de metandienona a través del modelo *C. elegans*

En el modelo estudiado se encontraron cuatro metabolitos de fase I. Para su identificación fue empleado un proceso de derivatización con TMS, utilizando una mezcla MSTFA: NH₄I: 2-mercaptoetanol, la cual permite derivatizar los grupos ceto e hidroxilos presentes en la estructura como se muestra en la **Figura 6-5**; esta mezcla se utiliza pues, aunque MSTFA es una buena elección, las funciones de alcohol terciario no se derivatizan solo con este reactivo. TMSI, es el agente más usado para la obtención de derivados enol-TMS, para lo cual se mezcla MSTFA con yoduro de amonio y se agrega un agente reductor que en este caso es el 2-mercaptoetanol que evita la formación de iones yoduro durante la reacción (16,68–70).

Los extractos obtenidos fueron analizados por cromatografía de gases acoplados a espectrometría de masas en el modo de adquisición de datos *Scan*, empleando un rango de masas de 50 a 700 dalton, obteniendo un cromatograma de corriente total iónica (TIC, *Total ion chromatogram*).

Figura 6-5: (a) Metandienona sin derivatizar, (b) Metandienona derivatizada con TMS, (c) metabolito 1 sin derivatizar, (d) metabolito 1 derivatizado con TMS



Para el análisis de los datos, se compararon los ensayos con *C. elegans* junto con los tres controles, un control blanco que contenía solo caldo PDA que permitió caracterizar las señales generadas por el medio de cultivo, un control 2 con caldo PDA y metandienona, en este se evidenciaron algunas señales, sin embargo, en el momento de realizar el análisis del espectro de masas no corresponde a ningún metabolito relacionado de la misma lo que permitió excluir la degradación no metabólica de la metandienona y un control negativo que contenía caldo PDA junto con la cepa de *C. elegans* FSU 307 que permitió identificar y aislar interferencias pertenecientes a la matriz fúngica, como se puede ver en **Figura 6-6** y **Figura 6-7**. Se empleó el cromatograma de ion extraído, utilizando el derivatizada ion m/z 532, característico de derivados hidroxilados de la metandienona. En los controles se evidencia un pico en el tiempo de retención 15,64 min, lo cual se observa en la **Figura 6-7**, cuya intensidad en el control 1 y control 2 es similar y en el control 3 se ve disminuida lo cual indica que puede ser algún nutriente presente en el medio que al estar presente el hongo es consumido por el mismo. Se realizó el análisis del espectro de masas de este pico a través de la librería NIST, y no corresponde con un patrón de una sustancia anabolizante o sustancia conocida por lo que fue posible su identificación.

Figura 6-6: Perfil cromatográfico de los controles Control 1, Control 2, Control 3, comparados con las muestras Muestra 1, Muestra 2, Muestra 3, después de 5 días de incubación a 26 °C.

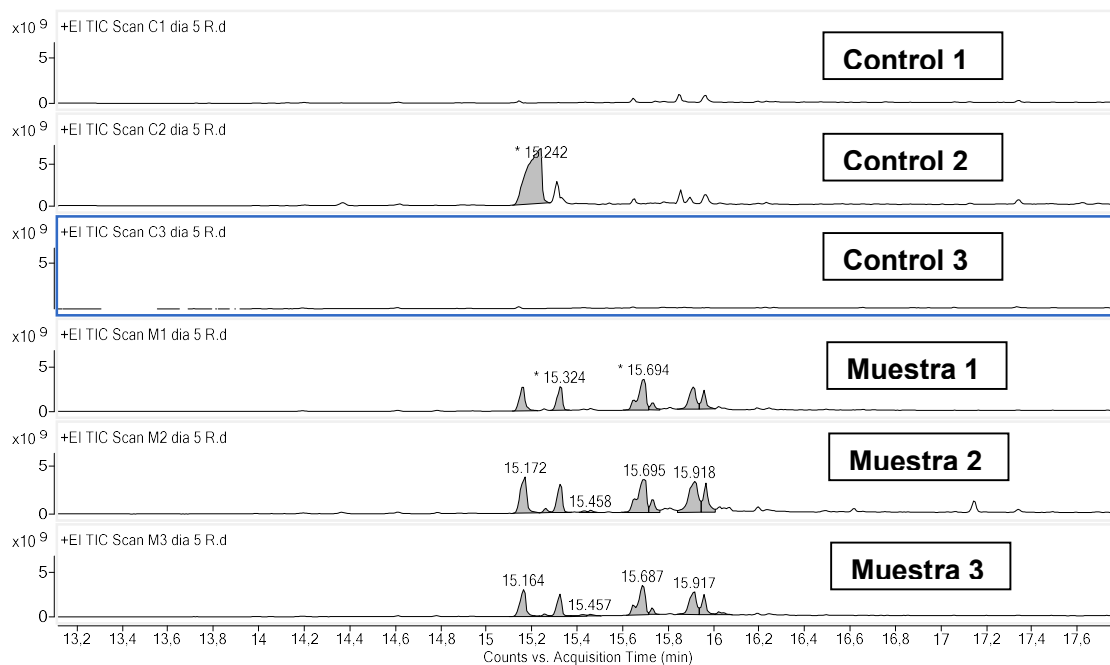
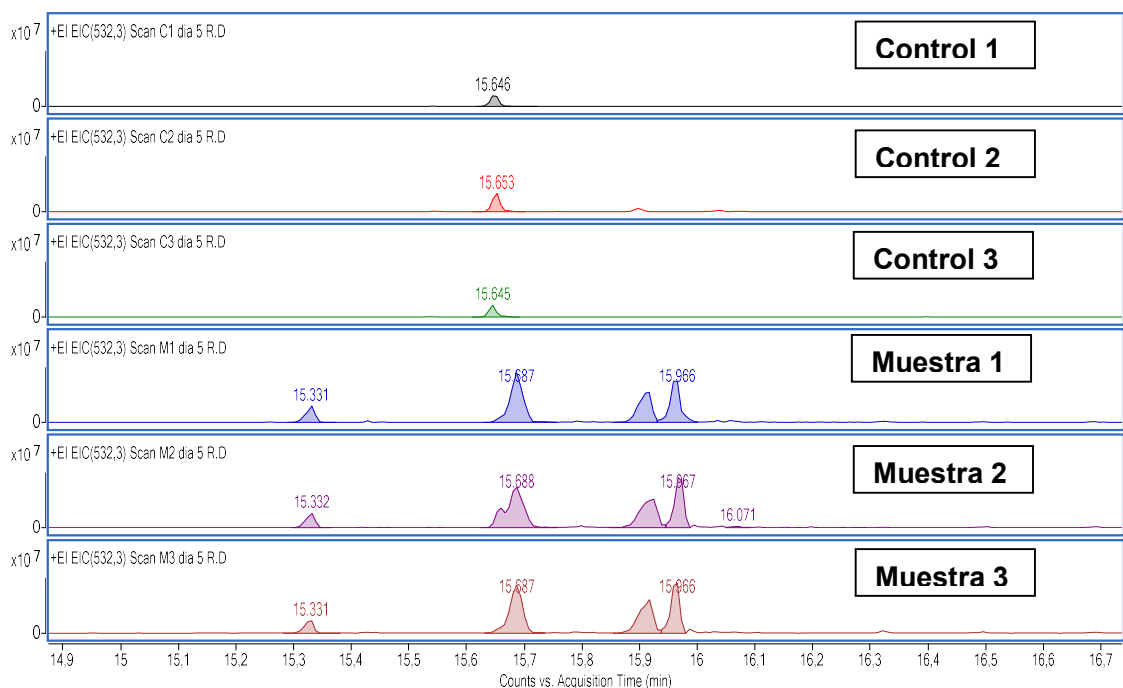


Figura 6-7: Perfil cromatográfico ion extraído 532,3 (EIC), de los controles Control 1, Control 2, Control 3, comparados con las muestras Muestra 1, Muestra 2, Muestra 3 y Muestra 4 después de 5 días de incubación a 26 °C.

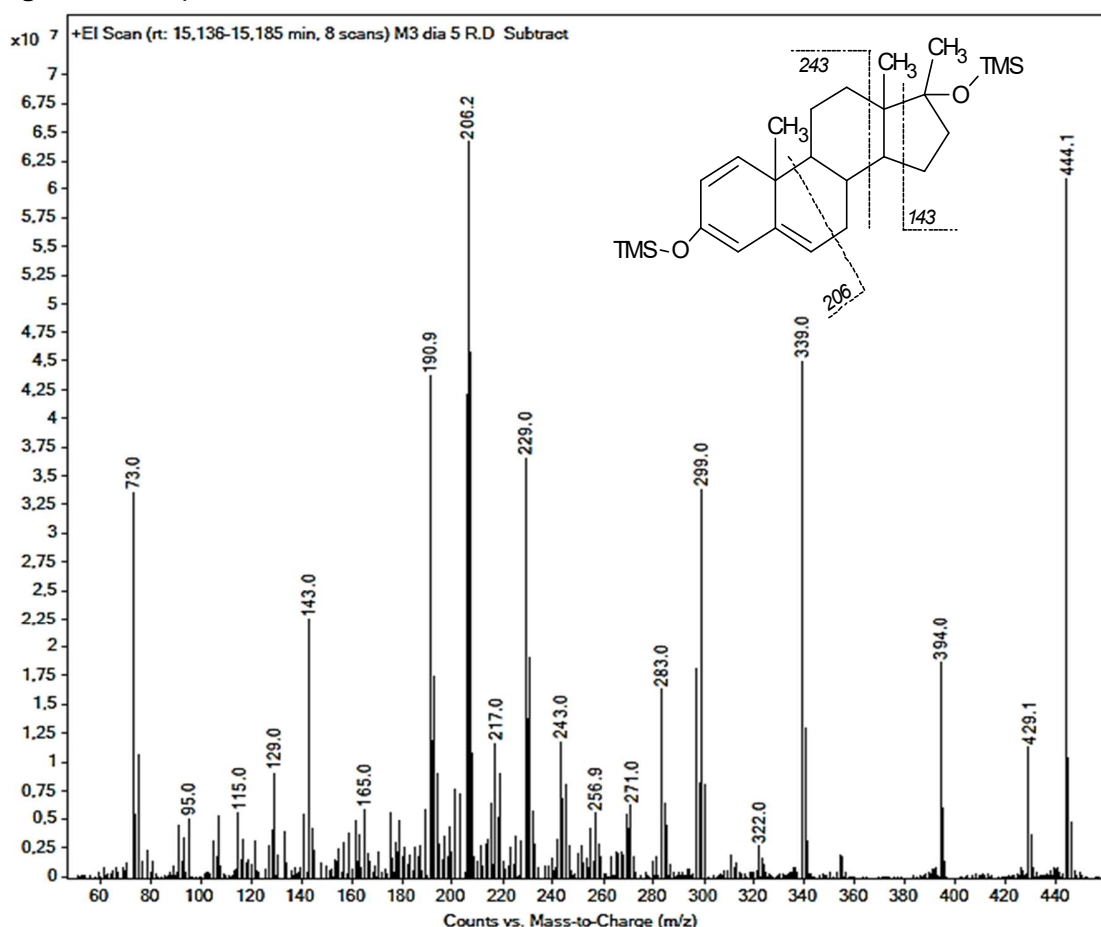


6.3.1. Análisis por espectrometría de masas de la metandienona derivatizada

Se estudiaron los cromatogramas de ion extraído en las muestras, con el fin de identificar en primera instancia si la metandienona como compuesto padre o de partida, se encuentra presente al finalizar los diferentes ensayos con *C. elegans*.

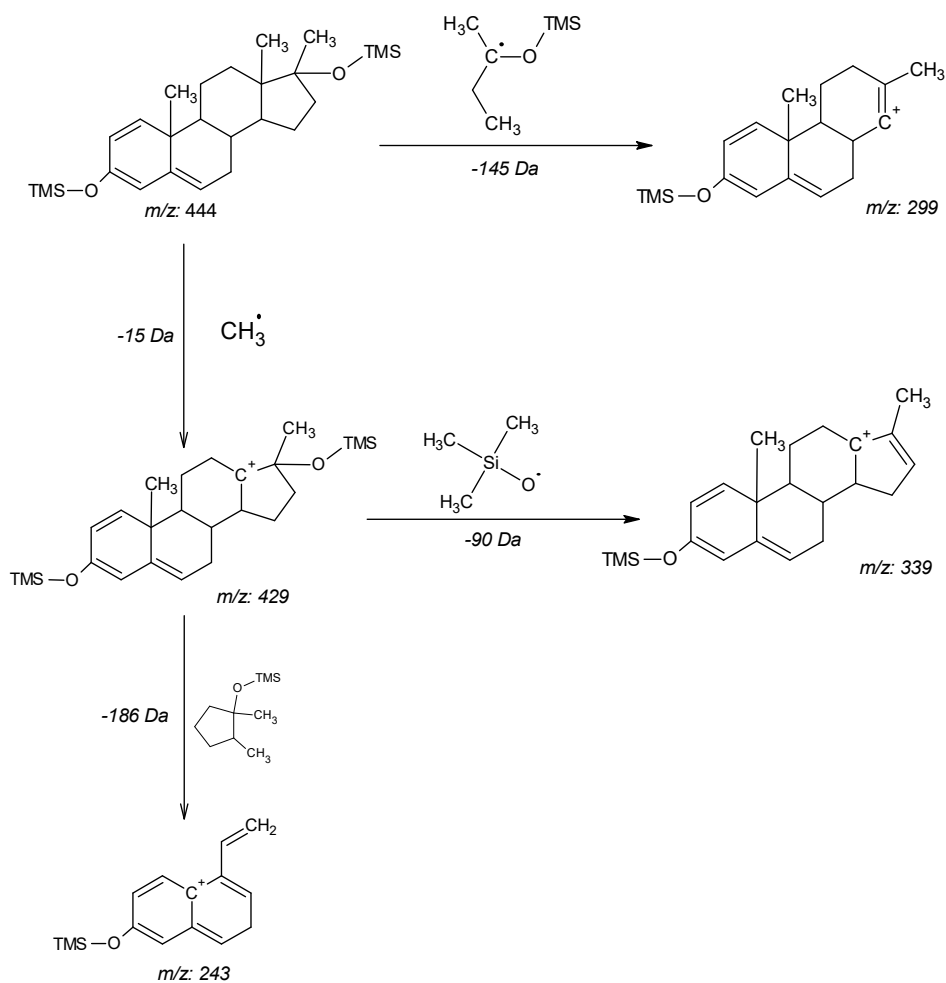
Se analizó el espectro de masas de la metandienona derivatizada con TMS, como se puede ver en la

Figura 6-8. En este caso se puede observar el ion molecular y iones fragmento característicos de la misma, además se ve el ion fragmento m/z 73, que corresponde con el radical trimetilsililo, comúnmente observado en los compuestos derivatizados con TMS. Se propone su patrón de fragmentación basado en las reglas generales de fragmentación descritas en la literatura (71).

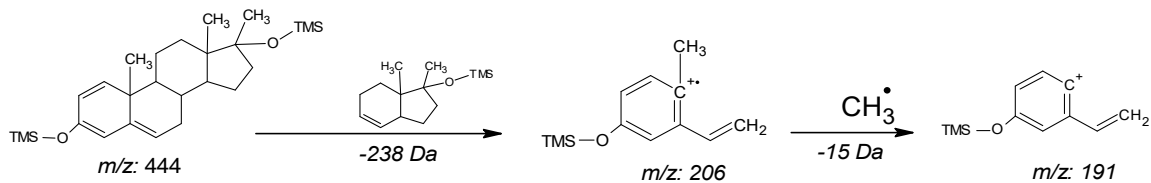
Figura 6-8: Espectro de masas metandienona *bis*-TMS

En la **Figura 6-9**, se observa el ion molecular de la metandienona *bis*-TMS con m/z 444, el cual puede tener una ruptura alquílica con la salida de un radical metilo (-15Da), formando el catión de m/z 429, posteriormente ocurre una eliminación de una molécula neutra inducida por un heteroátomo y migración de un átomo de hidrógeno proveniente de la posición 16, generando la salida de una molécula neutra de HOTMS(-90Da), formando el ion fragmento m/z 339. Adicionalmente el ion fragmento m/z 429 puede sufrir migraciones de átomos de hidrógenos a través de estados cuadríclicos y formar el ion fragmento m/z 243.

Asimismo, el ion molecular m/z 444 puede tener una ruptura simple en el pentaciclo que corresponde al anillo D de la molécula formando del ion fragmento m/z 299.

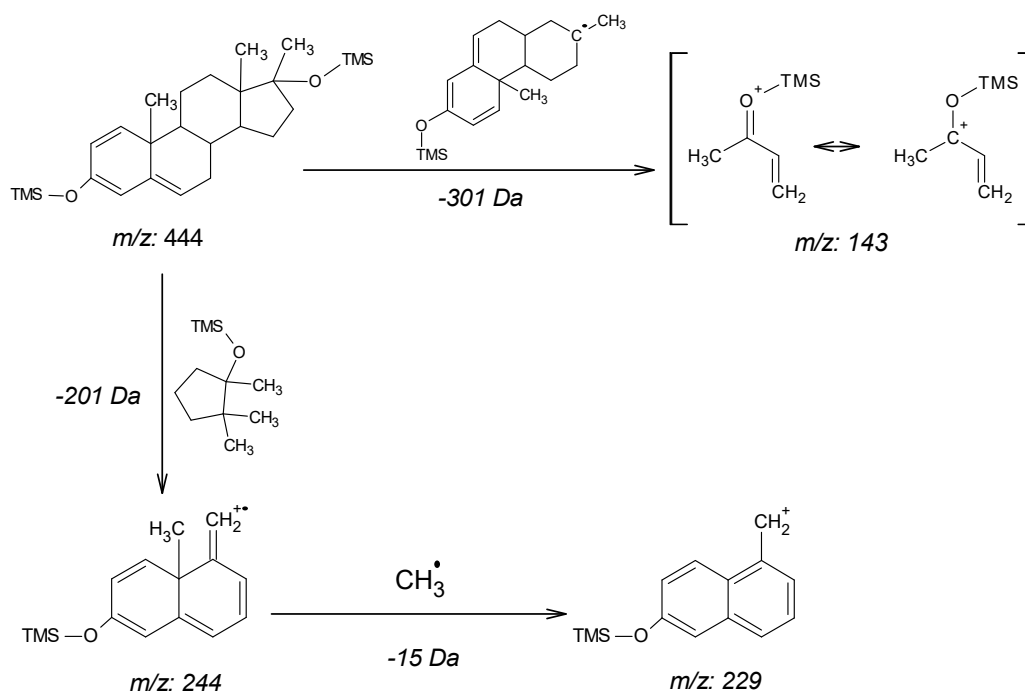
Figura 6-9: Patrón de fragmentación propuesto de la metandienona *bis*-TMS parte 1

En la **Figura 6-10**, se observa una ruptura del tipo retro *Diels-Alder*, del ion molecular m/z 444 con la formación del ion fragmento m/z 206 y una posterior ruptura alquílica con pérdida de un radical metilo (-15Da).

Figura 6-10: Patrón de fragmentación propuesto de la metandienona *bis*-TMS parte 2

En la **Figura 6-11**, se observa una ruptura simple en el enlace beta con respecto al heteroátomo y formación del ion onio m/z 143, la formación del ion fragmento m/z 244 se da por la migración de átomos de hidrógeno a través de estados cuadríciclicos.

Figura 6-11: Patrón de fragmentación propuesto de la metandienona *bis*-TMS parte 3



6.3.2. Identificación del metabolito 1 (M1)

La identificación M1 se realizó con el espectro de masas que se puede ver en la

Figura 6-12, la presencia del ion m/z 532 indica que la molécula presenta una hidroxilación, que en este caso se encuentra derivatizada con TMS, lo que suma 90 unidades al ion molecular de la metandienona justificando la aparición de este pico, en este y los demás metabolitos identificados. En la **Figura 6-13** y **Figura 6-14** se propone el patrón de fragmentación ubicando el hidroxilo en la posición 7. Se observa inicialmente una desmetilación para obtener el ion m/z 517, posteriormente ocurren eliminaciones de una molécula neutra inducida por un heteroátomo y migración de un átomo de hidrógeno,

generando la salida de HOTMS(-90Da), formando los iones fragmento m/z 427 y m/z 339 respectivamente; esto ocurre también para los iones m/z 442 y m/z 352. Adicionalmente el ion fragmento m/z 532 puede sufrir migraciones de átomos de hidrógenos a través de estados cuadríciclicos y formar los iones fragmento m/z 348 y m/z 294.

Figura 6-12: Espectro de masas del metabolito 1 (TR 15.30)

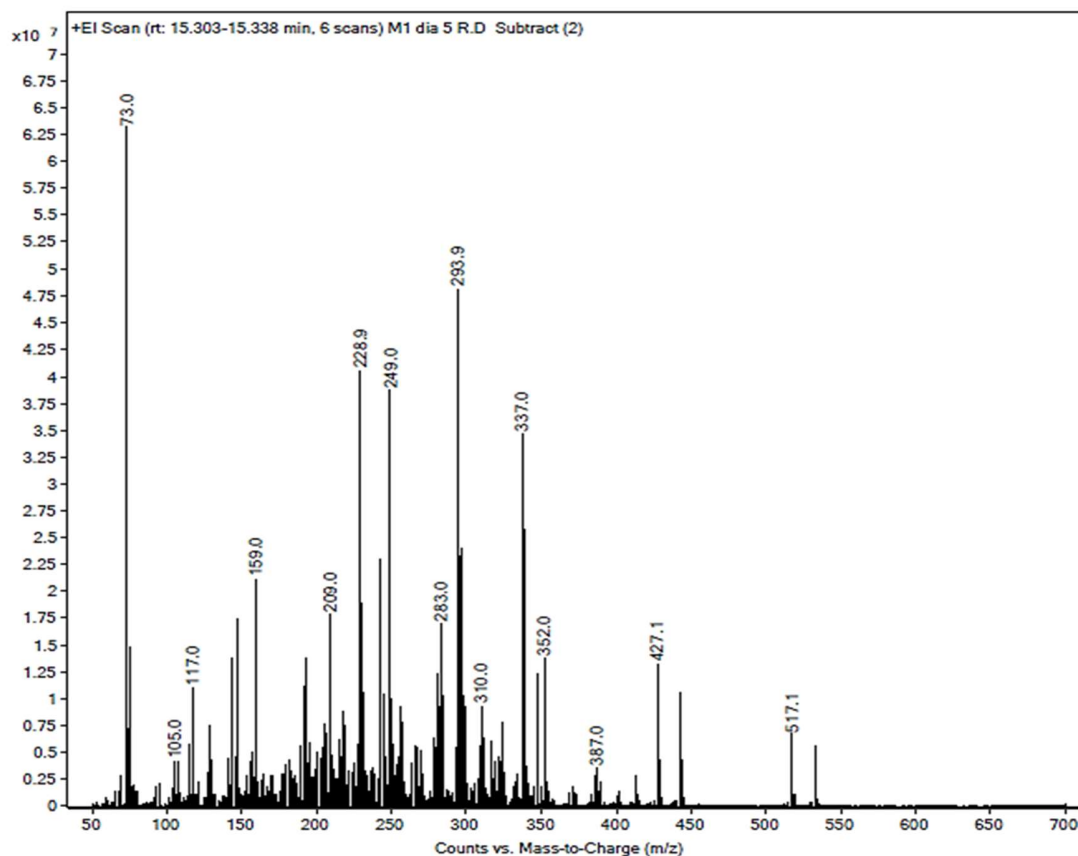


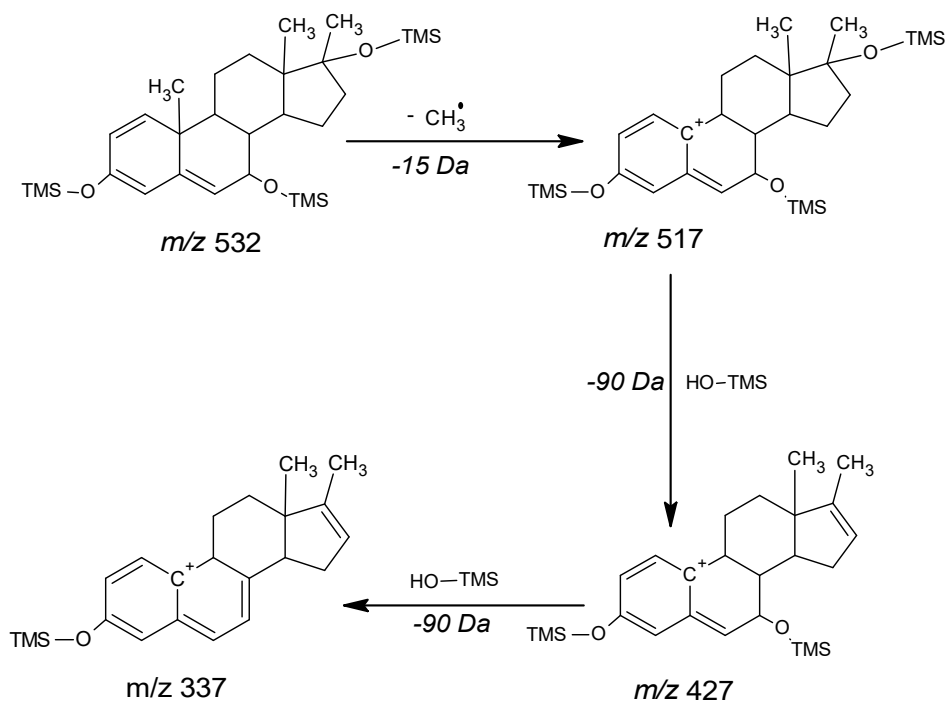
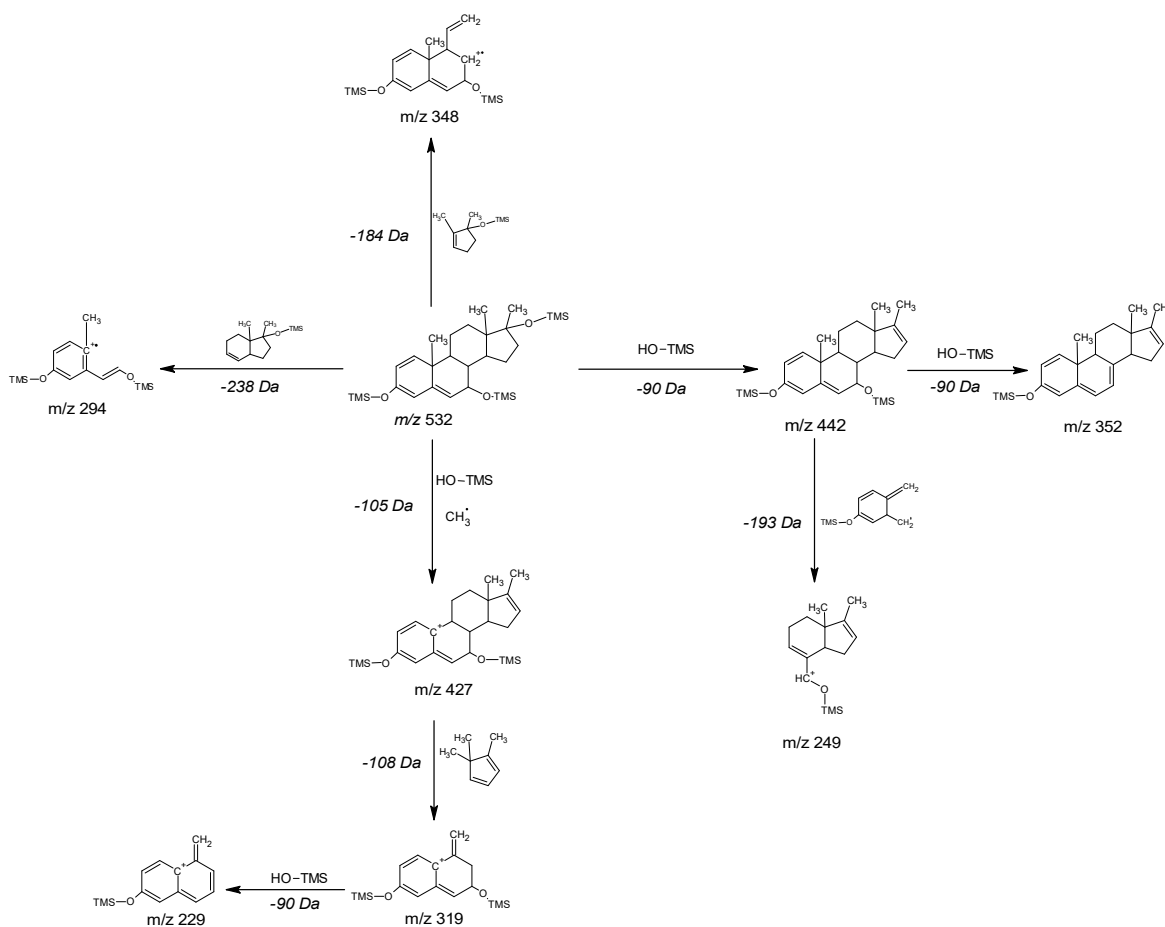
Figura 6-13: Patrón de fragmentación del metabolito 1 parte 1

Figura 6-14: Patrón de fragmentación del metabolito 1 parte 2

6.3.3. Identificación del metabolito 2 (M2)

En cuanto al metabolito 2 se obtiene un espectro de masas que se ve en la

Figura 6-15. También hay presencia del ion 532, indicando una hidroxilación en la molécula al sumar 90 unidades al ion molecular de la metandienona. La identificación plena de este metabolito no pudo ser llevada a cabo razón por la cual se proponen dos posibles metabolitos hidroxilados, uno en la posición 15 y otro en la posición 7, isómero del metabolito 1. El patrón de fragmentación propuesto para el metabolito hidroxilado en la posición 15 es el que se observa en la **Figura 6-16**. Donde se ve una desmetilación y se forma el ion m/z 517, luego se presentan eliminaciones de una molécula neutra inducida por un heteroátomo y migración de un átomo de hidrógeno, generando la salida de una

molécula de HOTMS(-90Da), formando los iones fragmento m/z 427 y m/z 337; esta misma reacción sucede también para los iones m/z 442 y m/z 352. La presencia del ion m/z 206 se da una ruptura del tipo retro *Diels-Alder* del ion molecular m/z 352.

En cuanto a la propuesta del metabolito hidroxilado en la posición 7, su patrón de fragmentación sería igual al propuesto para el metabolito 1, propuesto en la **figura 6.12** y **6.13**. Este tipo de metabolitos y sus isómeros se han descrito en otros trabajos de investigación con *C.elegans*(6,64). Así mismo en el laboratorio de control al Dopaje con la misma rampa de temperatura y la misma columna se han podido diferenciar isómeros, como por ejemplo 5α androstanediol y 5β androstanediol, marcadores del perfil esteroideal referenciados en el documento técnico de la WADA(72).

Figura 6-15: Espectro de masas del metabolito 2 (TR 15.63)

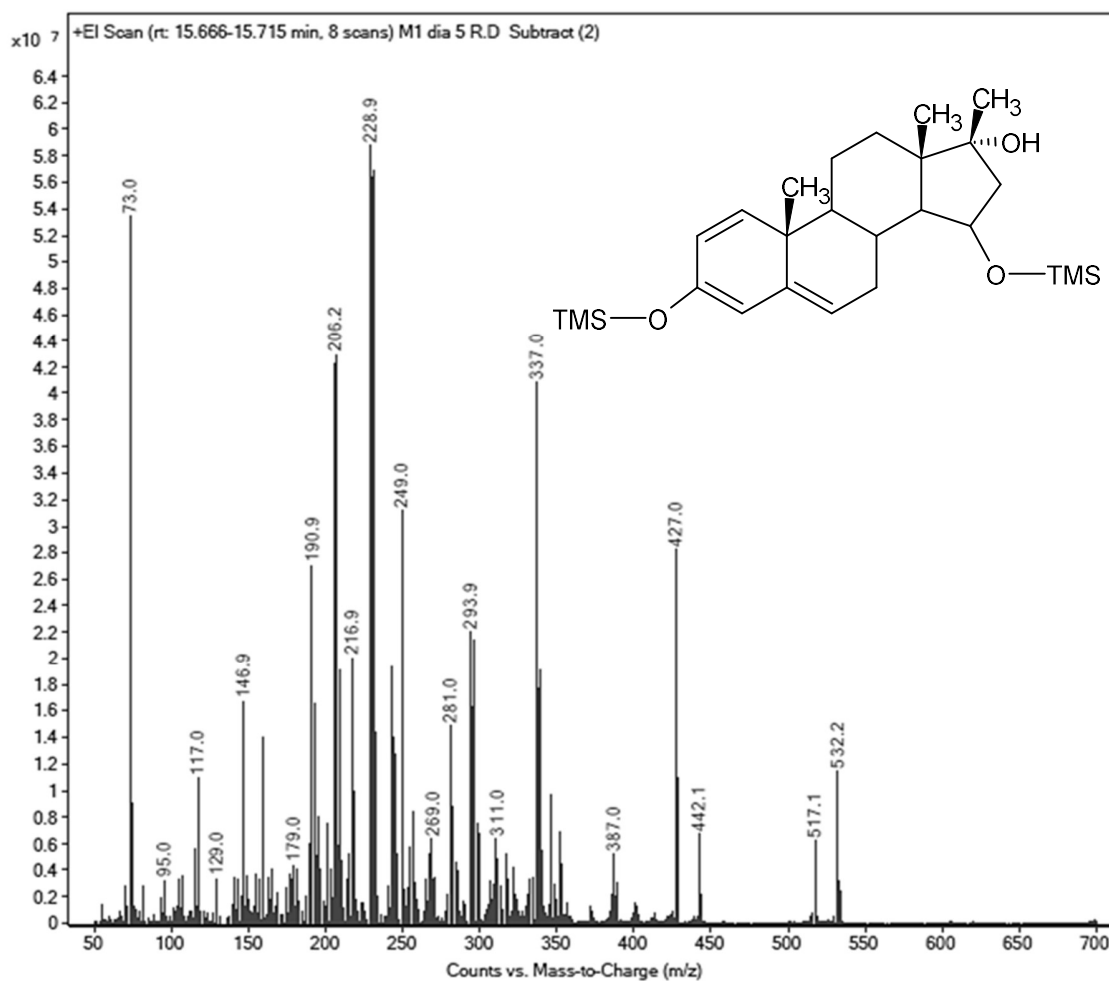
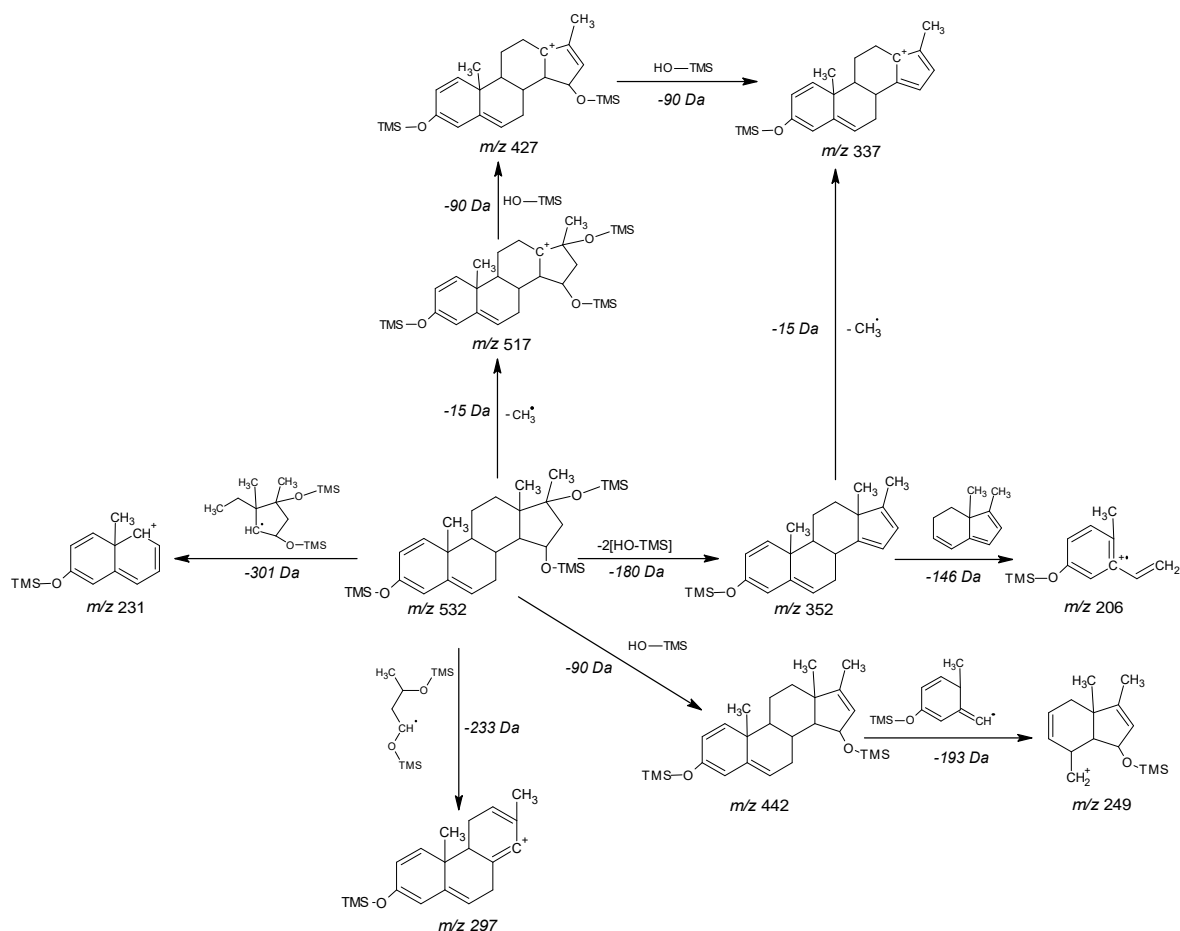


Figura 6-16: Patrón de fragmentación propuesto para el metabolito 2

6.3.4. Identificación del metabolito 3 (M3)

El metabolito 3, se identificó a través de la comparación con el material de referencia de la 6 β -hidroximetandienona y no con la librería NIST, coincidiendo con su tiempo de retención y espectro de masas. En la librería está disponible el espectro del metabolito con uno y dos TMS respectivamente, posiblemente debido a que se usa MSTFA solo como agente derivatizante, que se une únicamente a los grupos hidroxilo, mientras que las condiciones utilizadas en el laboratorio permiten la derivatización de los grupos ceto e hidroxilos presentes en la molécula. De acuerdo con *Donike et al*(3), este es el metabolito mayoritario en el humano. Este metabolito también ha sido encontrada con otros modelos de biotransformación como ratones con células de hígado humano(5). El

patrón de fragmentación obtenido se puede ver en la **Figura 6-17**: Patrón de fragmentación del metabolito 3 (TR 15,88)

y se puede observar su similitud con el obtenido para el material de referencia de la 6 β -hidroximetandienona en la **Figura 6-17**.

Figura 6-17: Patrón de fragmentación del metabolito 3 (TR 15,88)

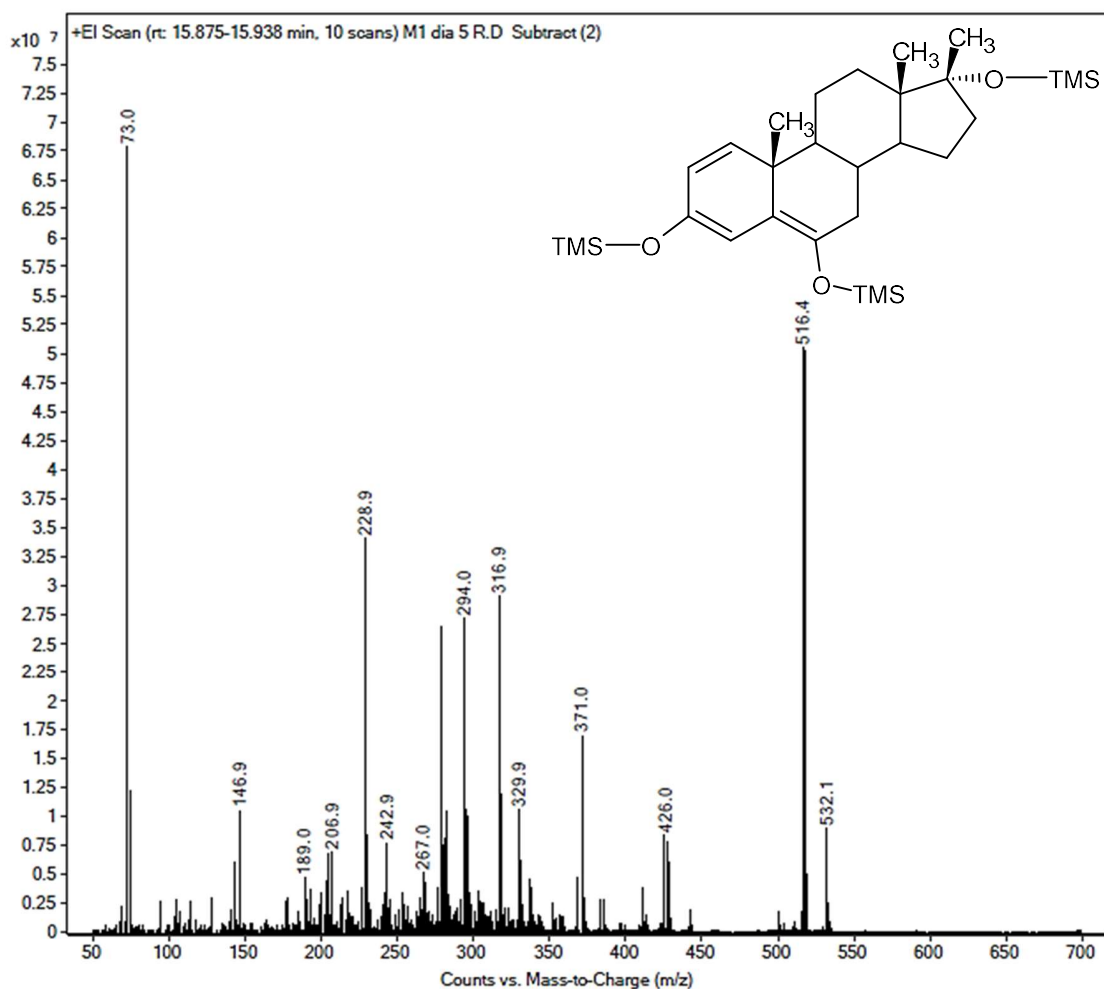
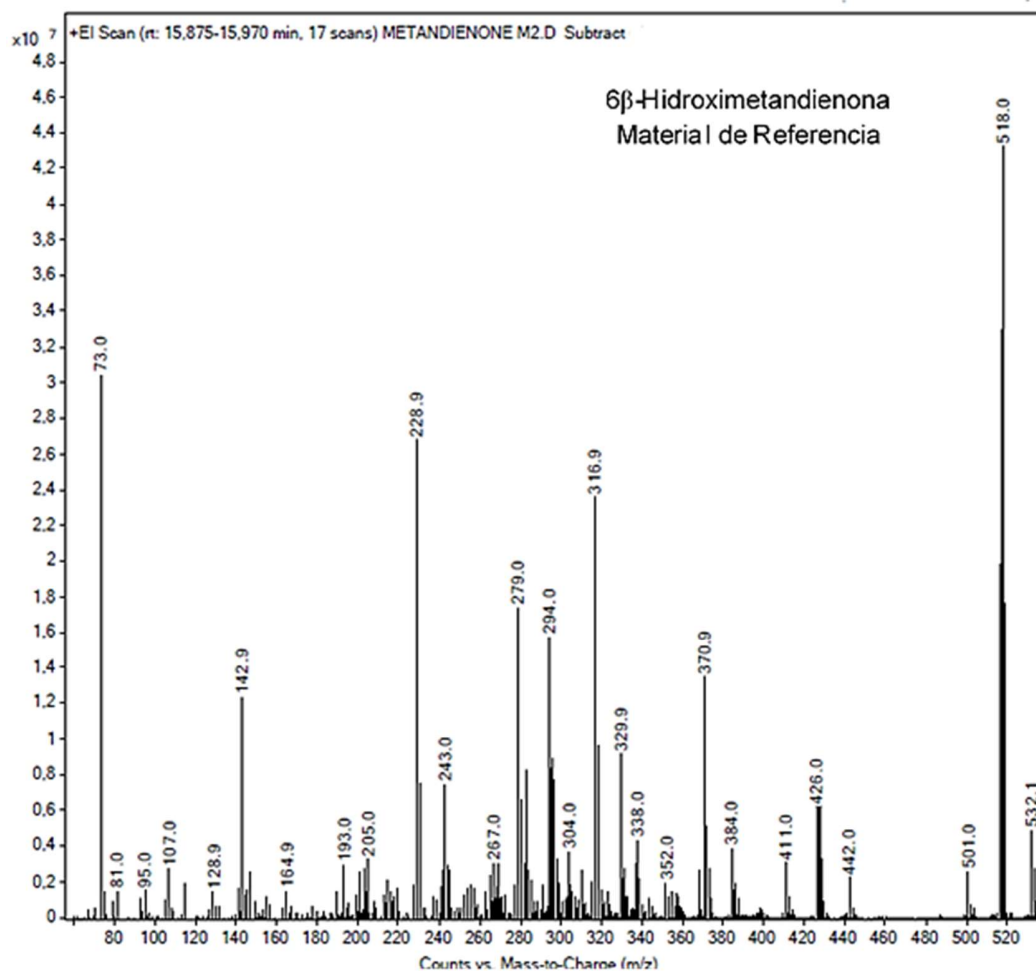
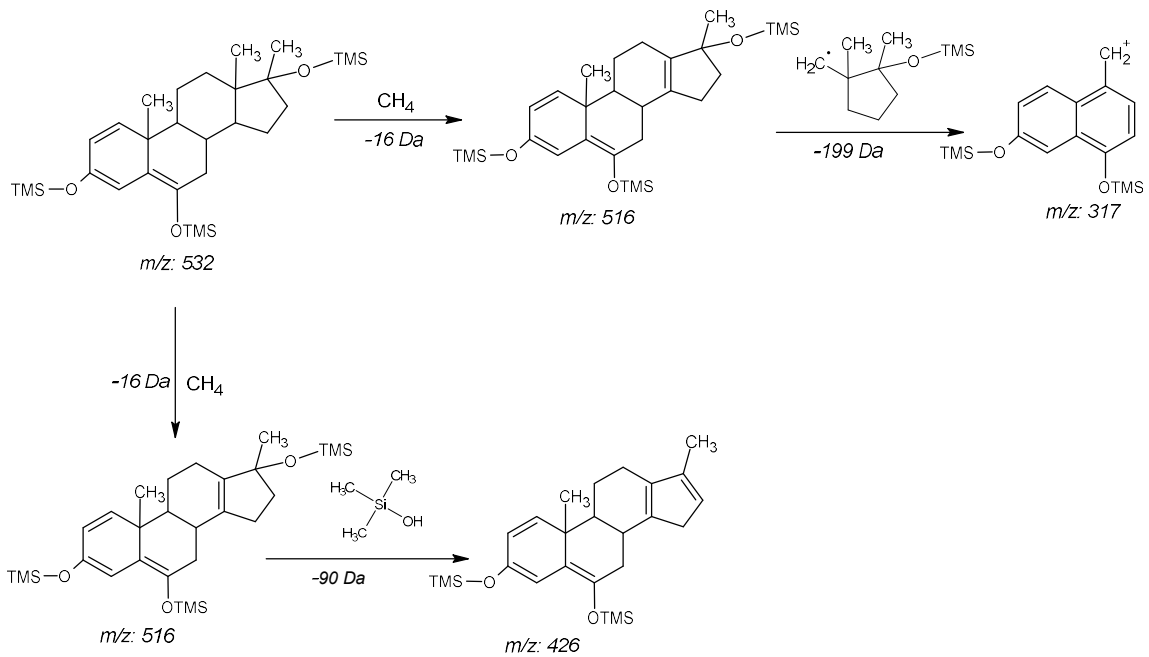


Figura 6-18: Patrón de fragmentación de la 6 β -hidroximetandienona material de referencia (TR 15,88)

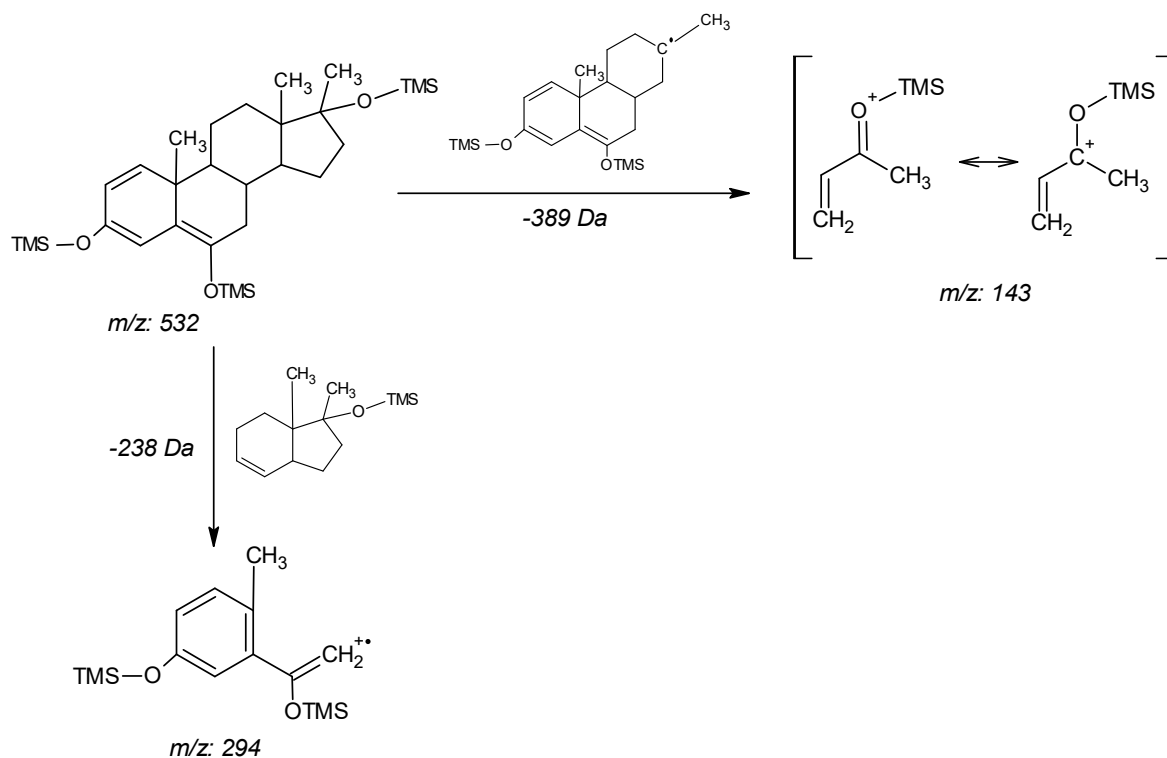


En la **Figura 6-19**, el ion fragmento m/z 516 se da por la pérdida de una molécula neutra de metano a través de la migración de un átomo de hidrógeno proveniente de la posición 14 de la molécula, a partir de allí pueden darse migraciones de hidrógeno que produzcan los iones fragmento m/z 426 y m/z 317.

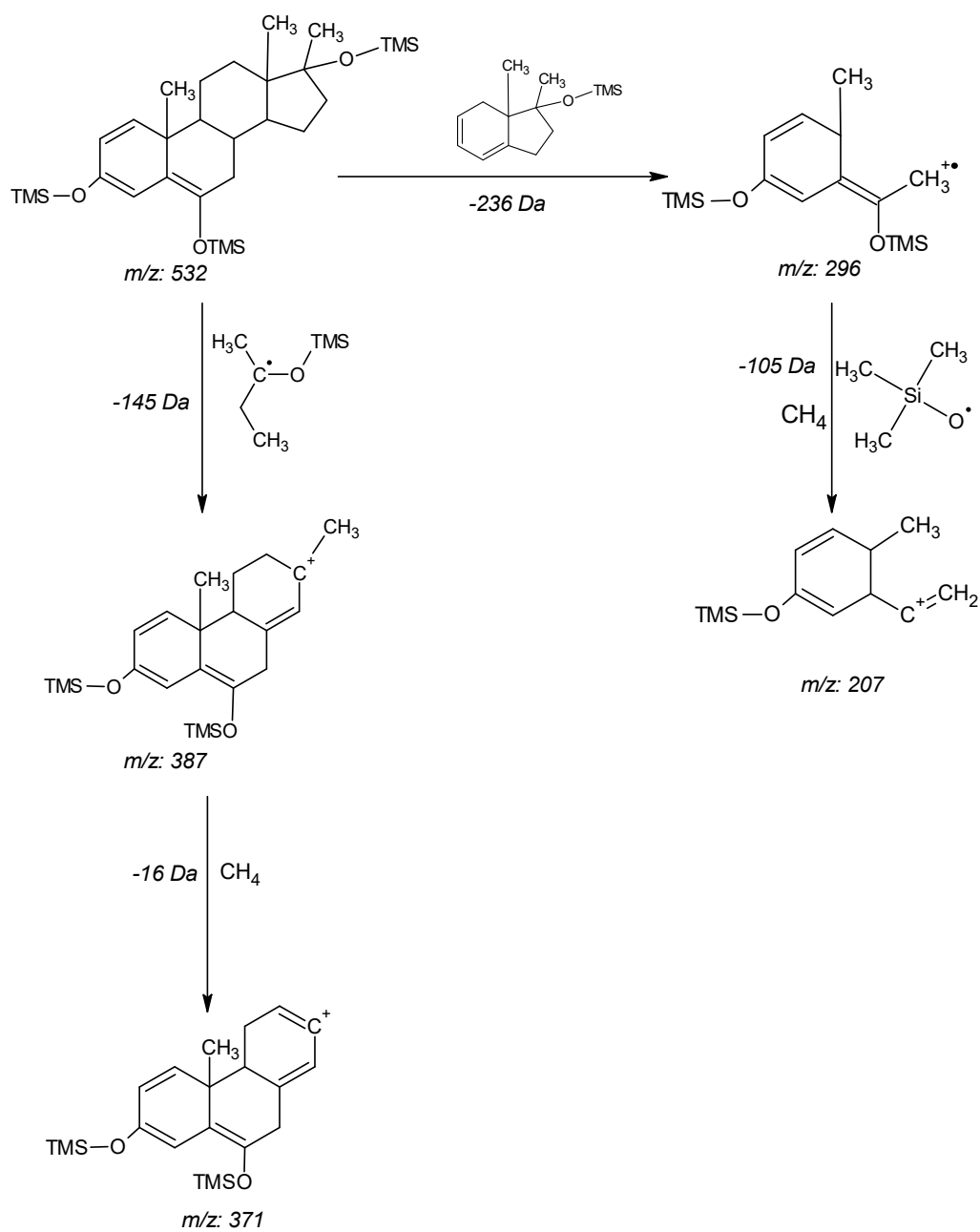
Figura 6-19: Patrón de fragmentación del metabolito 3 parte 1

En la **Figura 6-20**, se puede ver la formación del ion fragmento m/z 294 a partir de la migración de hidrógenos de estados cuadríclicos y una ruptura simple para la formación del ion onio m/z 143.

Figura 6-20: Patrón de fragmentación del metabolito 3 parte 2



También ocurre la formación de los iones fragmento m/z 296 y m/z 387 a partir de la migración de hidrógenos de estados cuadríclicos, para el ion fragmento m/z 207 hay también una ruptura simple con pérdida de un metano como se observa en la **Figura 6-21**.

Figura 6-21: Patrón de fragmentación del metabolito 3 parte 3

6.3.5. Identificación del metabolito 4 (M4)

Para el metabolito 4, se puede observar el espectro de masas en la **Figura 6-231**, con presencia del ion 532 como indicador de una hidroxilación, esta vez en la posición 14. En la **Figura 6-23** se propone el patrón de fragmentaciones, donde se da formación del ion onio de m/z 143 gracias a una ruptura simple con pérdida de 389 Da. Además, hay una pérdida sucesiva del radical metilo (15 Da) por lo que se presentan los iones fragmento m/z 517 y m/z 427, a partir de este último hay una eliminación de una molécula neutra HX con participación de átomos de hidrógeno provenientes de diferentes posiciones de la molécula, correspondiente a la salida de un HOTMS (90Da), formando el ion fragmento m/z 337. Posteriormente se presenta una ruptura alílica con transposición de un átomo de hidrógeno para formar el ion fragmento m/z 297. El ion fragmento m/z 259 cuya intensidad es alta en este caso y no se había observado en los espectros anteriores, se forma por la migración de un átomo de hidrógeno, a través de un estado de transición cuadrícíclico y sugiere la hidroxilación en la posición 14.

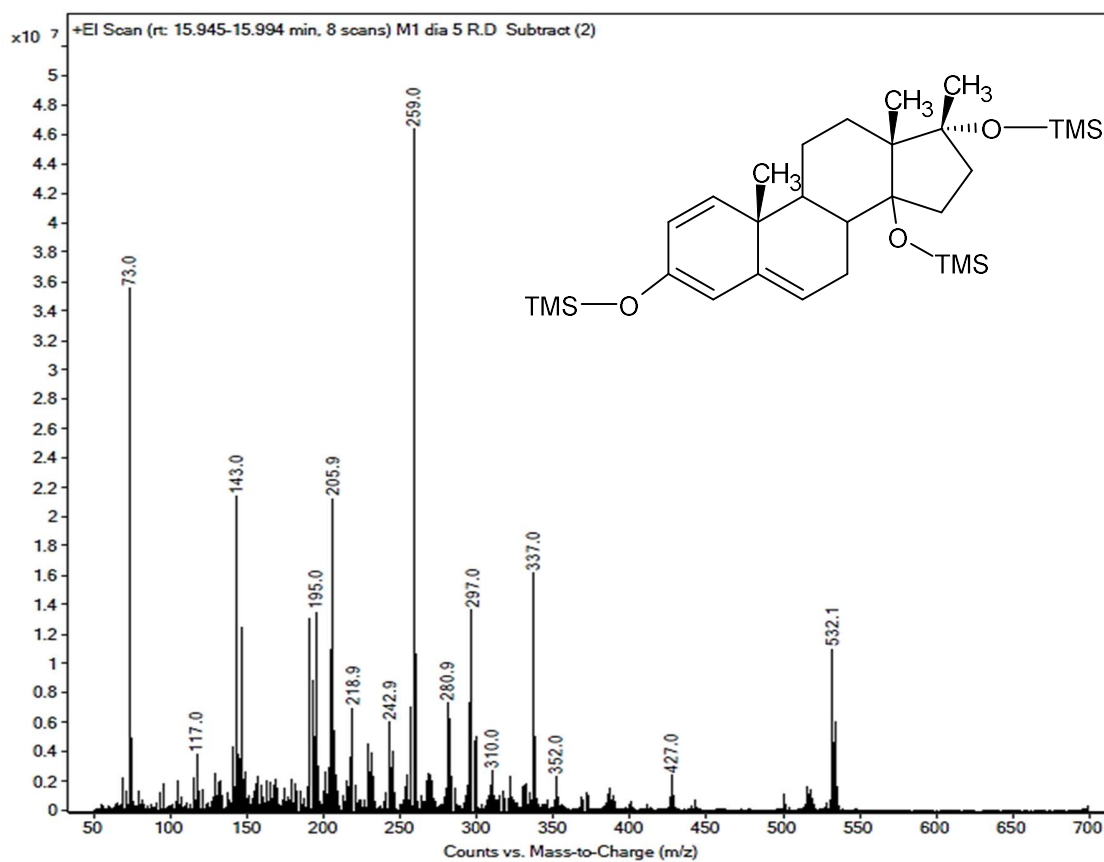
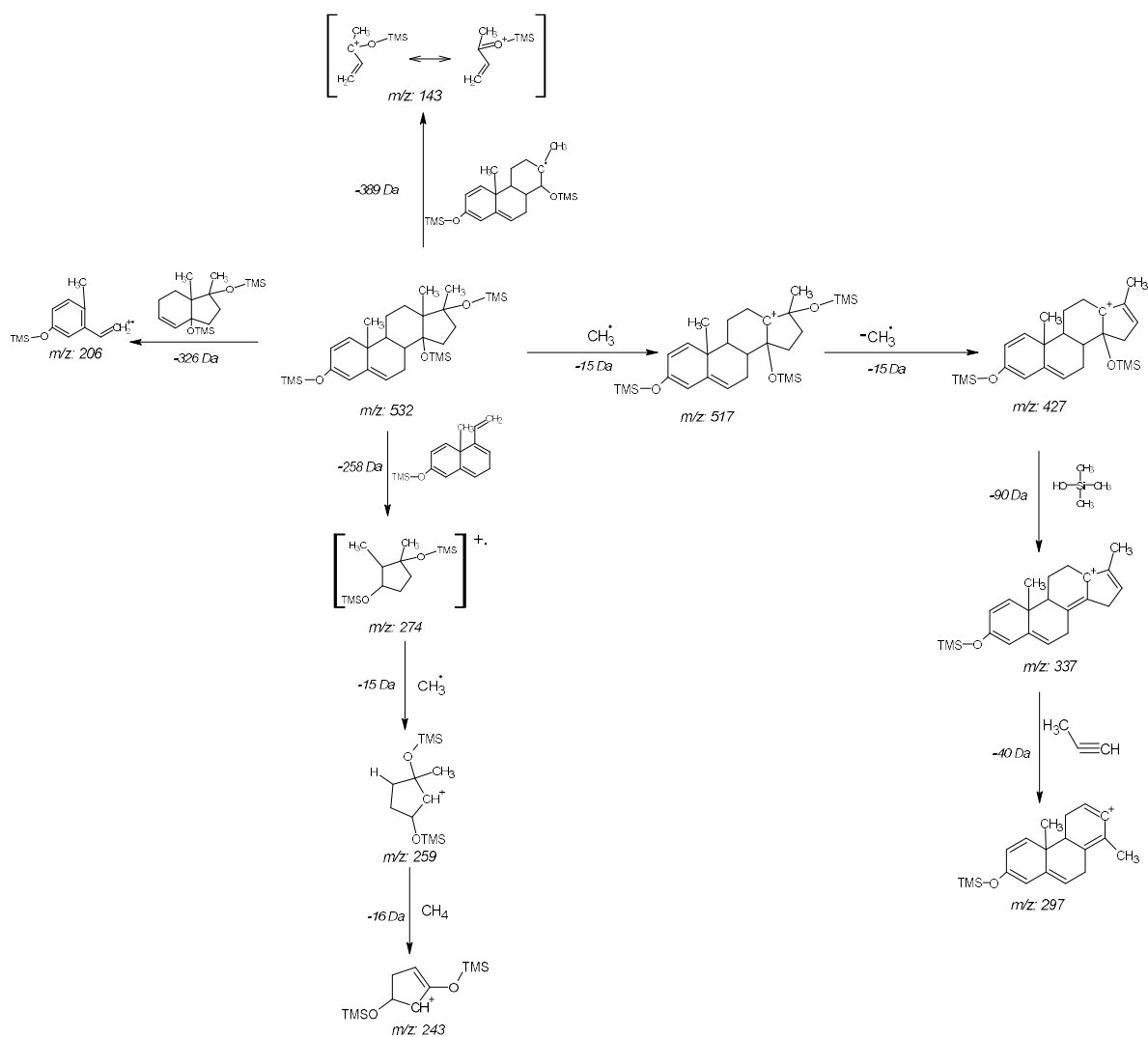
Figura 6-22: Espectro de masas del metabolito 4 (TR 15,93)

Figura 6-23: Patrón de fragmentación propuesto para el metabolito 4



6.4. Comparación de metabolitos producidos por *C. elegans* con los reportados en la literatura

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que la principal reacción de fase I que se presenta es la hidroxilación, lo que coincide con lo reportado en la literatura para *Cunninghamella* por diferentes autores (66,73–75), en donde aunque se evalúan moléculas diferentes a la metandienona, también obtienen gran presencia de hidroxilaciones en los metabolitos identificados.

Para M1 se propone una hidroxilación en la posición 7 sugerida por la presencia de los iones m/z 348 y m/z 294, además el ion m/z 206 permite descartar la hidroxilación en la posición 6 de la estructura, su identificación a través de librerías o por comparación con material de referencia no es posible, ya que no se encuentra en ninguna base de datos. La presencia de esta hidroxilación no ha sido reportada en ningún modelo *in vivo* e *in vitro* que involucre animales o células humanas, sin embargo, si fue reportado para un modelo *in vitro* con un microorganismo llamado *Macrophomina phaseolina*, siendo el único metabolito 7 β hidroxilado de ese estudio(6),

M2 tiene una hidroxilación en la posición 15, con ion característico m/z 231 que, tras una pérdida de 301 Da, que se da por la ruptura del anillo C de la molécula y no aparece en ninguno de los demás metabolitos identificados, la presencia del ion m/z 206 descarta la presencia de hidroxilaciones en los anillos A y B. Este metabolito tampoco pudo ser identificado con librería o por comparación con material de referencia. La presencia de una hidroxilación para metandienona en esta posición ha sido reportada previamente por *Khan et al.*, con *C. elegans*, lo cual comprueba que esta vía metabólica es posible que se presente en la cepa *C. elegans*. También se planteó la posibilidad que este metabolito sea un isómero del M1, dada la gran similitud que hay entre sus espectros de masas, conservándose los mismos fragmentos en este caso y cambiando solo la intensidad de los iones, debido a la posición alfa o beta del hidroxilo. La presencia de isomerías ocurridas gracias a *C. elegans*, ha sido reportado por diversos autores con otro tipo de compuestos como amitriptilina(62), bupivacaine(73) y clemastina(45). Determinar la posición exacta de la hidroxilación en este caso no es posible y se requieren técnicas de mayor precisión como el RMN.

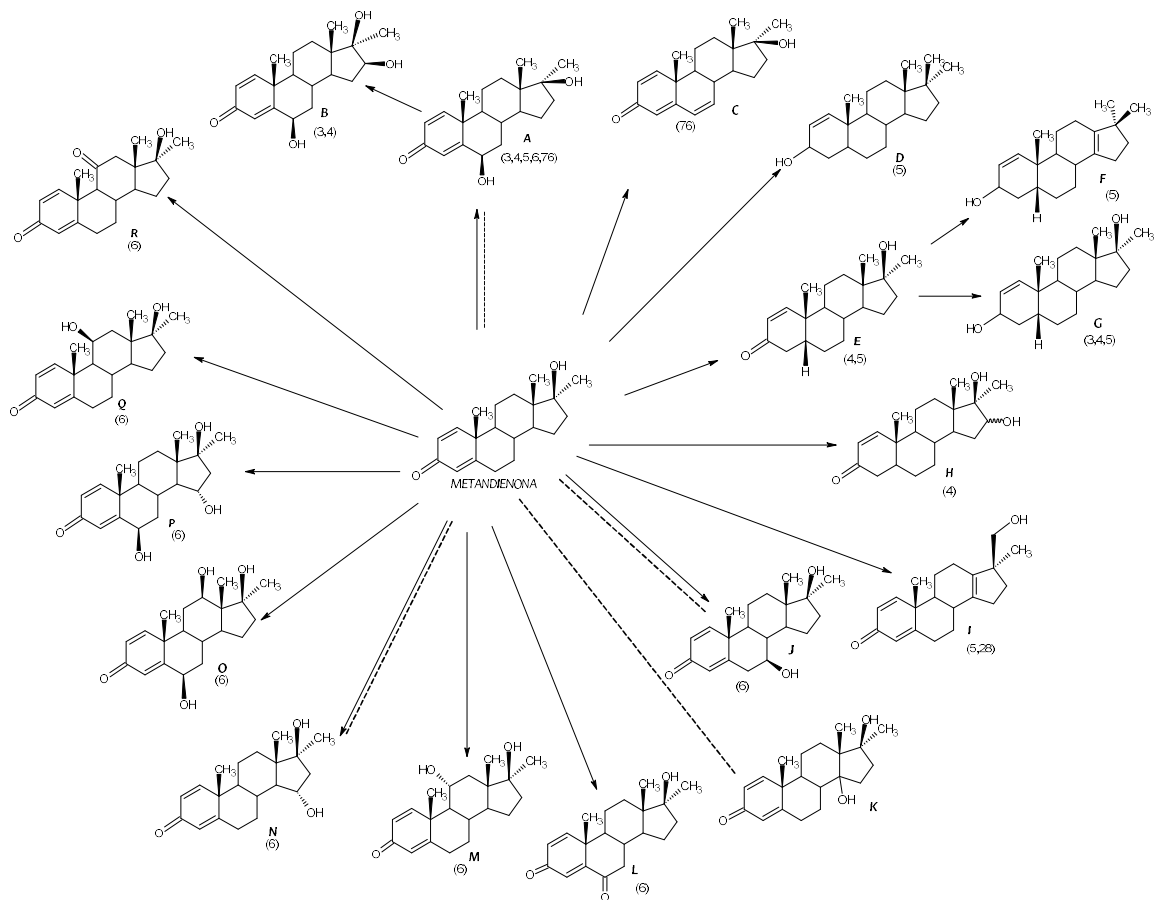
El metabolito descrito como M3 corresponde a la 6 β -hidroximetandienona, que es considerado el metabolito mayoritario reportado en humanos y cuya identificación se hizo por comparación con el material de referencia. Según *Schänzer et al.*, la 6 β hidroxilación en el carbono 6, es la ruta metabólica principal para esteroides como la metandienona, donde la reducción del anillo A se ve obstaculizada por la presencia del doble enlace en la posición C1-C2 (16), razón por la cual la 6 β -hidroximetandienona, es el metabolito principal reportado en humanos y se excreta en forma libre(3), siendo uno de los marcadores de uso para metandienona en el dopaje; este metabolito también ha sido reportado en otros modelo *in-vivo*, como ratones con hígado humanizado(5) y en orina de caballo(4), en modelos *in-vitro* como los hepatocitos bovinos también fue reportado como el metabolito mayoritario(76). La presencia de este metabolito indica que *C. elegans* como modelo de biotransformación puede simular parcialmente el metabolismo de los mamíferos.

En cuanto M4, se observa el ion característico 259 cuya abundancia es alta y solo está presente en este caso, su formación se explicó anteriormente, con base en este ion se propone la hidroxilación en la posición 14; este tipo de transformación se puede dar gracias a la acción de microorganismos (77) y es menos frecuente en mamíferos. Esta modificación en la molécula no ha sido reportada previamente para ningún modelo metabólico con metandienona, por lo que se considera un metabolito nuevo de la metandienona, sin embargo, para comprobar esto es necesario utilizar técnicas analíticas de caracterización estructural completa como RMN y HRMS.

De acuerdo con los metabolitos de metandienona detectados en el estudio y teniendo en cuenta lo reportado por otros autores, se plantean posibles rutas de biotransformación que se pueden ver en la **Figura 6-24**. Las reacciones observadas con el modelo son todas de fase I y corresponden a una hidroxilación en las posiciones 6, 7, 14 y 15 respectivamente, esta es una ruta que también siguen otros modelos metabólicos en mamíferos, sin embargo, las posiciones donde se dan son diferentes, lo que indica que el patrón metabólico es distinto; en el caso de los mamíferos se ha identificado la ocurrencia de una reducción del doble enlace de la posición C4-C5 con posterior hidrogenación del grupo ceto en la posición 3 (3,27), reacción que con el hongo no se logró evidenciar. La formación

de metabolitos hidroxilados en la posición 16 se descartó ya que no están presentes la pareja de iones 218 y 231 en ningún caso, según lo descrito por Schänzer(16).

Figura 6-24: Biotransformación de fase I propuesta para metandienona (MET) incubados con *C. elegans* (líneas punteadas) en comparación con los identificados en estudios con otros modelos metabólicos (líneas continuas).



La identificación de metabolitos de fase II no fue posible, debido a la técnica cromatográfica utilizada dado que la capacidad del instrumento utilizado no permite su análisis, siendo necesario la utilizar técnicas como LC-MS/MS, pues las hidroxilaciones gracias a *C.elegans* en varios casos se reportan en combinación con otros cambios como la glicosilación o la conjugación con sulfato(73,78). Para *C.elegans*, también se han reportado reacciones de N-acetilación(66) o conjugación con glutatión(79), sin embargo, en este estudio no se evidenciaron este tipo de metabolitos.

7. Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

Se adecuó un modelo *in vitro* de biotransformación para metandienona con el hongo *C. elegans*, que evita el uso modelos *in vivo* con animales.

Se realizó la extracción líquido-líquido con n-pentano de la matriz de estudio, logrando obtener los metabolitos de metandienona producidos por *C. elegans* lo que permitió la posterior identificación de estos.

Se proponen las estructuras para tres metabolitos monohidroxilados de la molécula en las posiciones 7,14,15 que corresponden a reacciones de fase I de biotransformación, utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas GC-MS/EI.

Se identificó la 6 β -hidroximetandienona por comparación con material de referencia, este es considerado el metabolito mayoritario en mamíferos.

Las modificaciones metabólicas observadas para metandienona con el modelo simulan parcialmente el metabolismo de los mamíferos ya que se presentan hidroxilaciones gracias a la presencia de las monooxigenasas en el sistema enzimático de *Cunninghamella*.

Este estudio demuestra la utilidad de los modelos *in-vitro* de biotransformación para la investigación del metabolismo de esteroides androgénicos anabolizantes como la metandienona.

Recomendaciones

Es el primer estudio de metabolismo que se realiza en la maestría de toxicología utilizando un modelo de biotransformación como *C. elegans*, por lo cual se sugiere continuar con este tipo de investigaciones evaluando otras sustancias de abuso.

Realizar la caracterización de los metabolitos encontrados para metandienona mediante otras técnicas como LC-MS/MS, RMN y HRMS que brinden una mayor exactitud a la hora de elucidar la molécula en estudio.

Utilizar el modelo de biotransformación con *C. elegans*, en otras sustancias anabolizantes a fin de obtener los posibles metabolitos que puedan incorporarse en los métodos de análisis de control al dopaje a fin de ampliar el alcance de estos.

Realizar la purificación de los metabolitos encontrados con el fin de obtener material de referencia secundario que pueda ser utilizado en el Laboratorio de Control al Dopaje-Bogotá.

Limitaciones

Debido a situación de emergencia declarada por el gobierno nacional en el marco de la pandemia global por COVID-19, el acceso a los laboratorios se vio restringido, limitando el número de experimentos realizados en el estudio, sin embargo, la información disponible permitió el cumplimiento de los objetivos planteados inicialmente.

A. Anexo: Acta aprobación comité de ética.



ACTA DE EVALUACIÓN: N°. 005-057-19
Fecha: 22 de marzo de 2018

Nombre completo del proyecto: "ESTUDIO DEL METABOLISMO DE LA METANDIENONA A TRAVÉS DE UN MODELO *in vitro* de INCUBACIÓN CON EL HONGO *Cunninghamella elegans*".

Versión número: 01

Sometido por: la estudiante Lucia Toscano Bayona

Dirigido por: la profesora Diana Carolina Chaves Silva

Presentado por: la profesora Alba Isabel Rodríguez Pulido, Coordinadora Académica

Departamento o Sección: Maestría en Toxicología de la Facultad de Medicina

Fecha en que fue sometido a consideración del Comité: 22 de marzo de 2019

EL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACION DE LA FACULTAD DE MEDICINA. Se constituyó mediante la Resolución 152, (Acta No. 43 del 5 de diciembre de 1996) actualizado mediante resolución 008 (acta 03 de 27 de enero de 2011), de Consejo de Facultad el Comité de Ética de investigación, el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión del año 2000; y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de los sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991).

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

- ✓ Carta de presentación del proyecto generada por la unidad básica o el departamento.
- ✓ Copia de la evaluación de los jurados o pares académicos que evaluaron y aprobaron el trabajo).
- ✓ Copia del proyecto completo de investigación,
- ✓ Dos resúmenes ejecutivos
- ✓ Dos copias del consentimiento informado (en español y cuando la investigación lo amerite).
- ✓ Hojas de vida resumidas de los investigadores y coinvestigadores del proyecto.
- ✓ Consideraciones éticas según resolución 8430 Ministerio de Salud.
- ✓ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica).

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes miembros del Comité:

1	Arteaga Díaz Clara Eugenia	Pensionada Dpto. de Morfología
2	Camargo Mendoza Maryluz	Departamento de la Comunicación Humana
3	Díaz Cruz Luz Amparo	Departamento de Obstetricia y Ginecología
4	Duarte Gutiérrez Liz Marcela	Asesora Jurídica Facultad de Medicina
5	Dueñas Gómez Zulma Janeth	Departamento de Ciencias Fisiológicas
6	Guerrero Fonseca Carlos Arturo	Presidente Comité de Ética / Dpto. de Ciencias Fisiológicas
7	Parra Pineda Mario Orlando	Departamento de Obstetricia y Ginecología

[Página 1/1]
Elaboró Jeannette Pineda A.

Carrera 30 N°. 45-03
FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471 - 1 piso, Of.136
Commutador: (57) (1) 316 5000 ext. 15167
Bogotá, Colombia
eticasalud_fmbo@unal.edu.co
Patrimonio de todos los colombianos



El Comité consideró que el presente estudio:

a. Es válido desde el punto de vista ético. La investigación involucra un riesgo igual al promedio para los sujetos que participan en ella. La investigación se ajusta a los estándares de la buena práctica clínica.

b. El Comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.

4. El Comité informará inmediatamente a las directivas institucionales:

- a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
- b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.

5. El Comité informará inmediatamente a las directivas, toda información que reciba acerca de:

- a. Lesiones o daños a sujetos humanos con motivo de su participación en la investigación. Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
- b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité.

6. Cuando el proyecto sea aprobado, será por un periodo de un (1) año a partir de la fecha de aprobación.

7. El Investigador principal deberá:

- a. Informar de cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto. Estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa del COMITÉ DE ÉTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA) excepto cuando sean necesarios para minimizar o suprimir un peligro inminente o un riesgo grave para los sujetos que participan en la investigación.
- b. Avisar de cualquier situación imprevista que se considere implica algún signo de riesgo para los sujetos o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.
- c. Informar de cualquier evento adverso serio de algún paciente, comunicando la situación al secretario y al presidente del Comité de Ética), de acuerdo con la normatividad que el INVIMA ha generado a este respecto.
- d. Poner en conocimiento del comité toda información nueva importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo/beneficio de los sujetos participantes.
- e. Comunicar cualquier decisión tomada por otros comités con respecto a la investigación que se lleva a cabo.
- f. Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones.
- g. Presentar a este comité un informe cuando haya transcurrido un año, contado a partir de la aprobación del proyecto. Los proyectos con duración mayor a un año, serán reevaluados a partir del informe de avance integrado.
- h. Todos los proyectos deben entregar al finalizar un informe final de cierre del estudio, este cierre puede ser el informe final en formato completo o en formato de resumen de cierre de estudio, firmado por el investigador responsable del estudio.

8. Observaciones:

El comité considera que el proyecto de investigación no presenta dilemas éticos por lo tanto emite Concepto Aprobatorio.

Nombre: **CARLOS ARTURO GUERRERO FONSECA**
 Título: PhD Doctorado en Bioquímica, MSc. en Farmacología y MSc. en Genética Humana
 Cargo: Presidente Comité de Ética

[Página 2/2]
 Elaboró Jeannette Pineda A.

Carrera 30 N°. 45-03
 FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471- 1 piso, Of. 136
 Conmutador: (57) (1) 316 5000 ext. 15167
 Bogotá, Colombia
 eticasalud_fm bog@unal.edu.co
 Patrimonio de todos los colombianos

Bibliografía

1. Barceloux DG. Anabolic-Androgenic Steroids. In: Medical Toxicology of Drug Abuse. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2012. p. 275–94.
2. Aguilar M, Muñoz-Guerra J, Plata M del M, Del Coso J. Thirteen years of the fight against doping in figures. *Drug Test Anal.* 2017;9(6):866–9.
3. Schänzer W, Geyer H, Donike M. 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. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1991 Apr;38(4):441–64.
4. Hagedorn HW, Schulz R, Friedrich A. Detection of methandienone (methandrostenolone) and metabolites in horse urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1992;577(2):195–203.
5. Lootens L, Meuleman P, Pozo OJ, Van Eenoo P, Leroux-Roels G, Delbeke FT. uPA+/+SCID Mouse with Humanized Liver as a Model for In Vivo Metabolism of Exogenous Steroids: Methandienone as a Case Study. *Clin Chem.* 2009;55(10):1783–93.
6. Khan NT, Zafar S, Noreen S, Al Majid AM, Al Othman ZA, Al-Resayes SI, et al. Biotransformation of dianabol with the filamentous fungi and β -glucuronidase inhibitory activity of resulting metabolites. *Steroids.* 2014;85:65–72.
7. Kicman AT. Pharmacology of anabolic steroids. Vol. 154, *British Journal of Pharmacology.* Wiley/Blackwell (10.1111); 2008. p. 502–21.
8. Morley JE. Anabolic Steroids and Frailty. *J Am Med Dir Assoc.* 2010 Oct;11(8):533–6.
9. Barceloux DG. MEDICAL TOXICOLOGY OF DRUG ABUSE. John Wiley & Sons, Inc.; 2012. 1041 p.
10. Kicman AT, Gower DB. Anabolic steroids in sport: biochemical, clinical and analytical perspectives. *Ann Clin Biochem Int J Lab Med.* 2003;40(4):321–56.
11. Link AF, Chemistry B. Drug Metabolism. *Encycl Syst Biol.* 2013;(March):618–618.
12. Repetto Jiménez M, Repetto Kuhn G. Toxicología Fundamental. Cuarta Edi. Sevilla: Díaz de Santos; 2009. 629 p.
13. Gallego Fernández A, de Sande García MA, Marín Fernández AM, Blanco Ramos S, González Galán MJ. Aspectos fundamentales del citocromo P450. Fundación Tejerina. 2011.
14. Asha S, Vidyavathi M. Cunninghamella – A microbial model for drug metabolism studies – A review. *Biotechnol Adv.* 2009 Jan;27(1):16–29.
15. Curtis D. Klaassen. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. Eighth Edi. Klaassen CD, editor. McGraw-Hill Education; 2013. 1454 p.

16. Schänzer W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clin Chem.* 1996;42(7):1001–20.
17. Hofmann FB, Beavo J a, Busch A, Ganten D, Michel MC, Page CP, et al. Doping in Sports. Thieme D, Hemmersbach P, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. 274 p. (Handbook of Experimental Pharmacology; vol. 195).
18. Baggish AL, Weiner RB, Kanayama G, Hudson JI, Lu MT, Hoffmann U, et al. Cardiovascular Toxicity of Illicit Anabolic-Androgenic Steroid Use. *Circulation.* 2017 May 23;135(21):1991–2002.
19. White M, Brennan E, Mi Ren KY, Shi M, Thakrar A. Anabolic Androgenic Steroid Use as a Cause of Fulminant Heart Failure. *Can J Cardiol.* 2018;34(10):1369.
20. Montisci M, El Mazloum R, Cecchetto G, Terranova C, Ferrara SD, Thiene G, et al. Anabolic androgenic steroids abuse and cardiac death in athletes: Morphological and toxicological findings in four fatal cases. *Forensic Sci Int.* 2012;217(1–3):12–7.
21. Rocha M, Aguiar F, Ramos H. O uso de esteroides androgénicos anabolizantes e outros suplementos ergogénicos – uma epidemia silenciosa. *Rev Port Endocrinol Diabetes e Metab.* 2014;9(2):98–105.
22. Hartgens F, Kuipers H. Effects of Androgenic-Anabolic Steroids in Athletes. *Sport Med.* 2004;34(8):513–54.
23. Hall RCW, Hall RCW. Abuse of Supraphysiologic Doses of Anabolic Steroids. *South Med J.* 2005;98(5):550–6.
24. Christou MA, Christou PA, Markozannes G, Tsatsoulis A, Mastorakos G, Tigas S. Effects of Anabolic Androgenic Steroids on the Reproductive System of Athletes and Recreational Users: A Systematic Review and Meta-Analysis. Vol. 47, *Sports Medicine.* 2017. p. 1869–83.
25. Nieschlag E, Vorona E. Mechanisms in Endocrinology: Medical consequences of doping with anabolic androgenic steroids: Effects on reproductive functions. *Eur J Endocrinol.* 2015;173(2):R47–58.
26. Nieschlag E, Vorona E. Doping with anabolic androgenic steroids (AAS): Adverse effects on non-reproductive organs and functions. Vol. 16, *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders.* 2015. p. 199–211.
27. Schänzer W, Opfermann G, Donike M. 17-Epimerization of 17 α -methyl anabolic steroids in humans: metabolism and synthesis of 17 α -hydroxy-17 β -methyl steroids. *Steroids.* 1992;57(11):537–50.
28. Schänzer W, Delahaut P, Geyer H, Machnik M, Horning S. Long-term detection and identification of metandienone and stanozolol abuse in athletes by gas chromatography-high-resolution mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1996;687(1):93–108.
29. Kanayama G, Pope HG. History and epidemiology of anabolic androgens in athletes and non-

- athletes. *Mol Cell Endocrinol*. 2018;464.
30. Barrett-Connor EL. Testosterone and risk factors for cardiovascular disease in men. *Diabetes Metab*. 1995;21(3):156–61.
 31. U.S. DEPARTMENT OF JUSTICE • DRUG ENFORCEMENT ADMINISTRATION. Diversion Control Division [Internet]. [cited 2020 Sep 23]. Available from: <https://www.deadiversion.usdoj.gov/pubs/brochures/steroids/public/>
 32. Government of Canada. Controlled Drugs and Substances Act [Internet]. 1996. Available from: <http://laws-lois.justice.gc.ca/eng/acts/C-38.8/>
 33. Advisory Council on the Misuse of Drugs. Consideration of the Anabolic Steroids. 2010; Available from: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/119132/anabolic-steroids.pdf
 34. Australian Institute of Criminology. Illicit drugs and alcohol [Internet]. 2006 [cited 2020 Oct 2]. Available from: <https://web.archive.org/web/20070405033442/http://www.aic.gov.au/research/drugs/types/steroids.html>
 35. Ministério da Saúde. Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial [Internet]. Portaria nº 344. 1998 [cited 2020 Sep 27]. Available from: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1998/prt0344_12_05_1998_rep.html
 36. WADA. International Standard for Laboratories. [Internet]. Canada; 2019 [cited 2020 Nov 5]. Available from: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/isl_nov2019.pdf
 37. WADA. WADA Technical Document – TD2019MRPL. 2019.
 38. Geyer H, Schänzer W, Thevis M. Anabolic agents: Recent strategies for their detection and protection from inadvertent doping. *Br J Sports Med*. 2014;48(10):820–6.
 39. Schänzer W, Geyer H, Fußhöller G, Halatcheva N, Kohler M, Parr MK, et al. Mass spectrometric identification and characterization of a new long-term metabolite of metandienone in human urine. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006;20(15):2252–8.
 40. Piska K, Jelaszczyk D, Jamrozik M, Kubowicz-Kwałny P, Płkalska E. Cunninghamella Biotransformation - Similarities to Human Drug Metabolism and Its Relevance for the Drug Discovery Process. *Curr Drug Metab*. 2016 Jan;17(2):107–17.
 41. Ahmad MS, Zafar S, Bibi M, Bano S, Atia-tul-Wahab, Atta-Ur-Rahman, et al. Biotransformation of androgenic steroid mesterolone with *Cunninghamella blakesleeana* and *Macrophomina phaseolina*. *Steroids*. 2014;82:53–9.
 42. Choudhary MI, Khan NT, Musharraf SG, Anjum S, Atta-ur-Rahman. Biotransformation of

- adrenosterone by filamentous fungus, *Cunninghamella elegans*. *Steroids*. 2007;72(14):923–9.
43. Siddiqui M, Ahmad MS, Wahab A-T, Yousuf S, Fatima N, Shaikh NN, et al. Biotransformation of a potent anabolic steroid, mibolerone, with *Cunninghamella blakesleeana*, *C. echinulata*, and *Macrophomina phaseolina*, and biological activity evaluation of its metabolites. Shahid M, editor. *PLoS One*. 2017;12(2).
 44. Ma B, Huang H, Chen X, Sun Y, Lin L, Zhong D. Biotransformation of metoprolol by the fungus *Cunninghamella blakesleeana*. *Acta Pharmacol Sin*. 2007 Jul 1;28(7):1067–74.
 45. Åberg AT, Löfgren H, Bondesson U, Hedeland M. Structural elucidation of N -oxidized clemastine metabolites by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and the use of *Cunninghamella elegans* to facilitate drug metabolite identification. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2010;24(10):1447–56.
 46. Zhong D-FF, Sun L, Liu L, Huang H-HH. Microbial transformation of naproxen by *Cunninghamella* species. *Acta Pharmacol Sin*. 2003 May;24(5):442–7.
 47. Dumasia MC. In vivo biotransformation of 17 α -methyltestosterone in the horse revisited: identification of 17-hydroxymethyl metabolites in equine urine by capillary gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2003 Feb 28;17(4):320–9.
 48. Ferris JP, Fasco MJ, Stylianopoulou FL, Jerina DM, Daly JW, Jeffrey AM. Monooxygenase activity in *Cunninghamella bainieri*: Evidence for a fungal system similar to liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*. 1973;156(1):97–103.
 49. Zhang D, Yang Y, Leakey JE., Cerniglia CE. Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics. *FEMS Microbiol Lett*. 1996 May 1;138(2–3):221–6.
 50. Bhosale S, Saratale G, Govindwar S. Biotransformation enzymes in *Cunninghamella blakesleeana* (NCIM-687). *J Basic Microbiol*. 2006 Dec 1;46(6):444–8.
 51. Smith R, Rosazza J. Microbial Models Aromatic of Mammalian Hydroxylation. *Arch Biochem Biophys*. 1974;161:551–8.
 52. Summary E, Report S, Report TA, Analysis ABPR. Anti-Doping Testing Figures Executive Summary. 9:10–36.
 53. World Anti-doping Agency. 2016 Anti-Doping Testing Figures Laboratory Report [Internet]. 2016. Available from: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2018_testing_figures_report.pdf
 54. Kam PCA, Yarrow M. Anabolic steroid abuse: Physiological and anaesthetic considerations. Vol. 60, *Anaesthesia*. 2005. p. 685–92.
 55. Neri M, Bello S, Bonsignore A, Cantatore S, Riezzo I, Turillazzi E, et al. Anabolic Androgenic

- Steroids Abuse and Liver Toxicity. *Mini-Reviews Med Chem.* 2011;11(5):430–7.
56. Awai HI, Yu EL, Ellis LS, Schwimmer JB. Liver Toxicity of Anabolic Androgenic Steroid Use in an Adolescent With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014;59(3):e32–3.
 57. Rockhold RW. Cardiovascular toxicity of anabolic steroids. *AnnuRevPharmacolToxicol.* 1993;33:497–520.
 58. Santora LJ, Marin J, Vangrow J, Minegar C, Robinson M, Mora J, et al. Coronary calcification in body builders using anabolic steroids. *Prev Cardiol.* 2006;9(4):198–201.
 59. Watanabe S, Kuzhiumparambil U, Winiarski Z, Fu S. Data on individual metabolites of synthetic cannabinoids JWH-018, JWH-073 and AM2201 by *Cunninghamella elegans*. *Data Br.* 2016 Jun;7:332–40.
 60. Martínez-Ramírez JA, Walther G, Peters FT. Studies on drug metabolism by fungi colonizing decomposing human cadavers. Part II: biotransformation of five model drugs by fungi isolated from post-mortem material. *Drug Test Anal.* 2015 Apr;7(4):265–79.
 61. Rydevik A, Lagojda A, Thevis M, Bondesson U, Hedeland M. Isolation and characterization of a β -glucuronide of hydroxylated SARM S1 produced using a combination of biotransformation and chemical oxidation. *J Pharm Biomed Anal.* 2014 Sep;98:36–9.
 62. Martínez-Ramírez JA, Voigt K, Peters FT. Studies on the metabolism of five model drugs by fungi colonizing cadavers using LC-ESI-MS/MS and GC-MS analysis. *Anal Bioanal Chem.* 2012;404(5):1339–59.
 63. Atlas RM. *Handbook of Microbiological Media: Second Edition* [Internet]. CRC-Press; 1996. Available from: <https://books.google.com.co/books?id=uOHDQgAACAAJ>
 64. Martínez-Ramírez JA, Strien J, Walther G, Peters FT. Search for fungi-specific metabolites of four model drugs in postmortem blood as potential indicators of postmortem fungal metabolism. *Forensic Sci Int.* 2016;
 65. Baydoun E, Karam M, Atia-tul-Wahab, Khan MSA, Ahmad MS, Samreen, et al. Microbial transformation of nandrolone with *Cunninghamella echinulata* and *Cunninghamella blakesleeana* and evaluation of leishmaniacidal activity of transformed products. *Steroids.* 2014;88:95–100.
 66. Rydevik A, Thevis M, Krug O, Bondesson U, Hedeland M. The fungus *Cunninghamella elegans* can produce human and equine metabolites of selective androgen receptor modulators (SARMs). *Xenobiotica.* 2013;43(5):409–20.
 67. Andrea E, Páez S. Estudio del metabolismo in vitro de catinonas sintéticas a través de hongos del género *Cunninghamella*. Universidad Nacional de Colombia; 2019.
 68. Martinez-Brito D, de la Torre X, Parr MK, Botrè F. Mass spectrometric analysis of 7-oxygenated

- androst-5-ene structures. Influence in trimethylsilyl derivative formation. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2020;34(17).
69. Schänzer W, Donike M. Metabolism of anabolic steroids in man : synthesis and use of reference substances for identification of anabolic steroid metabolites. *Anal Chim Acta.* 1993;275:23–48.
70. Segura J, Ventura R, Jurado C. Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1998;713(1):61–90.
71. Jürgen H G. *Mass Spectrometry.* Third Edit. Switzerland: Springer International Publishing; 2017. 986 p.
72. WADA. WADA Technical Document - TD2021EAAS. Measurement and Reporting of Endogenous Anabolic Androgenic Steroid (EAAS) Markers of the Urinary Steroid Profile. 2021. p. 1–11.
73. Rydevik A, Bondesson U, Hedeland M. Structural elucidation of phase I and II metabolites of bupivacaine in horse urine and fungi of the *Cunninghamella* species using liquid chromatography/multi-stage mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2012;26(11):1338–46.
74. Mei J, Wang L, Wang S, Zhan J. Synthesis of two new hydroxylated derivatives of spironolactone by microbial transformation. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014 Jul;24(14):3023–5.
75. Zafar S, Yousuf S, Kayani HA, Saifullah S, Khan S, Al-Majid AM, et al. Biotransformation of oral contraceptive ethynodiol diacetate with microbial and plant cell cultures. *Chem Cent J.* 2012;6(1):452.
76. Hooijerink D, Schilt R, Hoogenboom R, Huveneers-Oorsprong M. Identification of metabolites of the anabolic steroid methandienone formed by bovine hepatocytes *in vitro*†. *Analyst.* 1998;123(12):2637–41.
77. Hu S hui, Genain G, Azerad R. Microbial transformation of steroids: Contribution to 14 α -hydroxylations. *Steroids.* 1995;60(4):337–52.
78. Rydevik A, Bondesson U, Thevis M, Hedeland M. Mass spectrometric characterization of glucuronides formed by a new concept, combining *Cunninghamella elegans* with TEMPO. *J Pharm Biomed Anal.* 2013;84:278–84.
79. Rydevik A, Hansson A, Hellqvist A, Bondesson U, Hedeland M. A novel trapping system for the detection of reactive drug metabolites using the fungus *Cunninghamella elegans* and high resolution mass spectrometry. *Drug Test Anal.* 2015 Jul;7(7):626–33.

