



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA**

**DETERMINACIÓN DE LA TESTOSTERONA Y SUS METABOLITOS
HIDROXILADOS EN ORINA HUMANA POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS
DE ULTRA ALTA RESOLUCIÓN ACOPLADO A UN DETECTOR DE MASAS**

Tesis que presenta

M. en C. Derly Constanza Escobar Wilches

Para obtener el grado de Doctora en Ciencias
en la Especialidad de Toxicología

Director de Tesis:

Dr. Adolfo Sierra Santoyo

Ciudad de México

noviembre, 2020

Este trabajo se realizó en el laboratorio 17 del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Adolfo Sierra Santoyo, con el apoyo del Conacyt con los proyectos CB-168384, 236564, 140482 y la beca 331539.

Después de todo, ¿qué es un científico entonces? Es un Hombre curioso que mira a través del ojo de una cerradura, la cerradura de la naturaleza, tratando de saber qué es lo que sucede –Jacques Yves Cousteau-

“No es la vida lo que importa, sino el coraje que le pones”.

“Sostente y serás sostenido”

Yogi Bhajan

AGRADECIMIENTOS

Al CINVESTAV-IPN por la oportunidad brindada para estudiar y crecer en esta institución.

Al CONACYT por el apoyo económico para realizar mis estudios de posgrado.

Al Dr. Adolfo Sierra Santoyo por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, y por ser un ejemplo que seguir como persona.

A la Dra. Betzabet Quintanilla Vega por su valiosa labor en todos los aspectos del desarrollo de este trabajo, por su apoyo en todo momento y por ser un ejemplo a seguir como persona e investigadora.

A la Dra. Marta Romano, Dra. Luisa Torres y Dra. Emma Calderón por su orientación, sus comentarios valiosos y aportaciones durante la realización del proyecto.

Al Dr. Olivier Barbier y a la Dra. Andrea De Vizcaya por todo su apoyo y disposición desde la Coordinación académica.

Al Dr. Mario Figueroa Saldívar por todos sus aportes, paciencia y colaboración los cuales fueron decisivos para el desarrollo de este trabajo.

A todos los Profesores del Departamentos de Toxicología por todos los conocimientos impartidos y por todo el apoyo brindado.

A la Q.F.B. Ma. de Lourdes López González por su apoyo técnico para la realización de esta tesis.

Al Sr. Gabriel Vargas Corona por su apoyo técnico en el desarrollo de este proyecto.

A mis amigos que siempre han sido parte de mi familia Rubén, Isabel, Vicente, Citlali, Martín, Jerónimo, Benjamín y Hugo por estar siempre a mi lado.

A mis compañeros de generación Deyanira, Rocio, Lety, Erika, Tania y Benjamín por su compañía invaluable.

A mis compañeras de laboratorio Mary y Ari.

A todos mis amigos y a todos los integrantes del departamento de toxicología por hacerme sentir como en casa y por apoyarme en un momento muy complicado de mi vida.

DEDICATORIA

A Dios/Universo por todas las bendiciones otorgadas todos los días de mi vida.

A mi Madre, a mi Padre y a mi hermano porque gracias a su mano sobre mi hombro todo esto fue posible.

A toda mi familia por sus oraciones, apoyo y su amor incondicional.

A mis amigos Rubén, Isabel, Vicente, Citlali y Martín porque estuvieron ahí cuando todo se vino abajo y hoy son parte de mi familia.

A Daniel Muñoz porque fuiste luz en los momentos más oscuros en mi vida.

TABLA DE CONTENIDO	Página
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Testosterona	1
1.1.1 Biosíntesis y transporte.....	1
1.1.2 Metabolismo de la Testosterona.....	4
1.1.3 Eliminación	6
1.1.4 Regulación de la secreción de la T	6
1.1.5 Receptor de los andrógenos y mecanismo de acción	7
1.2 Función de los andrógenos.....	12
1.2.1 Sistema Reproductor.....	12
1.2.1.1 Diferenciación sexual	12
1.2.1.2 Pubertad	13
1.2.1.3 Adultez.....	13
1.2.2 Sistema Nervioso.....	13
1.2.3 Sistema óseo.....	15
1.2.4 Sistema muscular.....	16
1.2.5 Eritropoyesis	16
1.2.6. Comportamiento de la testosterona con la edad.....	17
1.3 Técnicas analíticas para la determinación y cuantificación de los andrógenos	18
1.4 JUSTIFICACIÓN.....	21
1.5 HIPÓTESIS.....	22
1.6 OBJETIVOS	23
1.6.1 Objetivo general	23
1.6.2 Objetivos específicos.....	23
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24

2.1 Estrategia experimental.....	24
2.2 Reactivos y estándares	25
2.3 Obtención de las muestras de orina	25
2.4 Obtención de la orina libre de esteroides	26
2.5 Análisis de la T y sus metabolitos hidroxilados por cromatografía de líquidos	27
2.5.1 Principio de la cromatografía de líquidos	27
2.5.2 Condiciones cromatográficas	27
2.5.3 Preparación de las soluciones estándar	29
2.5.4 Validación del método	29
2.5.5 Procesamiento de las muestras de orina para el análisis de la testosterona y sus metabolitos hidroxilados	31
2.6 Determinación de creatinina en la orina	33
2.6.1 Principio	33
2.6.2 Procedimiento.....	33
2.7 Análisis estadístico	34
3. RESULTADOS.....	35
3.1 Desarrollo y validación del método cromatográfico de UPLC	35
3.2 Optimización del procesamiento de las muestras de orina	43
3.3 Determinación de la concentración de creatinina.....	53
3.4 Análisis de las muestras de orina de los voluntarios	54
5. CONCLUSIONES	69
6. PERSPECTIVAS	70
7. REFERENCIAS.....	71
8. ANEXO I. Publicación del presente trabajo en la revista Analytical Biochemistry.....	84

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Síntesis y metabolismo de andrógenos en el humano.	4
Figura 2	Regulación de la secreción de la testosterona, eje hipotálamo-hipófisis-testículo.	8
Figura 3	El gen del receptor de andrógenos.	9
Figura 4	Mecanismo de acción de los andrógenos (vía clásica).	10
Figura 5	Estrategia experimental.	24
Figura 6	Proporción de solventes.	29
Figura 7	Cromatograma de la corriente total de iones (TIC) de la mezcla de los estándares y el estándar interno y sus espectros de masas por ESI+.	37
Figura 8	Gráficas de calibración de los metabolitos 6 β -OHT, 15 β -OHT, 16 α -OHT, 16 β -OHT, 11 β -OHT y 2 α -OHT.	41
Figura 9	Gráficas de calibración de la 2 β -OHT, de la testosterona y la androstenediona.	42
Figura 10	Cartas control de la testosterona, la androstenediona y la 6 β -OHT.	44
Figura 11	Evaluación del efecto matriz sobre las gráficas de calibración.	45
Figura 12	Evaluación de las condiciones de pre-tratamiento sobre la recuperación de la testosterona y la 2 β -OHT.	48
Figura 13	Evaluación del orden de la extracción-hidrólisis o hidrólisis extracción de los metabolitos conjugados en orina.	51
Figura 14	Efecto de la β -glucuronidasa/sulfatasa de <i>H. pomatia</i> sobre la formación de los metabolitos 16 α -OHT y 6 β -OHT en orina humana.	53

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Programa de solventes usados para el análisis de los metabolitos hidroxilados de testosterona, la testosterona y la androstenediona.	28
Tabla 2	Tiempos de retención (t_{ret}) y molécula protonada de la testosterona, sus metabolitos hidroxilados y la androstenediona.	36
Tabla 3	Tiempos de retención (t_{ret}), peso molecular y patrón de fragmentación de algunos esteroides urinarios.	38
Tabla 4	Parámetros de las gráficas de calibración, coeficiente de correlación, límites de detección y de cuantificación de la testosterona y sus metabolitos.	40
Tabla 5	Recuperación y precisión para los metabolitos hidroxilados de la testosterona, la androstenediona y la testosterona en OLE.	43
Tabla 6	Porcentaje de pérdida según las diferentes condiciones de pre-tratamiento de las muestras.	47
Tabla 7	Porcentajes de recuperación para la testosterona y tres metabolitos hidroxilados en orina humana usando extracción sólido-líquido y líquido-líquido.	47
Tabla 8	Porcentajes de recuperación para la extracción de diferentes metabolitos de la orina humana usando cartuchos SPE C-18 de diferentes marcas comerciales.	49
Tabla 9	Porcentajes de recuperación para la elución de algunos metabolitos hidroxilados de la testosterona y la testosterona usando diferentes mezclas de disolventes por extracción en fase sólida.	50
Tabla 10	Concentración urinaria de metabolitos hidroxilados de testosterona, androstenediona y testosterona en hombres jóvenes y mayores.	55
Tabla 11	Concentraciones de los metabolitos hidroxilados de testosterona, androstenediona y testosterona en orina de humano ajustados por creatinina.	56

LISTA DE ABREVIATURAS

16-epiE₃	16-Epiestriol
16α-OHE₁	16 α -hidroxiestrona
17α-OHP	17 α -hidroxiprogesterona
2-OHE₁	2-hidroxiestrona
2-OHE₂	2-hidroxiestradiol
4-MeOE₁	4-metoxiestrona
4-OHE₁	4-hidroxiestrona
4-OHE₂	4-hidroxiestradiol
6-DHT	6-deshidrotosterona
AD	Androstenediona
AKR1C3	Aldo-ceto reductasa familia 1 miembro 3
ARE	Elementos de respuesta a andrógenos
CG-MS	Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas
CYP	Citocromo P450
DAD	Detector de arreglo de diodos
DBD	Dominio de unión al ADN
DHEA	Deshidroepiandroterona
DHT	Dihidrotosterona
E₁	Estrona
E₂	Estradiol
E₃	Estriol
EI	Estándar interno
EIA	Inmunoensayo enzimático
ESI	Ionización por electrospray
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HSD17β3	17 β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa tipo 3
HSD3β1, 2	3 β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa tipo 1 y tipo 2
HSD3β2	3 β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa tipo 2
LBD	Dominio carboxi-terminal de unión al ligando
LC-MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectroscopía de masas
LH	Hormona luteinizante
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MS	Espectrometría de masas
NTD	Dominio N-terminal

-OHT	Hidroxitestosterona
OLE	Orina libre de esteroides
CYPsc o CYP11A1	Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol
RA	Receptor de andrógenos
RE	Receptor de estrógenos
RIA	Radioinmunoensayo
SHBG	Globulina fijadora de hormonas sexuales
T	Testosterona
<i>t_{ret}</i>	Tiempo de retención
UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución
UPLC-MS	Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a un detector de masas

RESUMEN

La testosterona (T) es un andrógeno que regula el sistema reproductor masculino y ésta actúa directa o indirectamente en casi todos los sistemas durante la vida fetal, la pubertad y la adultez. Se han descrito varios métodos analíticos para medir a la T, pero algunos de éstos presentan problemas de especificidad y sensibilidad, hasta ahora no se ha descrito un método para determinar a la T y sus metabolitos hidroxilados en la orina humana. El objetivo de este estudio fue desarrollar un método analítico para cuantificar a la T y sus metabolitos hidroxilados en la orina humana utilizando cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a un detector de masas (UPLC-MS). Se establecieron las condiciones cromatográficas para la resolución y detección de la T y los metabolitos 15 β -hidroxitestosterona (-OHT), 6 β -OHT, 16 α -OHT, 16 β -OHT, 11 β -OHT, 2 α -OHT, 2 β -OHT, androstenediona (AD) y la 6-deshidrotestosterona (6-DHT), la cual se usó como estándar interno. Como fase estacionaria se empleó una columna Kinetex XB-C18 y el sistema de solventes consistió en un gradiente de acetonitrilo, metanol y agua con ácido fórmico al 0.1% a un flujo de 0.2 ml/min a 40 °C. Se usó un detector de masas con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y se observó una excelente linealidad en el rango de 25 a 1250 ng/ml para todos los analitos en las gráficas de calibración. Los límites de detección (LOD) calculados estuvieron en un rango de 1.360 a 13.054 ng/ml y los límites de cuantificación (LOQ) estuvieron entre 4.234 a 39.679 ng/ml. Las recuperaciones estuvieron entre 81.2 a 194.9% en las tres concentraciones evaluadas (100 ng/ml, 500 ng/ml y 1000 ng/ml) y los coeficientes de variación de las recuperaciones fueron inferiores al 16.8% para todos los analitos. El análisis de las muestras de orina de hombres jóvenes y mayores de 55 años mostró la presencia de la T, AD y siete metabolitos hidroxilados. La 6 β -OHT y 16 α -OHT fueron los principales metabolitos en ambos grupos. En el grupo de hombres mayores de 55 años se observó una disminución significativa en la concentración urinaria de AD. En conclusión, el método desarrollado es sensible, específico, preciso, tiene buena resolución y es reproducible para el análisis de la T y sus metabolitos hidroxilados en la orina humana. Este método puede ser útil para el desarrollo de estudios sobre patologías relacionadas con andrógenos, alteraciones en el metabolismo hepático dependiente de CYP, así como en de área de salud reproductiva y disrupción endocrina.

ABSTRACT

Testosterone (T) is an androgen that regulates the male reproductive system and directly or indirectly acts on almost all systems during fetal, pubertal and adult lives. Several analytical methods have been described to quantify T but some of them present problems on specificity and sensitivity. To date, there is not a described method to determine the hydroxylated metabolites of T in urine. The objective of this study was to develop an analytical method to determine T, AD, and hydroxylated metabolites of T in human urine using ultra high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS). Chromatographical conditions for the resolution and detection of T, 15 β -hydroxytestosterone (-OHT), 6 β -OHT, 16 α -OHT, 16 β -OHT, 11 β -OHT, 2 α -OHT, 2 β -OHT, androstenedione (AD), and 6-DHT (internal standard) were established. A Kinetex XB-C18 column was used. The system of solvents consisted of a gradient of acetonitrile, methanol, and 0.1% formic acid with a flow rate of 0.2 ml/min at 40 °C. Analytes were detected using a mass detector with an electrospray ionization source (ESI). An excellent linearity in the range of 25 to 1250 ng/ml for all analytes in the calibration graphics was observed. Limits of detection (LOD) ranged from 1.360 to 13.054 ng/ml and the range of limits of quantitation (LOQ) was of 4.234 to 39.679 ng/ml. Recovery values were between 81.2 and 194.9% in the three concentrations evaluated (100 ng/ml, 500 ng/ml and 1000 ng/ml), while the coefficients of variation values were under 16.8%. The analysis of urine samples of young and elder men showed the presence of T, AD, and seven hydroxylated metabolites of T. The 6 β -OHT and 16 α -OHT were the main metabolites in both groups. There was a significant decrease in AD levels in older adults. In conclusion, the method developed is sensitive, specific, precise, has good resolution, and it is reproducible for the analysis of T and its metabolites in human urine. It can be useful for performing studies regarding androgen dependent disease, physio-pathological studies on liver metabolism, reproductive health, hormonal concerns, and endocrine disruption.

1. INTRODUCCIÓN

Se reconocen cinco clases de hormonas esteroideas en los mamíferos: progestágenos, glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógenos y andrógenos (Monostory and Dvorak, 2011). La testosterona (T), es el principal andrógeno en los humanos y se encuentra involucrada en diversas funciones, como son: el mantenimiento de la función sexual, el desarrollo de células germinales y órganos sexuales accesorios, el metabolismo de los lípidos, proteínas y carbohidratos, la estimulación de la eritropoyesis, la promoción del crecimiento del músculo esquelético, la coagulación, el comportamiento cognitivo y psico-sexual (Bhasin, 2008; Ponzetto et al., 2016).

1.1 Testosterona

1.1.1 Biosíntesis y transporte

La síntesis *de novo* de la T ocurre principalmente en las células de Leydig de los testículos, y además de la T, las gónadas masculinas producen pequeñas cantidades de dihidrotestosterona (DHT; andrógeno mucho más potente que la T), deshidroepiandroterona (DHEA), androstenediona (AD) y estradiol (E₂) (Braunstein, 2007). Es importante referir que la DHT y el E₂ en gran medida son producidas de la conversión periférica de la T (Holt and Peery, 2010).

La T es sintetizada a partir del colesterol mediante una serie de reacciones catalizadas por las familias del citocromo P450 (CYP) 11, 17, 19, 21 y otras enzimas (Auchus and Miller, 2015). En condiciones normales, la producción de T en las células de Leydig es estimulada por la unión de la hormona luteinizante (LH) a sus receptores de superficie en estas células, esto genera que el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) produzca la proteína cinasa A que es

requerida para el transporte del colesterol desde el citoplasma a la membrana mitocondrial externa, y posteriormente, la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR) transporta el colesterol a través de la membrana mitocondrial, donde la enzima de escisión de la cadena lateral (CYP_{11A1}) o CYP11A1 convierte el colesterol en pregnenolona de la cual derivan todas las hormonas sexuales (Stocco, 2007; Smith et al., 2013; Auchus and Miller, 2015) (Figura 1). Después, la pregnenolona es transferida al retículo endoplásmico liso donde la T es sintetizada por una serie de enzimas esteroidogénicas como son los CYP11A1, CYP17A1, 3β-hidroxi-esteroide deshidrogenasa tipo 2 (HSD3β2) y la 17β-hidroxi-esteroide deshidrogenasa tipo 3 (HSD17β3). La síntesis de T entonces sigue la vía Δ₄, vía la 17α-OH progesterona (17α-OHP) y la AD, o la vía Δ₅ a través de la 17α-OHP, la DHEA y el 5-androstenediol (Figura 1), la vía Δ₅ tiene una mayor contribución en el ser humano (Monostory and Dvorak, 2011). Adicionalmente, a partir de la T o la AD se forman los estrógenos reacción en la cual participa la enzima denominada aromatasa o CYP19A1, en específico, la AD es el sustrato para generar la estrona (E₁) y la T para el E₂. La E₁ y el E₂ son interconvertibles a través de una reacción reversible que involucra a la 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD17β3) (Gower, 2003; Monostory and Dvorak, 2011; Smith et al., 2013). Por otra parte, es importante referir que en los hombres eugonadales, el 80% de la producción de E₂ se deriva de la conversión periférica de la T, y solo el 10-20% es secretado directamente por los testículos (Kicman, 2010).

Adicionalmente, han sido descritas tres vías para la activación periférica de los andrógenos: la vía clásica es la denominada vía Δ₅, en esta vía, la actividad de la 17,20-liasa del CYP17A1 lleva a la conversión de la 17α-OH pregnenolona a la DHEA y ésta después es metabolizada

a 5-androstenediol por las HSD17 β 3 y aldo-ceto reductasa familia 1 miembro 3 (AKR1C3) y a T por medio de la 3 β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa tipos 1 y tipo 2 (HSD3 β 1,2). La T se convertirá en DHT en los tejidos periféricos debido a la actividad de la 5 α -reductasa (SRD5A1) (Wilson, 2001; Luu-The, 2013). En la denominada vía alternativa, la AD evita a la T como intermediario para la síntesis de DHT. La AD es reducida por la SRD5A1 produciendo androstanediona (Russell and Wilson, 1994; Schiffer et al., 2018), lo cual es seguido por la conversión de esta hormona a DHT a cargo de la AKR1C3 (Figura 1) (Luu-The and Labrie, 2010; Chang et al., 2011; Schiffer et al., 2019). La tercera vía es la llamada “puerta trasera”, la cual no requiere síntesis de T, AD o DHEA. En esta vía, los precursores de 21 carbonos (C21), principalmente la 17 α -OHP y la progesterona son sustratos para la SRD5A1 y la 3 α -HSD. Esto lleva a la generación de la 5 α -17OHP, la cual luego es catalizada por la 17,20-liasa para producir androsterona que será sustrato de la 17 β HSD y dará como producto el 3 α -androstanediol, la cual se convertirá en DHT a través de la oxidación por parte de la 3 α -HSD (Kamrath et al., 2012; Luu-The, 2013).

Después de producida la T por los testículos, ésta es secretada a la sangre donde se une en gran medida a las proteínas plasmáticas y sólo alrededor del 2 al 3% permanece como hormona libre (Dalton and Gao, 2010). Aproximadamente 50-68% de la T se encuentra unida a la albúmina con afinidad baja y un porcentaje menor, aproximadamente 30-45% se une a la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) con afinidad alta. La T libre difunde a los tejidos y entra a las células blanco para ejercer su efecto (Braunstein, 2007; Holt and Peery, 2010).

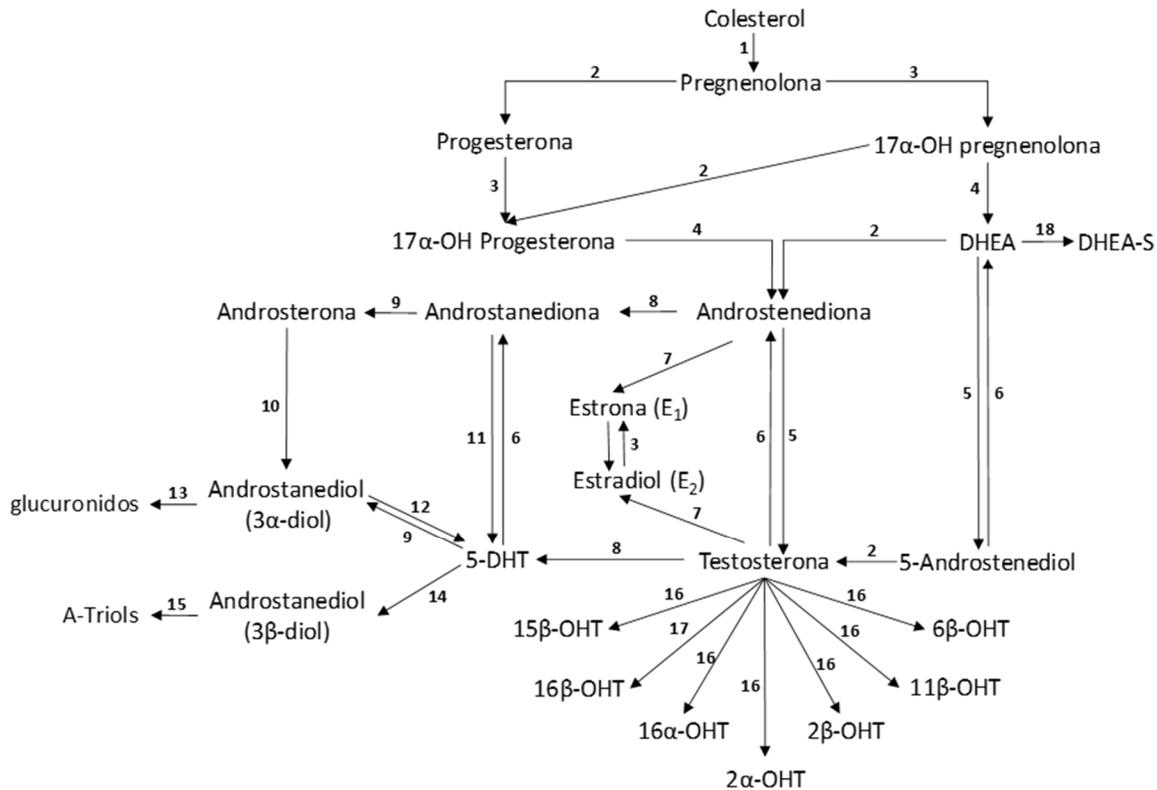


Figura 1. Síntesis y metabolismo de los andrógenos en el humano. **1)** CYP11A1 (CYP side-chain cleavage); **2)** HSD3β 1,2 (3β-hidroxi-esteroide deshidrogenasa tipo 1 y tipo 2); **3)** CYP17A1 hidroxilasa; **4)** CYP17A1 liasa; **5)** HSD17β3 y AKR1C3, (17β-hidroxi-esteroide deshidrogenasa tipo 3 y alfaetoreductasa familia 1 miembro 3); **6)** HSD17β2 (17β-hidroxi-esteroide deshidrogenasa tipo 2) y AKR1C3; **7)** CYP19A1 (aromatasa); **8)** SRD5A 1,2 (5α-reductasa tipo 1 o 2); **9)** AKR1C2 (aldo-ceto reductasa familia 1 miembro 2); **10)** HSD17β3 (17β-hidroxi-esteroide deshidrogenasa tipo 3); **11)** AKR1C3 (aldo-ceto reductasa familia 1 miembro 3); **12)** HSD17β6, HSD17β10 y HSD17β13 (17β-hidroxi-esteroide deshidrogenasa tipo 6, 10 y 13); **13)** UGT2β15 y UGT2β17 (UDP glucuronosiltransferasa familia 2 miembro β15 y β17); **14)** AKR1C1 (aldo-ceto reductasa familia 1 miembro 1); **15)** CYP7B1; **16)** CYP3A4; **17)** CYP2B6, 2C9, 2C19, 3A4; **18)** STS (sulfo-trasferasa). Dihidrotestosterona (DHT), dehidroepiandrosterona (DHEA), dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S), y -hidroxitestosterona (-OHT).

1.1.2 Metabolismo de la Testosterona

La biotransformación de la T se lleva a cabo en el hígado por varios mecanismos, como son la hidroxilación y oxidación, las cuales son llevadas a cabo por el CYP de forma estero- y

regio-específica mediante la unión de grupos hidroxilo al anillo esteroideo (Figura 1) (Waxman et al., 1991), ésto también proporciona sitios adicionales para reacciones de conjugación (Falany and Falany, 1996). Posterior a las reacciones de hidroxilación, la T se conjuga con ácido glucurónico o sulfúrico para ser excretada por la bilis y la orina. Otra vía de catabolismo son las reacciones de oxido-reducción en las que la T y la DHEA conducen a la formación de androsterona, eticolanolona y androstenediol (Gower, 2010b). La introducción de grupos hidroxilo en uno o más de los anillos de la T, así como la conjugación aumenta la solubilidad en agua y reduce o elimina la afinidad por el receptor de andrógenos (RA) (Monostory and Dvorak, 2011).

Dentro de las enzimas involucradas en el metabolismo oxidativo de la T se encuentran varias isoformas del CYP, las cuales tienen un grado variable de actividad catalítica en las reacciones de hidroxilación como se ha descrito en estudios *in vitro* (Figura 1) (Waxman et al., 1991; Niwa et al., 1998). El principal metabolito hidroxilado de la T que se ha descrito en seres humanos es la 6 β -hidroxitestosterona (6 β -OHT), y a menudo se usa como marcador del CYP3A4 hepático para estudios *in vitro* e *in vivo* (Waxman, 1988; Usmani et al., 2003b). El CYP3A4 es la isoforma predominante involucrada en la formación de la 6 β -OHT, sin embargo, otras isoformas, como los CYP3A5, 3A7, 1A1/2, 2D6, 2C19 y 2B6 también participan. El CYP3A4 también cataliza la formación de la 15 β -OHT, 16 β -OHT y 2 β -OHT (Choi et al., 2005), así como la formación de la 16 α -OHT, 2 α -OHT y 11 β -OHT. Además, la formación de la 16 β -OHT es catalizada por las isoformas CYP2B6, 2C9, 2C19 y 3A4 (Monostory and Dvorak, 2011). Los metabolitos 2 β -OHT y 15 β -OHT representan el siguiente grupo más representativo de metabolitos después de la 6 β -OHT, mientras que se ha

descrito que la 2α -OHT y 11β -OHT son metabolitos producidos en menor proporción por el CYP3A4. La oxidación de la T a la AD es catalizada por los CYP2C19 y 2D6 (Tachibana and Tanaka, 2001).

Es importante tener en cuenta que el contenido de proteína de los CYPs en el hígado y otros tejidos puede ser modificada a través de la exposición a xenobióticos u otros factores internos y externos que afectan la expresión del CYP puede provocar cambios en las tasas de hidroxilación de la T, lo cual provoca alteraciones en los procesos fisiológicos dependientes de esta hormona (Sanderson, 2006). Cada vez hay más pruebas de que varios xenobióticos con una estructura química diversa (medicamentos, contaminantes ambientales, pesticidas, etc.) tienen el potencial de aumentar el aclaramiento general de la T como consecuencia de la inducción hepática del CYP, lo que resulta en trastornos reproductivos en varias especies, riesgo de desarrollar cáncer dependiente de hormonas y otros efectos adversos sobre el crecimiento, el desarrollo y la reproducción (Wilson and LeBlanc, 2000; Gunderson et al., 2001; Sierra-Santoyo et al., 2005). Sin embargo, el estudio de este mecanismo de disrupción endocrina en el ser humano ha sido poco estudiado.

1.1.3 Eliminación

La T que no se fija a los tejidos se metaboliza con rapidez y en el hígado sufre reacciones de fase I y fase II como se indicó anteriormente, y después, estos productos del metabolismo son excretados por la orina y/o la bilis (Holt and Peery, 2010; Hall, 2011).

1.1.4 Regulación de la secreción de la T

La regulación de la secreción de la T se da a través de la retroalimentación negativa del eje hipotálamo-hipófisis-testículo; básicamente, el hipotálamo secreta la hormona liberadora de

gonadotropina (GnRH), la cual llega a la hipófisis anterior y estimula la liberación de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) al torrente sanguíneo. La LH se une a receptores específicos en las células de Leydig en el testículo y esto producirá la síntesis y secreción de andrógenos y la elevación de la T inhibirá la secreción de LH de la hipófisis anterior y producirá inhibición en el hipotálamo. Por otra parte, la hipófisis secreta FSH a la circulación sistémica y ésta se unirá a receptores específicos en las células de Sertoli en el testículo y estimulará la iniciación de la espermatogénesis, adicionalmente, las células de Sertoli producen inhibina, la cual inhibirá la secreción de la FSH (Braunstein, 2007; Hikin et al., 2007; Kicman, 2010; Almeida et al., 2017). De igual forma se ha descrito que la aromatización periférica de la T a E₂ producirá la retroalimentación negativa por parte de esta hormona (Kicman, 2010) (Figura 2).

1.1.5 Receptor de los andrógenos y mecanismo de acción

El receptor de andrógenos (RA) o receptor intracelular de la subfamilia 3, grupo C, miembro 4 (NR3C4), es un receptor que es activado principalmente por la T y la DHT. El gen de este receptor se encuentra localizado en el cromosoma X en el *locus* Xq11-Xq12, tiene más de 90 kb de longitud y codifica para una proteína de 919 aminoácidos que contienen los principales dominios funcionales, los cuales son el dominio N-terminal (NTD) que cumple una función moduladora, el dominio de unión al ADN (DBD) y el dominio carboxi-terminal de unión al ligando (LBD) y los dominios de trasactivación (AF-1, 2 y 5) (Figura 3). Una pequeña región bisagra separa al DBD y LBD que contiene señales de localización nuclear. El DBD está compuesto de dos dedos de zinc, el primero de ellos determina la especificidad de unión al ADN, mientras que el segundo facilita la dimerización del receptor y la estabilización del

complejo ADN-receptor (Green et al., 2012; Tan et al., 2014). Las regiones DBD y LBD son altamente conservadas entre especies, mientras que la NTD es la menos conservada (Lubahn et al., 1988).

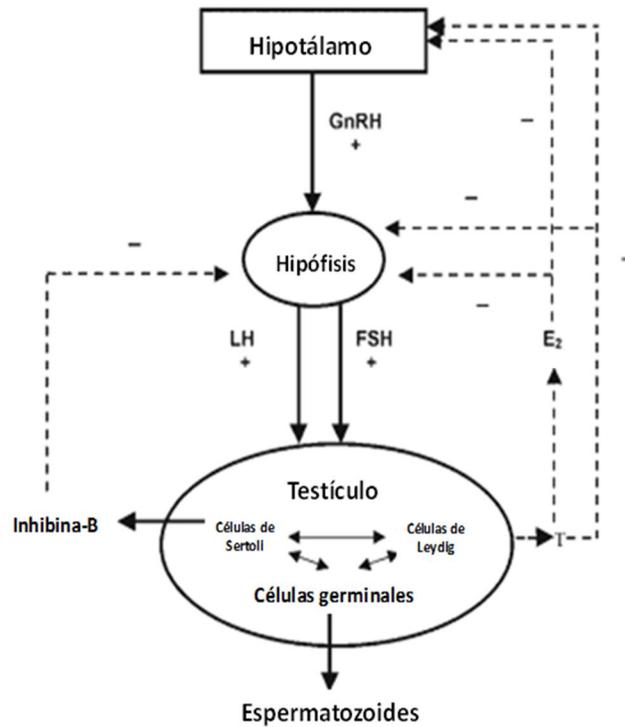


Figura 2. Regulación de la secreción de la testosterona en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo. Las líneas sólidas representan efectos estimulatorios y las líneas punteadas acciones de retroalimentación negativa. Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), hormona luteinizante (LH), hormona foliculo estimulante (FSH) y estradiol (E₂). Modificado de Hikin et al. (2007).

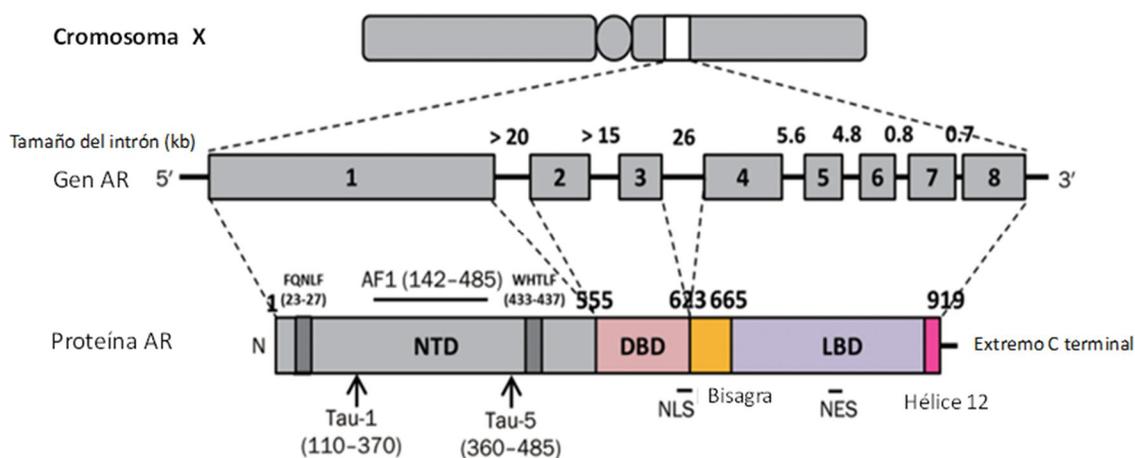


Figura 3. El gen del receptor de andrógenos. Ubicado en el brazo largo del cromosoma X (locus: Xq11-q12). Este gen codifica para una proteína de 919 aminoácidos que consta de varios dominios funcionales. Dominio N-terminal (NTD), dominio de unión al ADN (DBD) y dominio de unión a ligando (LBD). Modificado de Tan et al. (2014).

Al igual que otros receptores esteroideos, el RA sin ligando se localiza principalmente en el citoplasma y se encuentra asociado con un complejo de proteínas de choque térmico (HSP) a través de interacciones con el LBD, y al unirse el ligando o un agonista, el RA pasa por una serie de cambios conformacionales: las proteínas de choque térmico se disocian del receptor y el RA dimeriza, se fosforila y se transloca al núcleo. Ya en el núcleo, el RA se une a los elementos de respuesta a andrógenos (ARE) que se encuentran en el ADN, los cuales se caracterizan por una secuencia consenso de 6 nucleótidos: 5'-TGTTCT-3' espaciada por tres nucleótidos aleatorios y éste se encuentra localizado corriente abajo o corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción de un gen blanco del RA. El reclutamiento de otros cofactores de transcripción (incluidos los co-activadores y co-represores) y la maquinaria transcripcional asegura la transactivación de la expresión génica regulada por el RA (Figura 4) (Shang et al., 2002; Dalton and Gao, 2010; Green et al., 2012) y esto regula la expresión

de genes que participan en la proliferación celular, la diferenciación, el metabolismo y la apoptosis (Durdiakova et al., 2011).

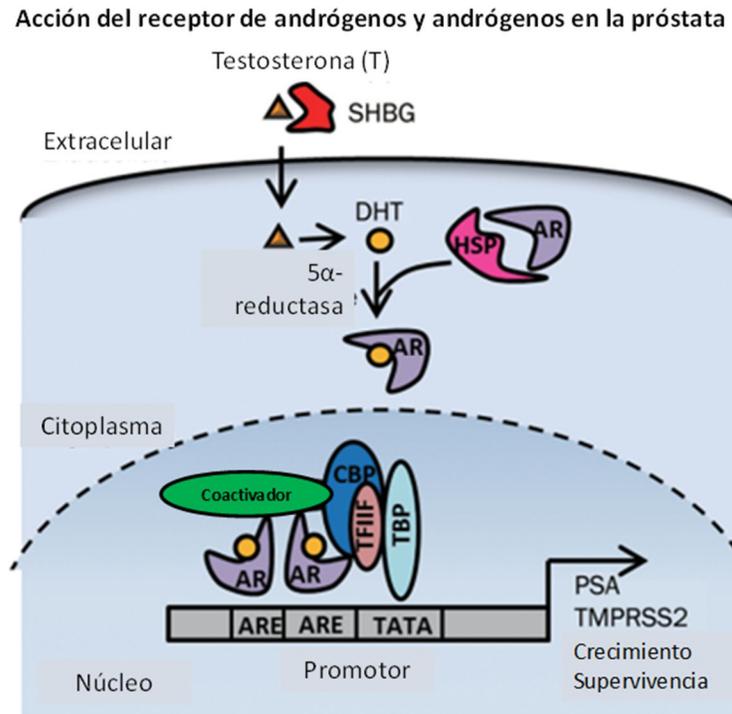


Figura 4. Mecanismo de acción de los andrógenos por medio de la vía clásica. Globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), dihidrotestosterona (DHT), receptor andrógenos (RA), proteínas de choque térmico (HSP), elemento de respuesta a andrógenos (ARE), genes diana como el antígeno prostático específico (PSA) y el gen que codifica a la proteasa de transmembrana serina 2 (TMPRSS2), miembros de la maquinaria de transcripción basal como la proteína de unión a la caja TATA (TBP) y el factor de transcripción IIF (TFIIF). Modificado de Tan et al. (2014).

Se han descrito dos mecanismos de acción de los andrógenos denominados la vía genómica o clásica y la vía no genómica o no clásica. La vía clásica se caracteriza porque requiere de 30-35 min para inducir la activación o represión transcripcional después del estímulo con la T y se requiere un tiempo adicional para la síntesis y secreción de proteínas (Shang et al.,

2002). La vía no genómica produce cambios en la función celular de segundos a minutos, a través de la interacción con vías de señalización asociadas a la membrana plasmática o al citoplasma (Norman et al., 2004) y a un aumento rápido de los niveles de calcio intracelular (Holt and Peery, 2010). Entre las vías de señalización que se han descrito se encuentra la activación de Src tirosina cinasa (Deng et al., 2017), factor de crecimiento epidérmico y receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGF-EGFR) (Chen et al., 2016), cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) (Shupe et al., 2011; Deng et al., 2017) y la activación de vías de señalización asociadas a receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), canales iónicos y receptores acoplados a enzimas (Heinlein and Chang, 2002; Simoncini and Genazzani, 2003); así mismo, las acciones no genómicas del RA también se han observado en varios tejidos y tipos de células como son las células de Sertoli, ovocitos, células del músculo esquelético, osteoblastos, células de cáncer de próstata y los del sistema cardiovascular, nervioso e inmunológico (Simoncini and Genazzani, 2003; Dalton and Gao, 2010).

La T puede producir sus efectos a través de tres modos de acción, los cuales dependerán del metabolismo específico de la T según el tejido: en primera instancia puede actuar directamente a través del RA en los tejidos diana; en segunda instancia se puede convertir a DHT (5–10%) por la SRD5A1 (estos efectos se observan en la próstata, el folículo piloso y en la virilización de los genitales externos) y la tercera es la aromatización a estrógenos por acción de la enzima aromatasa (0.2%) para actuar a través del receptor a estrógenos (RE), estos efectos han sido descritos en el hueso, procesos metabólicos y sistema nervioso (Dalton and Gao, 2010).

1.2 Función de los andrógenos

La T cumple muchas funciones en la vida intra y extrauterina como son: la diferenciación sexual, aparición de la pubertad, interviene en la salud ósea, funciones del músculo, erección, libido, cognición, estado anímico y eritropoyesis (Bain, 2007).

1.2.1 Sistema Reproductor

1.2.1.1 Diferenciación sexual

Independientemente de su composición cromosómica, el embrión en etapas tempranas tiene el potencial de desarrollar ya sea el fenotipo masculino o femenino. La diferenciación de las estructuras tubulares primitivas en genitales masculinos o femeninos depende de la expresión transitoria de un gen que está ubicado en el cromosoma Y, el gen *SRY*, el cual sólo se expresa en las gónadas indiferenciadas de aquellas células que están destinadas a convertirse en células de Sertoli. Uno de los principales efectos río abajo del producto del gen *SRY* es la expresión de un factor de transcripción denominado SOX9, que juega un papel crucial en la regulación de la expresión de otros genes en la vía de diferenciación. Posteriormente, las células de Sertoli liberarán señales extracelulares que hacen que las células cercanas proliferen, entre ellas las células de Leydig, y empiecen a producir T (Holt and Peery, 2010; Arnold, 2017). A continuación, los testículos producen el factor inhibidor Mülleriano para inducir la degeneración del sistema Mülleriano, es decir, el aparato ductal femenino interno y la producción de T para estimular el crecimiento y el desarrollo del sistema Wolffiano conformado por el epidídimo, el conducto deferente y las vesículas seminales, adicionalmente la conversión de la T a DHT causa el desarrollo de los genitales externos (Bain, 2007). La T regula tres aspectos principales del desarrollo fenotípico masculino como

son la conversión de los conductos de Wolff al epidídimo, conducto deferente y vesículas seminales, la formación de la uretra masculina y la próstata a partir del seno urogenital, y la formación del falo y escroto del tubérculo genital y uretral (Swain, 2006).

1.2.1.2 Pubertad

Durante la pubertad, los andrógenos estimulan el aumento del tamaño del pene y los testículos, aparición de vello en la región púbica y axilar, crecimiento de la barba, aumento del tamaño de la laringe y cambio en el tono de la voz, aumento en la densidad ósea y masa muscular, aumento en la masa de los eritrocitos, estimulación de la espermatogénesis y cambios de comportamiento relacionados con la estimulación del libido y agresividad (Hiort, 2002; Rogol, 2002; Braunstein, 2007); además de la aceleración del crecimiento, aumento en la función eréctil y la aparición de acné (Bain, 2007).

1.2.1.3 Adultez

En esta etapa de la vida, la T es la responsable del mantenimiento de la libido, espermatogénesis, masa muscular, fuerza, densidad ósea y estimulación de la eritropoyesis, factores que explicaremos con mayor detenimiento más adelante. En específico, la T contribuye a la función eréctil ya que favorece a la formación de óxido nítrico, el cual cuando se libera de los nervios del pene estimula a la guanilato ciclasa que cataliza la transformación de guanosina-5-trifosfato a GMP cíclico, el cual, a su vez, producirá vasodilatación con la consiguiente erección (Morelli et al., 2005).

1.2.2 Sistema Nervioso

La T es una hormona con múltiples funciones en el desarrollo morfológico y fisiológico del sistema nervioso y los rasgos cognitivos. Ésta modula la estructura cerebral y la

diferenciación de las neuronas durante la vida intrauterina con profundos efectos en las funciones del cerebro durante la vida posnatal (Durdiakova et al., 2011). El cerebro masculino debe ser expuesto a andrógenos durante los periodos críticos para adquirir las características funcionales y estructurales de su género; se ha descrito claramente el dimorfismo sexual en algunos núcleos en el cerebro humano (Negri-Cesi et al., 2004; Hines, 2010). Esta hormona ayuda a mantener una sensación de bienestar, influye en las habilidades cognitivas, específicamente habilidades verbales, aumenta la orientación espacial, la rotación mental, modula el estado de ánimo y el comportamiento (Durdiakova et al., 2011). Además, ha sido reportado que los hombres que cursan con altos niveles de T exhiben un comportamiento dominante (Carre and Archer, 2018). Los andrógenos también pueden modular casi todos los aspectos del comportamiento sexual, es decir, no solo las funciones autónomas sino también las funciones emocionales, motivacionales y cognitivas (Durdiakova et al., 2011).

Por otra parte, se ha demostrado que niveles altos de T libre fueron asociados con mejores puntajes en la memoria visual y verbal, el funcionamiento visoespacial y el escaneo visomotor y los hombres clasificados como hipogonadales tuvieron puntajes significativamente más bajos en las evaluaciones de desempeño de memoria y rendimiento visoespacial y una tasa más rápida de disminución en la memoria visual (Matsumoto, 2001, 2005; Romeo et al., 2004; Durdiakova et al., 2011). La T influye en las funciones del sistema nervioso, pero es importante tener en cuenta que todos los rasgos de comportamiento y habilidades cognitivas específicas de un individuo son el resultado de una cooperación de hormonas, factores genéticos y ambientales.

Además, se ha descrito que los esteroides sexuales influyen en la mielinización a través de su impacto directo en las células gliales, aumentan el número de sinapsis y la ramificación dendrítica, participan en el crecimiento celular, migración, apoptosis y metabolismo de neurotransmisores modulando la actividad neuronal (Matsumoto, 2001, 2005; Romeo et al., 2004; Durdiakova et al., 2011).

1.2.3 Sistema óseo

Los estrógenos y los andrógenos promueven la adquisición de masa ósea durante la pubertad y son responsables del dimorfismo sexual del esqueleto, además, ayudan a mantener la masa ósea y la fuerza durante la edad adulta al disminuir la tasa de remodelación y mantener un equilibrio entre la resorción y la formación del hueso (Almeida et al., 2017). La T tiene dos efectos principales en los huesos: a través de la conversión a E₂, esta hormona inhibe la actividad osteoclástica y, por lo tanto, la resorción ósea, y la DHT estimula la actividad osteoblástica y mejora la formación ósea (Bain, 2007; Mohamad et al., 2016). Los andrógenos preservan el hueso trabecular al disminuir la osteoclastogénesis y ambas hormonas contrarrestan la apoptosis de los osteoblastos y estimulan la apoptosis osteoclástica (Mohamad et al., 2016). En particular, los efectos de los estrógenos y los andrógenos sobre la masa ósea son mediados por el receptor de estrógenos (RE) α y β y el RA expresado en los osteoblastos y los progenitores de los osteoclastos. Los efectos de los estrógenos y andrógenos en el hueso pueden resultar desde la unión directa a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) y ARE por la denominada vía clásica, así como también se han descrito efectos no genómicos de las hormonas esteroideas en el hueso (Mohamad et al., 2016; Almeida et al., 2017). Adicionalmente, el envejecimiento en los hombres está asociado con

una disminución gradual del E₂ biodisponible, lo cual está relacionado con una disminución de la masa ósea que contribuye al desarrollo de osteoporosis en este grupo de edad (Francis, 1999; Tuck and Francis, 2009).

1.2.4 Sistema muscular

La suplementación con T aumenta la masa corporal magra y disminuye la grasa subcutánea e intermuscular en todo el cuerpo y produce aumento en la fuerza muscular (Storer et al., 2003, 2008; Bhasin et al., 2005). La T aumenta la masa muscular por múltiples mecanismos como la promoción del anabolismo de las proteínas musculares y la diferenciación de células madre pluripotenciales hacia el linaje miogénico, la inhibición de la diferenciación adipogénica, y adicionalmente, las neuronas motoras también contienen RA y responden a esta hormona con un aumento de tamaño (Singh et al., 2003, 2006; Bhasin et al., 2003; Herbst and Bhasin, 2004). Los efectos de la T sobre la diferenciación miogénica son mediados a través de la vía clásica (mediados por el RA) (Herbst and Bhasin, 2004). En un estudio que evaluó los efectos de la administración de T durante 3 años en hombres mayores sobre la fuerza muscular, la potencia, la fatigabilidad y la función física se encontró que el grupo al que se le administró la T presentó mejoras modestas pero significativas en la potencia al subir escaleras, la masa muscular y la fuerza (Storer et al., 2017)

1.2.5 Eritropoyesis

La relación entre la T y la eritrocitosis ha sido ampliamente descrita; la eritrocitosis ha sido definida como hemoglobina mayor de 18.5 g/dl y un hematocrito mayor a 52% en hombres. En particular, se ha descrito la eritrocitosis como uno de los efectos adversos comunes a la terapia con T (Calof et al., 2005; Jones et al., 2015; Ohlander et al., 2018). Algunos autores

han propuesto un mecanismo de eritrocitosis inducida por la T centrada en la supresión de hepcidina (péptido importante en la regulación del hierro), lo que resulta en un aumento en la absorción del hierro, del transporte sistémico de hierro y eritropoyesis. También se ha descrito que la T se asocia con la estimulación de la eritropoyetina y la reducción de la hepcidina y la ferritina (Bachman et al., 2010, 2014). Otros mecanismos de acción descritos es que los andrógenos estimulan la unidad formadora de colonias eritroide (CFU-E), aumento en la incorporación de hierro en los eritrocitos, aumento en la glicólisis, incremento en la síntesis de la hemoglobina, potenciación de la acción del factor de crecimiento insulínico tipo I, lo que lleva a efectos anti-apoptóticos en los eritrocitos y aumenta la vida de éstos (Shahani et al., 2009).

1.2.6. Comportamiento de la testosterona con la edad

Los niveles de T no permanecen estables a través de la vida, durante la etapa fetal, la gonadotropina coriónica placentaria estimula a los testículos para que produzcan cantidades moderadas de T durante todo el periodo de desarrollo fetal y durante 10 semanas después del nacimiento. Posteriormente durante la niñez y hasta la edad de 10 a 13 años, la producción de T es casi nula y en la pubertad aumenta con rapidez bajo el estímulo de las gonadotropinas hipofisarias y esta secreción continúa durante la mayor parte del resto de la vida (Hall, 2011). La T y la DHEA disminuyen con la edad, mientras que la LH, la FSH y SHBG aumentan (Feldman et al., 2002; Kaufman and Vermeulen, 2005; Basaria, 2013). Lo interesante es que aparentemente la DHT permanece constante a pesar del declive de su precursor (Swerdloff et al., 2017), varios estudios han descrito la disminución de los niveles de T con la edad en

diferentes grupos étnicos como los caucásicos (Feldman et al., 2002; Travison et al., 2007), chinos (Li et al., 2005) y japoneses (Yasuda et al., 2007).

Es importante hacer énfasis en que los niveles de T se mantienen a través de un equilibrio dinámico entre su biosíntesis, interacciones con otras hormonas, transporte, metabolismo, tasas de excreción y eliminación. Cualquier factor o circunstancia que altere alguno de estos procesos puede llevar a condiciones patológicas dadas las múltiples funciones de esta hormona.

1.3 Técnicas analíticas para la determinación y cuantificación de los andrógenos

Se han descrito diferentes métodos analíticos para la determinación de los andrógenos. El radioinmunoensayo (RIA) y el inmunoensayo enzimático (EIA) son los métodos más utilizados para el análisis de la T y otras hormonas esteroideas. Estos métodos tienen una sensibilidad alta, pero también tienen algunas desventajas como son el uso de isótopos radiactivos, especificidad y precisión bajas, interferencias de matriz, variabilidad significativa entre ensayos y solo se determina un analito a la vez (Gust et al., 2010; Koal et al., 2012), además, en la actualidad no hay anticuerpos disponibles para que los metabolitos hidroxilados de T sean cuantificados por estas técnicas. La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-MS) es la técnica estándar de oro para la determinación de esteroides porque muestra alta resolución, selectividad y sensibilidad; sin embargo, los analitos deben hidrolizarse y derivatizarse debido a que no son compuestos volátiles y éstos se encuentran conjugados, lo que en algunos casos puede resultar en un proceso poco práctico y lento (Kalogera et al., 2013; Caron et al., 2015). La cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) con una fuente de ionización por electrospray (ESI) es una

herramienta poderosa para el análisis de esteroides con fines clínicos sin requerir ningún procedimiento de derivatización de la muestra, esta técnica posee una alta especificidad y sensibilidad y se usa ampliamente para la identificación simultánea de T y otros esteroides en muestras de orina (Gonzalo-Lumbreras et al., 2003; Kalogera et al., 2013; Zang et al., 2014; Caron et al., 2015; Marcos and Pozo, 2016; Ereño Artabe et al., 2019).

En específico, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) incluye el uso de columnas selladas, las cuales contienen partículas finas ($< 5 \mu\text{m}$) que ofrecen la capacidad de separación con alta resolución, para lograr esto es necesario el uso de presiones elevadas (70-400 bar o 1,000-6,000 libras/pulg²) para forzar el paso del solvente a través de las partículas dentro de la columna (Snyder et al., 2012b). Desde el 2004, se dispone de columnas con partículas de 1.5 a 2 μm de diámetro que soportan presiones más elevadas (1,000 bar, 15,000 libras/pulgada²), y los instrumentos desarrollados para usar estas columnas proporcionan una resolución sustancialmente mayor, una sensibilidad mejor, un tiempo menor de ejecución y una reducción en el volumen del disolvente usado; a este último tipo de técnica se le denomina cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UPLC) (Harris, 2010).

Asociado al sistema cromatográfico se emplean detectores de diversos tipos como son detectores de absorbancia (UV-Vis), fluorescencia, electroquímicos, de conductividad, de índice de refracción y espectrometría de masas (Skoog et al., 2000a). Dentro de éstos los más empleados son el de absorbancia y en los últimos años ha tomado mucha fuerza el uso de la espectrometría de masas. Básicamente, cuando se mide la absorbancia se asume que ésta es proporcional a la concentración de la sustancia que absorbe la luz incidente, esto es expresado por la ley de Lambert-Beer que expresa que la absorbancia es igual al producto del coeficiente

de extinción molar por la longitud de la celda donde se encuentra la sustancia a ser medida y por la concentración de la sustancia que absorbe la luz. El coeficiente de extinción molar define que tan fuertemente una sustancia absorbe la luz a una longitud de onda dada por unidad de masa o por concentración molar (Rubinson and Rubinson, 2001). La mayoría del desarrollo de los métodos se lleva a cabo con detección ultravioleta (UV) utilizando una longitud de onda variable o un detector de arreglo de diodos (DAD) (Snyder et al., 2012a). Éste último consiste en un espectrofotómetro de barrido que realiza el escaneo de forma simultánea a distintas longitudes de onda (Skoog et al., 2000a). Con los detectores de absorbancia la identificación se lleva a cabo basados en el tiempo de retención (t_{ret}) y su espectro UV-Vis, pero esto no es suficiente para la identificación inequívoca del analito dada la posibilidad de que más de un analito tenga el mismo t_{ret} y el mismo espectro UV-Vis, por lo que si se desea la identificación inequívoca se requiere más información de otra técnica auxiliar y esta es la razón por la cual en los últimos años ha tomado fuerza el uso de detectores de masas acoplados al sistema cromatográfico. Dentro de las ventajas que estos detectores proporcionan, está la identificación definitiva de los compuestos de interés, permite determinar el peso molecular del analito que junto con la información estructural que se puede generar, a menudo permite una identificación inequívoca, y la alta selectividad del espectrómetro de masas proporciona capacidad de identificación en cromatografía no resuelta o parcialmente resuelta. Además, esta selectividad permite el uso de analitos etiquetados isotópicamente como estándares internos y esto, junto con una alta sensibilidad, permite determinaciones cuantitativas precisas y la aplicación de esta técnica a mezclas complejas donde se puede encontrar una gran cantidad de analitos (Ardrey, 2003). Para realizar la detección por espectrometría de masas es necesario emplear una interfaz cuyo

propósito principal es la vaporización de la fase móvil y la ionización de los analitos, actualmente las fuentes de ionización más usadas son las fuentes de ionización química a presión atmosférica (APCI), fotoionización a presión atmosférica (APPI) y electroespray (ESI), la aplicabilidad de cada una de estas formas de ionización depende del peso molecular, la presencia de ciertos grupos funcionales y su polaridad (Rubinson and Rubinson, 2001).

Por otra parte, se han reportado algunos métodos usando HPLC para evaluar los metabolitos hidroxilados de T en ensayos enzimáticos *in vitro* usando microsomas de rata y humano (Whalley et al., 2001; Wang and Zhang, 2007). Con estos métodos se han podido determinar las actividades enzimáticas de ciertas isoformas de CYP en rata y humano, lo que ha permitido determinar las diferencias en la expresión de los CYPs en estas especies lo que conlleva a un patrón metabólico diferente de la T (Monostory and Dvorak, 2011). Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito una metodología de HPLC o UPLC para determinar a la T y sus metabolitos hidroxilados en la orina humana, por lo tanto, no se ha dilucidado el perfil metabólico de la T y sus metabolitos por completo en esta matriz lo cual puede ser de gran utilidad en estudios sobre fisiología endocrina, disrupción endocrina y alteraciones en los sistemas reproductivo y endocrino.

1.4 JUSTIFICACIÓN

La T es una hormona importante que lleva a cabo múltiples funciones en muchos sistemas; como parte de su proceso metabólico, ésta sufre algunos cambios en su estructura química que de forma general la lleva a la inactivación, aunque se han reportado que algunos de estos metabolitos poseen la capacidad de activar el RA y podrían estar involucrados en algunas patologías dependientes de hormonas. Además, el proceso metabólico de la T es complejo,

dado por intrincadas vías y la participación de múltiples intermediarios y enzimas. Actualmente no se conoce el perfil metabólico de excreción completo de la T en lo que respecta a los metabolitos hidroxilados de la T en la orina humana y tampoco se ha descrito un método analítico por UPLC-MS para la determinación de estos metabolitos en esta muestra biológica. Por lo tanto, no se conoce la participación de estos productos catabólicos en el balance total de la T a lo largo de la vida. El desarrollo de un método analítico de UPLC-MS que nos permita determinar el perfil de estos metabolitos hidroxilados de la T resultará de mucha ayuda para entender mejor el catabolismo de la T, definir cuáles son los patrones normales de éstos en hombres en diferentes condiciones fisiológicas y explorar cómo se pueden alterar estos patrones debido a algunas enfermedades, cambios en el estilo de vida o por exposición a xenobióticos, por lo tanto, la determinación de estos metabolitos en una matriz de fácil acceso podría ser útil para determinar la asociación con el desarrollo de algunas patologías dependientes de hormonas, como el cáncer de próstata, disrupción endocrina, estudios del sistema endocrino y reproductor.

1.5 HIPÓTESIS

La cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a un detector de masas (UPLC-MS) será capaz de identificar a la testosterona, la androstenediona y sus metabolitos hidroxilados en muestras de orina de hombres jóvenes y mayores de 55 años.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo general

- Desarrollar y optimizar un método analítico de cromatografía de líquidos acoplado a un detector de masas para determinar a la testosterona, la androstenediona y sus metabolitos hidroxilados en muestras de orina de hombres jóvenes y de la tercera edad.

1.6.2 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones cromatográficas para la determinación de la testosterona, la androstenediona y sus metabolitos hidroxilados en orina humana con adecuada resolución, definición y linealidad.

- Optimizar y validar este método analítico de cromatografía de líquidos para la determinación de testosterona, androstenediona y sus metabolitos hidroxilados en orina humana.

- Optimizar las condiciones de hidrólisis enzimática de la testosterona, androstenediona y los metabolitos conjugados de la testosterona en orina humana.

- Aplicar el método a muestras biológicas para comprobar su utilidad.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Estrategia experimental

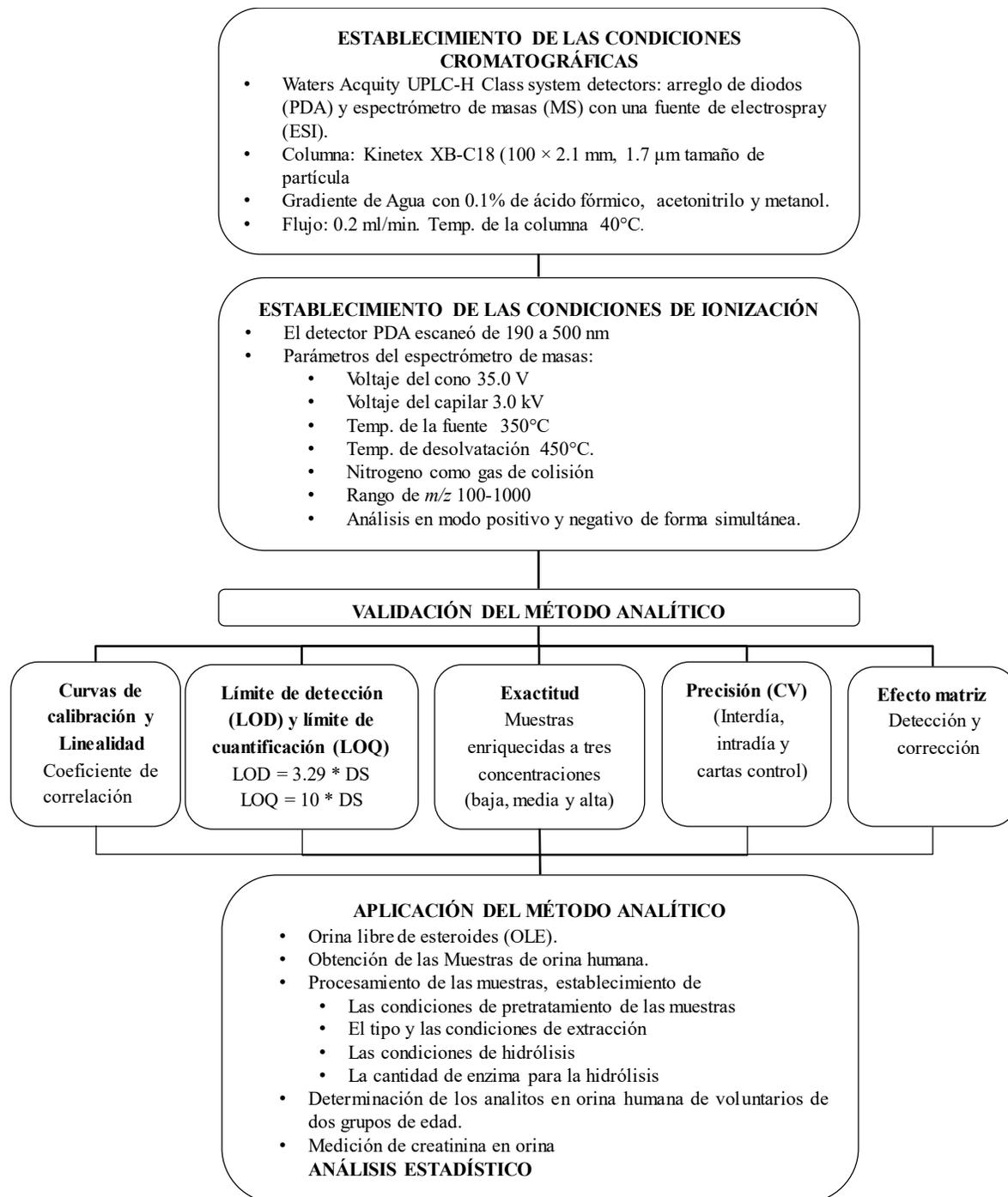


Figura 5. Estrategia experimental

2.2 Reactivos y estándares

La T, AD, 6 β -OHT, 16 β -OHT, 15 β -OHT, 2 β -OHT, 11 β -OHT, 2 α -OHT, 16 α -OHT, 2-hidroxiestradiol (2-OHE₂), 4-hidroxiestradiol (4-OHE₂), 4-hidroxiestrona (4-OHE₁), 4-metoxiestrona (4-MeOE₁), DHEA, androstenediol y 6-dehidrottestosterona (6-DHT) (usado como estándar interno, EI) fueron obtenidos de Steraloids Inc. (Newport, RI, EUA). Los reactivos E₁, E₂, estriol (E₃), 16-Epiestriol (16-epiE₃), 16 α -hidroxiestrona (16 α -OHE₁), 2-hidroxiestrona (2-OHE₁) y β -glucuronidasa/sulfatasa tipo HP-2 del jugo de *Helix pomatia* se compraron de Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, EUA). El acetonitrilo, el agua, el metanol grado masas, el sulfato sódico anhidro y los cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) C18 (BAKERBOND speTM 40 μ m, 60 Å) fueron obtenidos de J.T. Baker (Center Valley, PA, EUA). El carbonato de sodio y el bicarbonato de sodio fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). Todos los reactivos usados fueron de la más alta pureza disponible.

2.3 Obtención de las muestras de orina

Para la obtención de las muestras de orina se realizó una invitación abierta a hombres entre 20 y 25 años y de 55 a 75 años, por medio de anuncios colocados en la entrada y en los pasillos de los departamentos del CINVESTAV. A los sujetos que aceptaron participar se les explicó en qué consistía la investigación, el objetivo del estudio, los posibles riesgos, el impacto de éste y cuál sería el uso de las muestras recolectadas. Después se les solicitó que firmaran el consentimiento informado, se les aplicó un cuestionario mediante el cual se obtuvo información sobre características sociodemográficas básicas como ocupación, edad, número de hijos, antecedentes patológicos, personales y familiares y se les solicitó la donación de la muestra de orina, la primera orina de la mañana del día siguiente. Se

recolectaron muestras de orina de 10 hombres adultos voluntarios: 5 en el rango de 25 a 30 años y 5 en el rango de 50 a 75 años. A cada participante se le solicitó una muestra de orina de aproximadamente 100 ml, las cuales se almacenaron a -70 °C hasta su procesamiento. La orina fue utilizada para la estandarización del método analítico y la posterior prueba del método establecido.

Para salvaguardar los derechos de los participantes se hizo énfasis en mantener el respeto, la confidencialidad y privacidad al momento de llevar a cabo las entrevistas y con los datos recabados. Así mismo, los participantes recibieron la información necesaria que les permitió aclarar las dudas que surgieran acerca de su participación. Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética para la Investigación en Seres Humanos (COBISH) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

2.4 Obtención de la orina libre de esteroides

Para preparar la orina libre de esteroides (OLE) se realizó un *pool* de orina de los diez voluntarios, el cual se pasó a través de cartuchos C18 previamente activados con 5 ml de metanol y 5 ml de agua. Los esteroides urinarios y otros compuestos que podrían interferir fueron retenidos en los cartuchos y la fracción no retenida se recolectó y se usó como matriz (Gonzalo-Lumbreras et al., 2003); antes de usar esta orina, se verificó la ausencia de los analitos de interés. La preparación de la OLE fue muy importante para la validación del método, ya que la orina es una matriz compleja y se ha reportado una interferencia alta en cromatografía de líquidos y espectroscopía de masas (Matuszewski et al., 2003), por esta razón, las gráficas de calibración y las pruebas de recuperación se hicieron sobre esta matriz.

2.5 Análisis de la T y sus metabolitos hidroxilados por cromatografía de líquidos

2.5.1 Principio de la cromatografía de líquidos

La cromatografía es un método de separación física en el que los componentes a separar se distribuyen selectivamente entre dos fases inmiscibles: una fase móvil que fluye a través de la fase estacionaria; la técnica lleva el nombre específico según la fase móvil (gas, líquido o un fluido supercrítico). El proceso cromatográfico ocurre como resultado de repetidos pasos de adsorción/desorción durante el movimiento de los analitos a lo largo de la fase estacionaria, la separación se debe a las diferencias en los coeficientes de distribución de los analitos en las dos fases inmiscibles (Niessen, 2006).

2.5.2 Condiciones cromatográficas

Los metabolitos hidroxilados de la T, AD y 6-DHT se analizaron usando un equipo Waters Acquity UPLC™ clase H (Waters, Milford, MA, EUA) equipado con una bomba cuaternaria, automuestreador FTN, horno para la columna y un detector de arreglo de diodos (PDA), interconectado con un espectrómetro de masas tipo cuádruplo simple SQD2 equipado con una fuente de ionización de electrospray (ESI). El software MassLynx versión 4.1 fue usado para controlar el sistema UPLC-MS y para la adquisición y procesamiento de los datos. El método analítico se desarrolló utilizando una columna Kinetex XB-C18 100 × 2.1 mm, con un tamaño de partícula 1.7 μm, 100 Å (Phenomenex, Torrance, CA, EUA). Las fases móviles consistieron en agua con ácido fórmico al 0.1% (A), acetonitrilo (B) y metanol (C). Las condiciones iniciales fueron 64:29:7 (A:B:C), posterior a la inyección de la muestra, se aplicó un gradiente lineal de 10 min a 53:40:7 (A: B: C), seguido de un gradiente lineal de 3 min a 52.3:41.1:6.6 (A:B:C). Después se restablecieron las condiciones iniciales en 0.1 min y se mantuvieron durante 2 min para reequilibrar la columna. El flujo fue de 0.2 ml/min, la

temperatura de la columna se ajustó a 40 °C y el volumen de inyección fue de 2 µl. En la Tabla 1 y la Figura 6 se presenta el programa de la proporción de los solventes de la fase móvil utilizada. El tiempo de análisis total fue de 15 min y la identificación de los analitos se confirmó mediante la comparación del tiempo de retención (t_{ret}) y el espectro de masas obtenido con estándares puros.

Las condiciones de operación en el espectrómetro de masas (MS) fueron: voltaje del cono de 35.0 V y del capilar 3.0 kV, las temperaturas de la fuente fueron de 350 °C y la de desolvatación fue de 450 °C, el flujo del gas (N₂) del cono fue de 10 l/h y el flujo de gas de desolvatación de 500 l/h. El modo de monitoreo de la reacción seleccionada (MRS) se usó para la adquisición de los datos. Para la identificación de los compuestos, el detector PDA escaneó en un rango de 190 a 500 nm y el espectro de masas fue obtenido en un rango de masa de m/z 100-1000 con una duración de escaneo de 0.5 s en los modos positivo y negativo.

Tabla 1. Programa de solventes usados para el análisis de los metabolitos hidroxilados de testosterona, la testosterona y la androstenediona.

Tiempo (min)	Proporción de solventes (%)		
	Agua + Ácido Fórmico 0.1% (A)	Acetonitrilo (B)	Metanol (C)
0	64	29	7
10	53	40	7
13	52.3	41.1	6.6
13.1	64	29	7
15	64	29	7

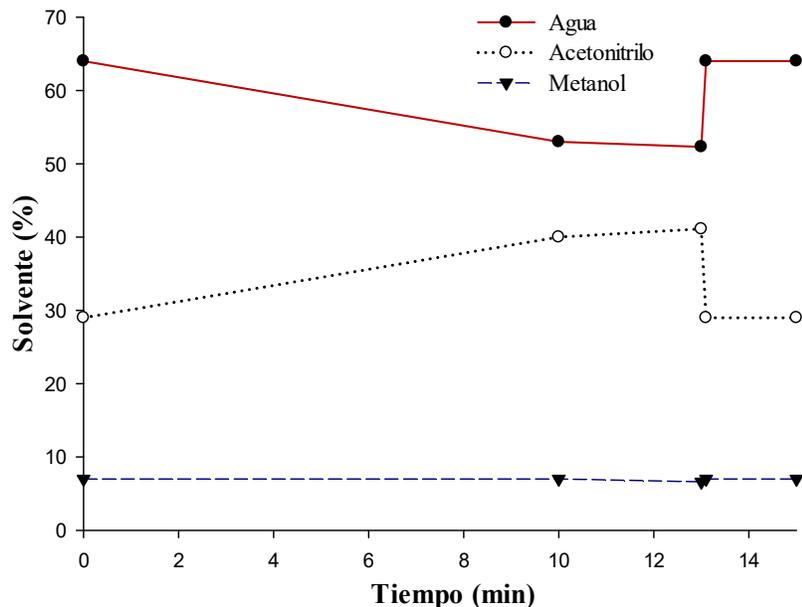


Figura 6. Proporción de los solventes para la determinación de los metabolitos hidroxilados de la testosterona, la testosterona y la androstenediona.

2.5.3 Preparación de las soluciones estándar

La T, AD, 16 β -OHT, 6 β -OHT, 11 β -OHT, 2 β -OHT, 15 β -OHT 2 α -OHT, 16 α -OHT, 6-DHT, 2-OHE₂, 4-OHE₂, 4-OHE₁, 4-MeOE₁, DHEA, androstenediol, E₁, E₂, E₃, 16-epiE₃, 16 α -OHE₁ y 2-OHE₁ fueron disueltos en metanol grado masas para obtener concentraciones de 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml y 0.001 mg/ml. Las soluciones se almacenaron a -20 °C hasta su uso y se prepararon nuevamente con una frecuencia de cada cuatro semanas o cuando la respuesta del área pico disminuyó más del 10%.

2.5.4 Validación del método

Posterior a la creación del método analítico se procedió a realizar la validación de éste, para ello se realizaron las gráficas de calibración, el cálculo de los límites de detección (LOD, por sus siglas en inglés), de cuantificación (LOQ, por sus siglas en inglés) y de la linealidad, se

evaluó también la exactitud y la precisión y se realizaron cartas control. El método desarrollado fue validado de acuerdo con las directrices de la Conferencia Internacional de Armonización [ICH (Q2(R1))] en términos de linealidad, precisión y exactitud (ICH, 2005). Las curvas de calibración se prepararon sobre OLE para evitar posibles efectos de matriz y éstas se prepararon en un rango de 25 a 1250 ng/ml ó 50 pg a 2500 pg para todos los analitos con seis concentraciones diferentes y cada punto fue realizado por triplicado; para realizarlas se graficó la intensidad *versus* la cantidad del analito agregado a la orina OLE. La cuantificación de los analitos se llevó a cabo mediante la interpolación de los resultados en las gráficas de calibración realizadas por el método de estándar externo, adicionalmente, se agregaron 80 ng/ml de 6-DHT como estándar interno. El coeficiente de regresión, la pendiente y la intersección de la recta fueron calculados con el programa SigmaPlot ver. 13.0 (Systat Software, Inc., Richmond, CA, EUA). Los valores del área del pico se obtuvieron por integración manual.

Los LOD se calcularon por medio de la ecuación: $3.29 \times$ desviación estándar (DE) y los LOQ por medio de la ecuación $10 \times$ DE (Shrivastava and Gupta, 2011). La DE se calculó a partir de la inyección de siete réplicas de una concentración baja de la gráfica de calibración de cada estándar (50 ng/ml). Las medidas de la precisión intra e interdía fueron realizadas de la siguiente forma: para evaluar la precisión intradía, cada estándar se analizó en tres concentraciones diferentes por triplicado en un día. Mientras que para la precisión interdía se analizó cada estándar en tres concentraciones diferentes por triplicado durante cinco días y la T se analizó en tres concentraciones diferentes por triplicado cada día del análisis. Los datos de precisión se expresaron como coeficiente de variación (CV). La exactitud se evaluó en muestras de OLE enriquecidas con 6β -OHT, 15β -OHT, 16α -OHT, 16β -OHT, 11β -OHT,

2 α -OHT, 2 β -OHT, T y AD utilizando tres cantidades diferentes, 100 ng/ml (bajo), 500 ng/ml (medio) y 1000 ng/ml (alto) por triplicado. Estas muestras se procesaron para su análisis de manera similar a las muestras humanas reales. Las cartas control para T, AD y 6-DHT se utilizaron como controles internos de calidad del método de ionización del analito, repetibilidad y para evaluar la estabilidad de los estándares.

El efecto de la matriz se evaluó determinando la variabilidad de las pendientes de las gráficas de calibración realizadas en dos condiciones diferentes, una gráfica de calibración se realizó sobre metanol y la otra gráfica se construyó sobre OLE para 16 α -OHT y T, y si la diferencia entre las pendientes era mayor del 10% se concluía que había un efecto matriz “relativo” (Matuszewski, 2006). Las pendientes de las curvas de calibración se determinaron a partir del análisis de regresión lineal del área del pico contra las concentraciones de analito.

2.5.5 Procesamiento de las muestras de orina para el análisis de la testosterona y sus metabolitos hidroxilados

2.5.5.1 Extracción de los metabolitos hidroxilados de la orina

Para la determinación de la T, AD y los metabolitos hidroxilados de T fue necesario realizar la extracción de éstos de la orina y posteriormente realizar una hidrólisis enzimática con β -glucuronidasa/sulfatasa, ya que estos compuestos se excretan en la orina conjugados con ácido glucurónico o sulfúrico y es necesaria su desconjugación para su posterior cuantificación.

2.5.5.2 Principio

En la extracción en fase sólida un compuesto orgánico hidrófobo se une químicamente a sílice en polvo, el cual se comporta como la fase sólida extractora. Usualmente en fase reversa se une un octadecilo (C18) a la sílice. Estos grupos funcionales atraen compuestos hidrófobos (esteroides) presentes en la muestra mediante interacciones de Van der Waals y los extraen de la solución acuosa, después estos compuestos son eluidos con un solvente no polar para continuar con el análisis (Skoog et al., 2000b).

2.5.5.3 Procedimiento

A 3 ml de orina humana se le agregaron 80 ng/ml de 6-DHT (EI), posteriormente, la T y sus metabolitos hidroxilados se extrajeron por medio de cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) C-18, previamente activados con 5 ml de metanol y 5 ml de agua. Los metabolitos retenidos en los cartuchos fueron eluidos con 3 ml de metanol, el cual se evaporó bajo una corriente de nitrógeno en un baño seco a 40 °C. Al residuo se le ajustó el pH con una solución amortiguadora de acetatos 0.5 M a pH 5, posteriormente se agitó vigorosamente un minuto y se agregaron 7,500 UI de β -glucuronidasa/sulfatasa de *H. pomatia*, la mezcla se incubó durante 1 h a 50 °C. La reacción enzimática se detuvo agregando 50 mg de la mezcla de $\text{Na}_2\text{CO}_3:\text{NaHCO}_3$ (1:10, p/p) para ajustar el pH a 8.5. A la muestra con los metabolitos hidrolizados se le agregó 5 ml de éter etílico, la mezcla se agitó vigorosamente durante 10 min y se centrifugó a $1,660 \times g$ por 15 min a 4 °C. Posteriormente, la fase orgánica se secó en sulfato de sodio anhidro y se evaporó con una corriente suave de nitrógeno a temperatura ambiente, el residuo se guardó en congelación a -20 °C hasta su análisis por UPLC-MS. En

el momento del análisis, el residuo se disolvió en 150 µl de metanol grado masas (Saugy et al., 2000; Escobar-Wilches, 2011).

2.6 Determinación de creatinina en la orina

2.6.1 Principio

La creatinina es un derivado aminoácido de peso molecular bajo fisiológicamente inerte que no se liga a proteínas plasmáticas y se filtra libremente por el glomérulo por lo que se utiliza comúnmente como marcador de filtración glomerular. Ésta se produce endógenamente, ya que es el producto de la hidrólisis enzimática de la creatina, compuesto que almacena energía en el músculo. La producción de creatinina es constante si la masa muscular permanece constante (Pertierra et al., 2001; Calabia and Arias, 2009). Debido a lo anterior, la concentración de creatinina en la orina se utiliza para compensar las variaciones en la producción de orina, y de esta manera se ajustan las concentraciones de los analitos en la orina. La determinación de la creatinina por el método de Jaffe sin desproteinizar consiste en la reacción entre la creatinina y el ácido pícrico en solución alcalina para formar un complejo coloreado naranja-rojo, la formación de éste es directamente proporcional a la concentración de creatinina (Bartels et al., 1972).

2.6.2 Procedimiento

Para la determinación de creatinina se usó el kit Randox CR510, el cual consiste en: una solución patrón de creatinina 177 µmol/l (2 mg/dl), ácido pícrico 35 nmol/l (reactivo R1a) e hidróxido de sodio 0.32 mol/l (reactivo R2b). Una alícuota de orina se diluyó 1:50 con agua tridestilada, se preparó el reactivo de trabajo al mezclar volúmenes iguales de los reactivos R1a y R2b. El reactivo patrón se preparó mezclando 450 µl del reactivo de trabajo y 50 µl de la solución patrón. Para la determinación de la creatinina en las muestras, a 50 µl de la

muestra diluida se le agregó 450 µl del reactivo de trabajo, la mezcla se agitó y se midió la absorbancia a 492 nm (Vitalab Eclipse 1.6 Merck). El blanco consistió en 500 µl de agua tridestilada.

2.7 Análisis estadístico

Los datos de la evaluación del orden de la extracción-hidrólisis o hidrólisis extracción de los metabolitos conjugados en orina se les realizó prueba de “t” de Student. Los datos de las concentraciones de enzima a utilizar se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba *post hoc* de Holm-Sidak para evaluar las diferencias entre los grupos. Los datos de la T y sus metabolitos se analizaron mediante la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney. El análisis estadístico se realizó usando SigmaPlot ver. 13 (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA). La significancia se estableció a una $p < 0.05$.

3. RESULTADOS

3.1 Desarrollo y validación del método cromatográfico de UPLC

Con las condiciones cromatográficas establecidas en este trabajo, fue posible resolver, identificar y cuantificar simultáneamente a la T, AD y siete metabolitos hidroxilados de la T, además, del EI en un tiempo de 15 min. En la Figura 7A se presenta un cromatograma de la corriente total de iones (TIC) típico de UPLC-MS obtenido de la mezcla de los estándares. En este cromatograma se observa una buena resolución y definición de los picos de los analitos en una corta ventana de tiempo, también se consiguió observar una línea base estable y los picos tienen una base estrecha, lo que permite una fácil integración de estos. Todos los analitos separados fueron identificados de acuerdo con su t_{ret} y el espectro de masas de la molécula protonada $[M+H]^+$ obtenido por ionización positiva por ESI (Tabla 2). El primer compuesto en eluir fue la 6 β -OHT con un t_{ret} de 2.02 min y el último fue la AD con un t_{ret} de 9.96 min (Tabla 2). El espectro de masas, el patrón de fragmentación y el t_{ret} de cada uno de los analitos fue determinado (Figura 7B-K). En el espectro de masas obtenido para cada metabolito, la molécula protonada $[M+H]^+$ se produjo para la gran mayoría de los analitos y ésta, junto con el t_{ret} del estándar puro fue la base para la identificación de los analitos en la orina. Los t_{ret} y los espectros de masas no se vieron afectados por los componentes de la matriz, ya que no hubo diferencias entre los espectros de masas obtenidos con estándares diluidos en metanol y los estándares agregados a la OLE, ni en los espectros de masas de las muestras y los t_{ret} observados de la mezcla de estándares.

Tabla 2. Tiempos de retención (t_{ret}), peso molecular y molécula protonada de la testosterona, sus metabolitos hidroxilados y la androstenediona.

Analito	t_{ret} (min)	Peso molecular	Molécula protonada m/z [M+H]⁺
6 β -OHT	2.02	304.42	305.20
15 β -OHT	2.21	304.42	305.22
16 α -OHT	2.94	304.42	305.22
16 β -OHT	4.02	304.42	305.20
11 β -OHT	4.23	304.42	305.19
2 α -OHT	4.70	304.42	305.21
2 β -OHT	4.95	304.42	305.18
T	8.52	288.42	289.20
AD	9.96	286.41	287.17
6-DHT (EI)	7.49	286.41	287.22

Dado que la orina es una matriz compleja donde se pueden encontrar muchos otros analitos y en particular esteroides que pueden coeluir con los analitos de interés de este estudio, con el método cromatográfico desarrollado se realizaron corridas con otros andrógenos y estrógenos que podrían estar presentes en la orina humana coeluir y dificultar la identificación de la T, la AD y los metabolitos hidroxilados de la T, los esteroides analizados fueron E₃, 16-epiE₃, 16 α -OHE₁, 4-OHE₂, 2-OHE₂, 2-OHE₁, 4-OHE₁, 5-androstenediol, E₂, 4-MeOE₂, 2-MeOE₂, E₁, DHEA, 4-MeOE₁ y 3-MeOE₁. Los t_{ret} , el peso molecular y el peso del ion molecular representativo (m/z) de cada uno de éstos se presentan en la Tabla 3.

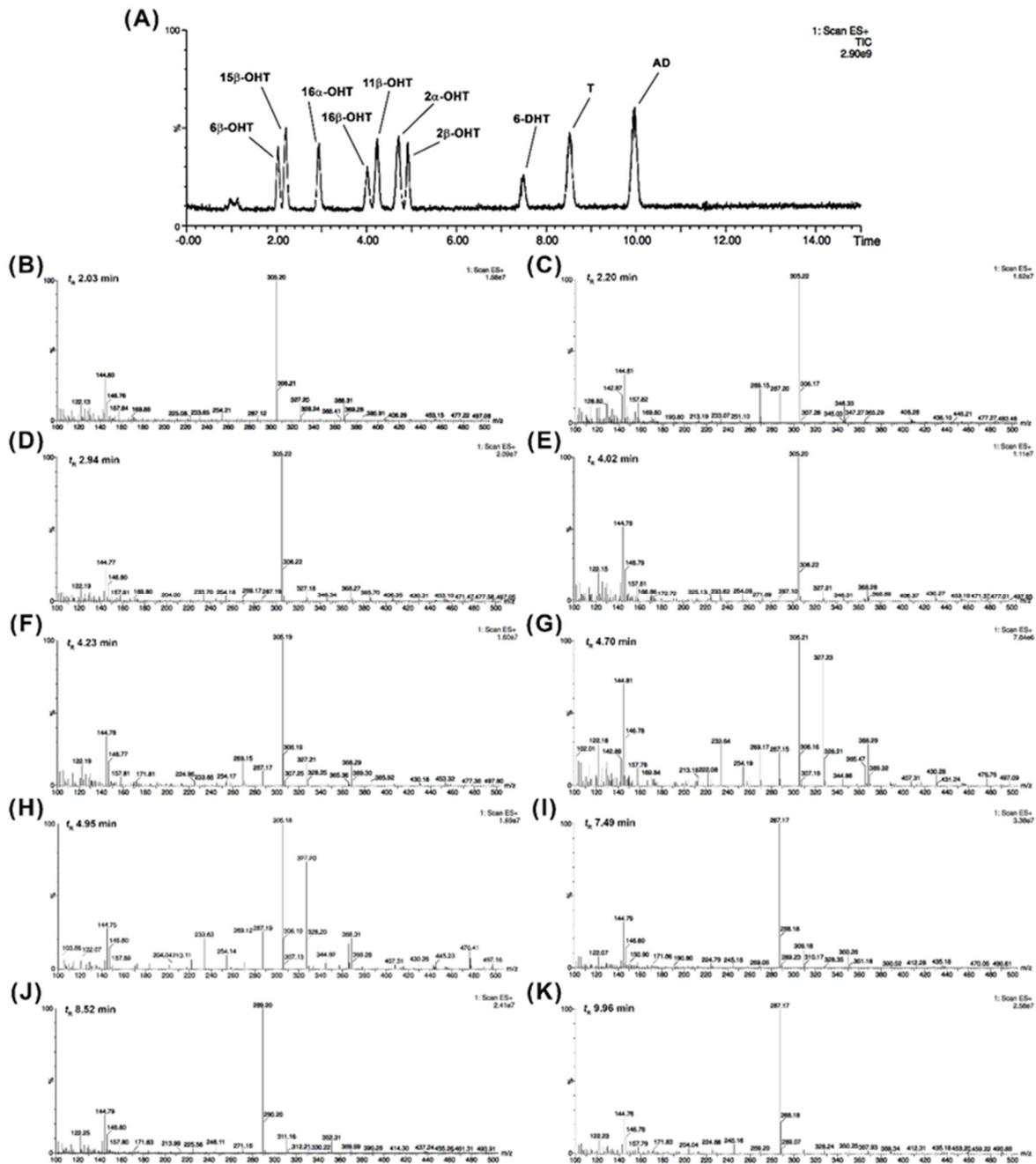


Figura 7. Cromatograma de la corriente total de iones (TIC) obtenido por UPLC-MS de la mezcla de los estándares y el estándar interno a 0.01 $\mu\text{g/ml}$ (A) y sus espectros de masas por ESI⁺. 6 β -OHT (B), 15 β -OHT (C), 16 α -OHT (D), 16 β -OHT (E), 11 β -OHT (F), 2 α -OHT (G), 2 β -OHT (H), 6-DHT (I), testosterona (J) y androstenediona (K).

Tabla 3. Tiempos de retención (t_{ret}), peso molecular y pesos de los iones moleculares representativos de algunos esteroides urinarios.

Analito	t_{ret} (min)	Peso molecular	Peso del ion molecular (m/z)
E ₃	2.1	288.38	289.6
16-epiE ₃	3.4	288.38	271.2
16 α -OHE ₁	3.5	286.4	287.1
4-OHE ₂	4.8	288.38	287.7
2-OHE ₂	5.0	288.38	287.2
2-OHE ₁	6.3	286.4	287.2
4-OHE ₁	6.6	286.37	287.2
5-androstenediol	7.4	290.44	273.1
E ₂	7.5	272.38	255.2
4-MeOE ₂	8.2	302.41	285.22
2-MeOE ₂	9.0	302.41	303.3
E ₁	9.5	270.37	271.6
DHEA	9.9	288.42	271.2
4-MeOE ₁	10.3	300.39	301.7
3-MeOE ₁	11.8	300.39	301.3

Muy pocos de los esteroides analizados coeluyeron con los analitos de interés y los que lo hicieron presentaron diferente patrón de fragmentación, lo que nos permitió diferenciarlos de la T, sus metabolitos hidroxilados o la AD. Además, los patrones de fragmentación para éstos son variados dado que en algunos el principal patrón es la molécula protonada, en otros la molécula desprotonada e incluso en unos pocos presentan un fragmento (Tabla 3). En este sentido, nuestro método presenta una ventaja que es el de estar monitoreando en modo positivo y modo negativo simultáneamente ya que, si no fuera así, se tendrían que realizar corridas dobles (una en modo positivo y otra en modo negativo) para poder determinar cuál de las dos formas de ionización es mejor para cada analito.

Después de haber establecido las condiciones cromatográficas para el análisis de la T y sus metabolitos hidroxilados se procedió a realizar las gráficas de calibración. En la Tabla 4 y la

Figura 8 y 9 se presentan las gráficas de calibración y los parámetros de la recta de cada uno de los analitos. Con base en los valores de los coeficientes de correlación calculados (0.9972 a 0.9998) se observó una buena correlación lineal en un rango de 25 a 1250 ng/ml para todos los analitos. Posteriormente se procedió a calcular los LOD y los LOQ para cada uno de los analitos, los LOD calculados estuvieron en un rango de 1.360 a 13.054 ng/ml y los valores de los LOQ estuvieron entre 4.134 a 39.679 ng/ml, mientras que la T fue el analito más sensible, la 11 β -OHT fue la menos sensible (Tabla 4). La precisión intradía e interdía fue inferior al 3.9 y al 7.1%, respectivamente. Es importante señalar que estas determinaciones se llevaron a cabo sobre la matriz. El CV para los t_{ret} intradía fue < 1.04% y el interdía fue < 1.53%, estos valores indican buena repetibilidad del equipo y del método. Las cartas control para los analitos se realizaron durante seis meses mostrando valores dentro de los límites aceptables (± 2 DE), reflejando la estabilidad de la T y sus metabolitos, así como la repetibilidad del método (Figura 10).

Para determinar la exactitud del método se realizaron ensayos de recuperación con muestras de OLE enriquecidas con T y los metabolitos 6 β -OHT, 16 α -OHT, 16 β -OHT, 11 β -OHT, 2 α -OHT, 2 β -OHT, 15 β -OHT y AD, además del EI (6-DHT). El enriquecimiento se realizó a tres concentraciones: baja (100 ng/ml), media (500 ng/ml) y alta (1000 ng/ml). El promedio de la recuperación de la 6-DHT fue de $103.2 \pm 0.9\%$ y se evaluó en 2 experimentos independientes. La T y los metabolitos 6 β -OHT, 15 β -OHT, 16 α -OHT, 16 β -OHT, 11 β -OHT, 2 α -OHT y 2 β -OHT exhibieron valores de recuperación de 81.2 a 194.9% en las tres cantidades usadas (baja, media y alta). Los valores de precisión de las recuperaciones fueron inferiores al 16.7% para todos los analitos (Tabla 5).

Tabla 4. Parámetros de las gráficas de calibración, coeficiente de correlación y límites de detección y cuantificación de la testosterona y sus metabolitos.

Analito	Ecuación de regresión lineal	r	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
6 β -OHT	$y = 117.0x + 12919.4$	0.9998	6.426	19.530
15 β -OHT	$y = 323.5x - 11657.1$	0.9987	8.973	27.273
16 α -OHT	$y = 266.1 x + 2455.7$	0.9995	12.315	37.432
16 β -OHT	$y = 82.3x + 1670.4$	0.9990	5.280	16.049
11 β -OHT	$y = 262.2x - 172.9$	0.9992	13.054	39.679
2 α -OHT	$y = 148.3x - 1138.8$	0.9972	7.408	22.517
2 β -OHT	$y = 179.3x - 4168.4$	0.9993	4.041	12.283
T	$y = 648.4x + 15872.0$	0.9990	1.360	4.134
AD	$y = 621.3x - 5191.5$	0.9996	2.938	8.932

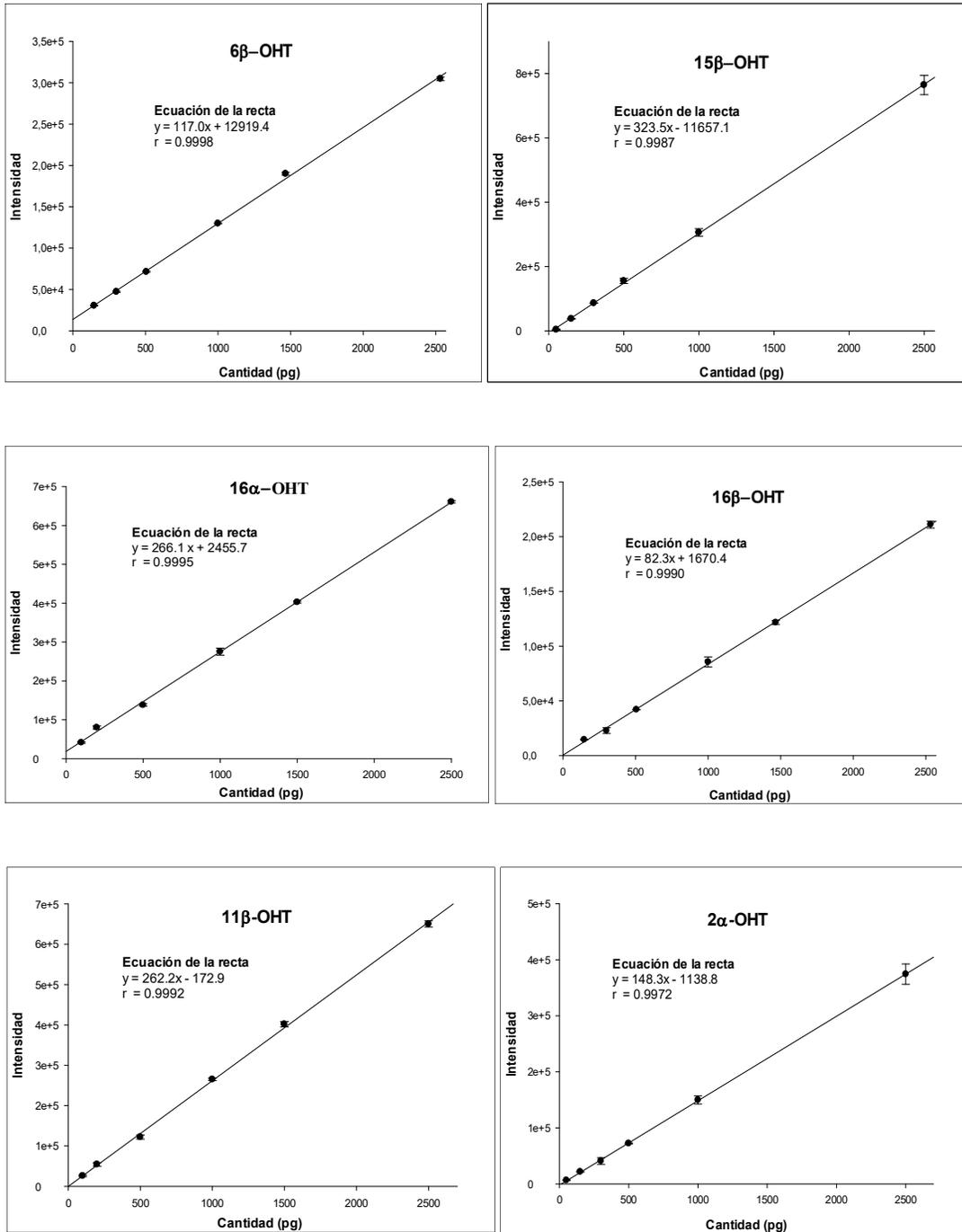


Figura 8. Gráficas de calibración de los metabolitos 6β-OHT, 15β-OHT, 16α-OHT, 16β-OHT, 11β-OHT y 2α-OHT.

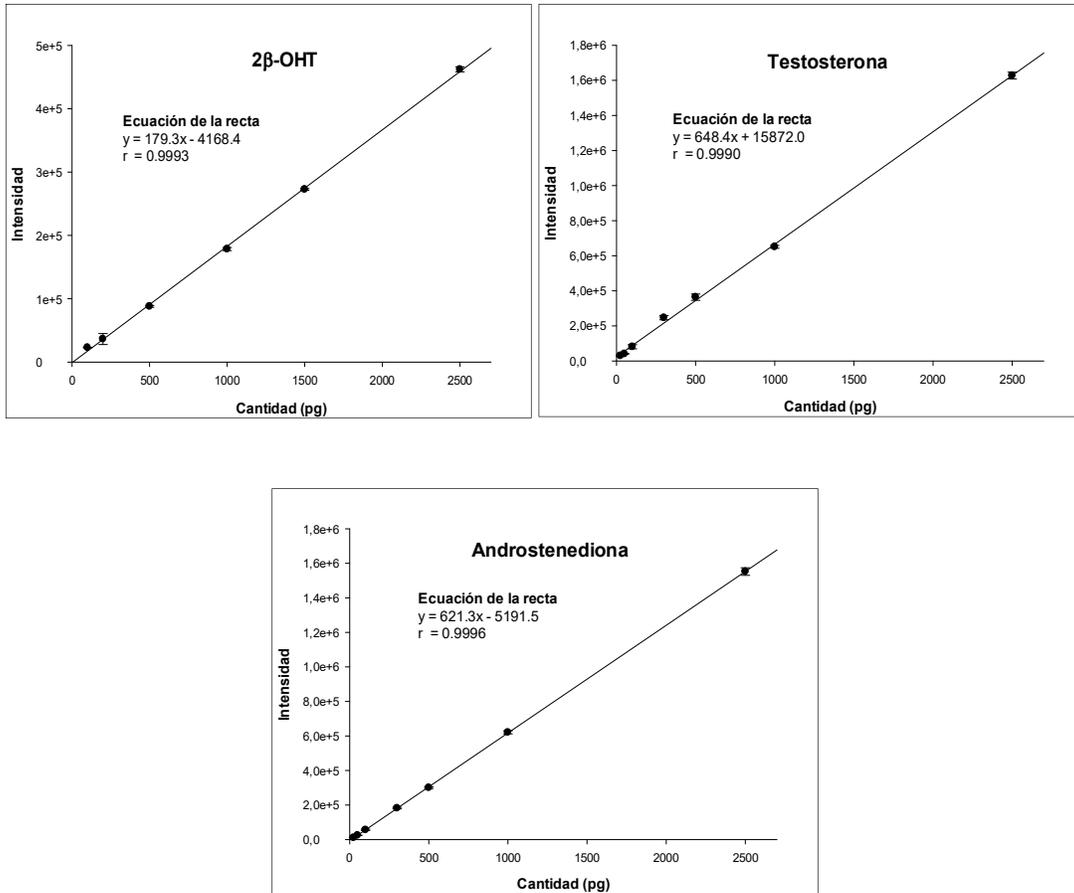


Figura 9. Gráficas de calibración de la 2β-OHT, de la testosterona y la androstenediona.

Tabla 5. Recuperación y precisión para los metabolitos hidroxilados de la testosterona, la androstenediona y la testosterona en OLE.

Analito	Baja (100 ng/ml)		Media (500 ng/ml)		Alta (1000 ng/ml)	
	Recuperación	C.V.	Recuperación	C.V.	Recuperación	C.V.
6 β -OHT	100.0	4.34	105.7	0.5	97.4	5.1
15 β -OHT	126.9	15.6	194.9	0.1	128.8	4.9
16 α -OHT	187.0	3.7	145.7	0.7	184.0	3.0
16 β -OHT	105.1	9.3	113.7	12.5	106.9	0.8
11 β -OHT	146.5	9.3	174.6	4.6	186.1	1.9
2 α -OHT	171.8	16.7	117.1	4.7	106.2	10.3
2 β -OHT	108.2	14.5	110.8	16.8	95.8	14.9
T	110.1	8.1	119.0	4.2	85.4	7.6
AD	89.7	15.8	81.2	7.0	95.7	1.4

La recuperación representa el % de la masa de analito detectada en las muestras enriquecidas. La precisión está representada por el coeficiente de variación (C.V.) del ensayo. Testosterona (T), androstenediona (AD), -hidroxitestosterona (-OHT).

Así mismo, se procedió a evaluar el efecto matriz construyendo dos gráficas de calibración una sobre metanol y otra sobre OLE para la T y la 16 α -OHT, como resultado observamos que si hubo una diferencia mayor al 10% entre las pendientes de las dos condiciones experimentales por lo que se concluyó la existencia de interferencia o efecto de matriz (Figura 11).

3.2 Optimización del procesamiento de las muestras de orina

Después de haber establecido las condiciones cromatográficas, haber realizado las gráficas de calibración y calculado los LODs y LOQs, se procedió a optimizar el procesamiento de la orina, para ello, se evaluaron varios aspectos del procesamiento de las muestras que pueden afectar la eficiencia de la extracción y de esta manera reducir la pérdida de analitos durante

el procesamiento. Los factores críticos que se evaluaron fueron: pretratamiento de la muestra, tipo de extracción, marca de los cartuchos SPE C18, tipo del disolvente usado para la extracción y la concentración de la β -glucuronidasa/sulfatasa para la hidrólisis enzimática, tiempo y temperatura de la reacción enzimática.

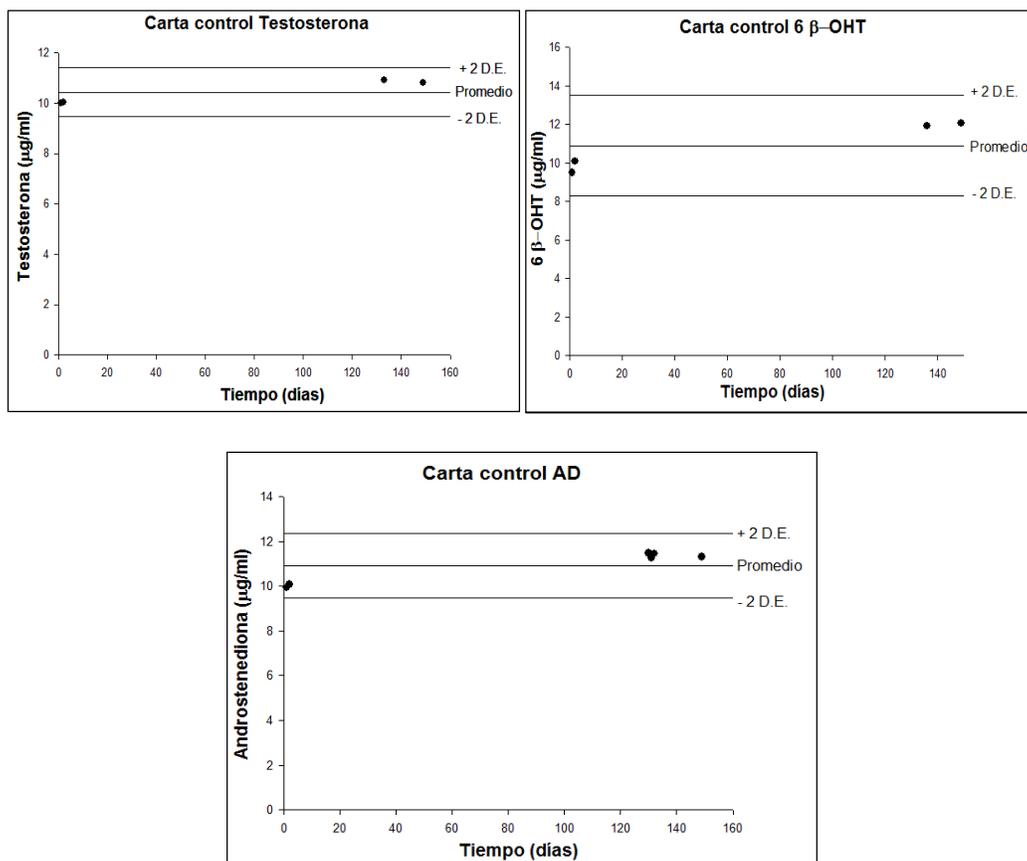


Figura 10. Cartas control de la testosterona, la androstenediona y la 6 β -OHT.

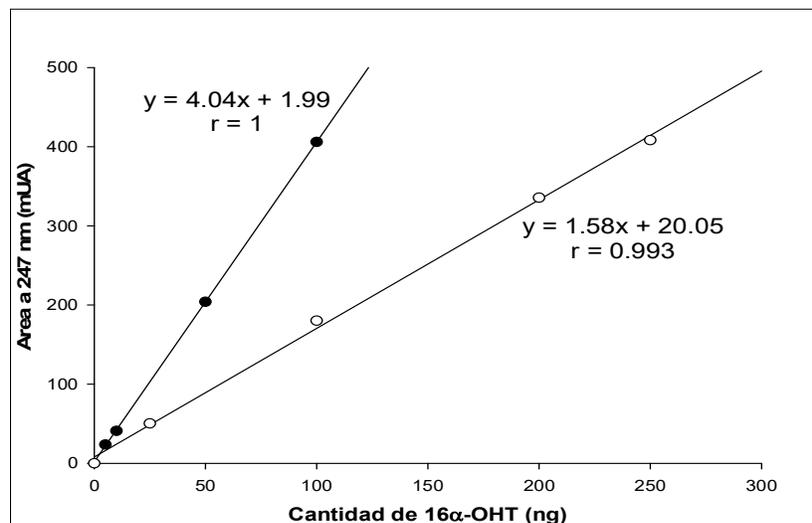
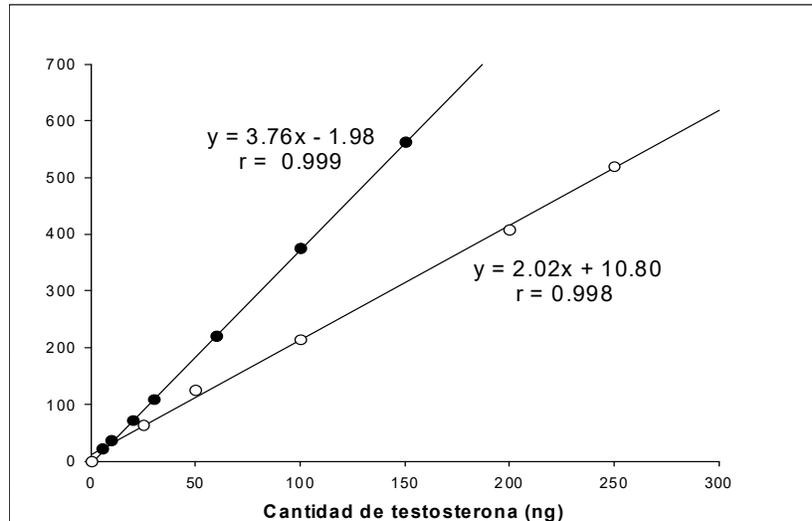


Figura 11. Evaluación del efecto de matriz por medio de las gráficas de calibración de la testosterona y la 6β-OHT. Las gráficas señaladas con el círculo negro (●) fueron realizadas con el estándar diluido en metanol en comparación con las gráficas con los círculos blancos (○) que fueron realizadas sobre OLE.

La eficiencia de extracción se evaluó mediante las recuperaciones de T, 2β-OHT, 16α-OHT y 6β-OHT añadidos a OLE. Lo primero que se evaluó fue el pretratamiento de la muestra, ya que comúnmente se forman sedimentos en la orina, por lo tanto, se probaron distintas formas para eliminar este sedimento, para esto se hizo un *pool* de orina que se enriqueció con los

analitos y se evaluaron las siguientes condiciones: centrifugación a $1,600 \times g$ y filtración de la orina en una membrana con diferentes tamaños de poro de 20, 0.4 ó 0.2 μm . En general, se observaron pérdidas importantes de hasta 43.39%. Las muestras centrifugadas mostraron pérdidas de 37.08, 29.51, 40.76 y 14.12% para T, 2 β -OHT, 16 α -OHT y 6 β -OHT, respectivamente. Las muestras pasadas a través del filtro de 20 μm mostraron una disminución para T, 2 β -OHT, 16 α -OHT y 6 β -OHT de 21.68, 32.28, 43.39 y 33.84%, y en el uso del filtro de 0.2 μm se observaron pérdidas del 16.11, 21.05, 38.83 y 25.04% para los metabolitos referidos previamente. Además, el uso del filtro de 0.4 μm mostró pérdidas para T, 2 β -OHT, 16 α -OHT y 6 β -OHT de 15.34, 5.59, 32.8 y 4.02%, respectivamente. Basados en estos resultados se decidió no aplicar un pretratamiento a las muestras de orina para eliminar el material que precipita y los resultados indican que el someter las muestras a un paso de pretratamiento aumenta la posibilidad de perder a los metabolitos de interés, en la Tabla 6 y la Figura 12 se presentan los resultados obtenidos en estos ensayos.

También se evaluó el tipo de extracción a realizar antes de la hidrólisis enzimática, para ello se evaluó la extracción líquido-líquido frente a la líquido-sólido. Los mejores resultados para la recuperación de T, 2 β -OHT, 16 α -OHT y 6 β -OHT se observaron mediante la extracción líquido-sólido utilizando cartuchos C18 con valores de recuperación de 97.16, 110.03, 105.48 y 73.62%, respectivamente; mientras que la extracción líquido-líquido produjo recuperaciones de 71.78, 90.15, 61.39 y 50.82%, respectivamente (Tabla 7). En base a estos resultados se decidió realizar la extracción en fase sólida antes de la hidrólisis enzimática de los metabolitos conjugados en las muestras de orina.

Tabla 6. Porcentaje de pérdida según las diferentes condiciones de pre-tratamiento de las muestras de orina.

Analito (%)	Centrifugación 1600×g	Poro de 20 μm	Poro de 0.4 μm	Poro de 0.2 μm
T	37.08	21.68	15.34	16.11
2β-OHT	29.51	32.28	5.59	21.05
16α-OHT	40.76	43.39	32.85	38.83
6β-OHT	14.12	33.84	4.02	25.04

Los resultados representan la media de dos experimentos realizados de forma independiente (n=2).

Tabla 7. Porcentajes de recuperación para la testosterona y tres metabolitos hidroxilados en orina humana usando extracción sólido-líquido y líquido-líquido.

Analito	Tipo de extracción	
	Líquido-líquido	Líquido-sólido
	(%)	(%)
T	71.78	97.16
2β-OHT	90.15	110.03
16α-OHT	61.39	105.48
6β-OHT	50.82	73.62

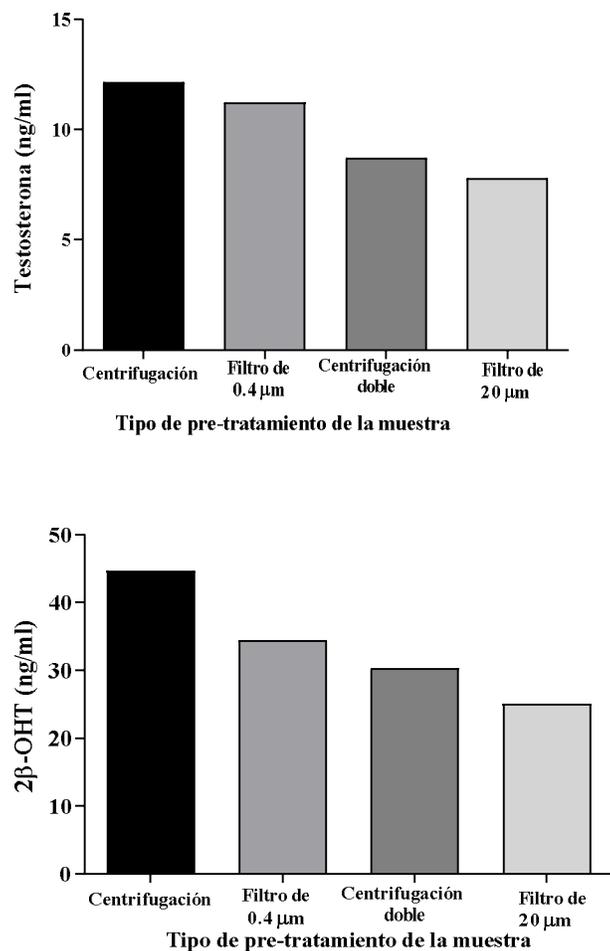


Figura 12. Evaluación de las condiciones de pre-tratamiento sobre la recuperación de la testosterona y la 2β-OHT. Los resultados representan la media (n=2).

Después de haber determinado que la extracción en fase sólida es el método mejor de extracción de los metabolitos conjugados de la T de la orina humana, se procedió a realizar algunos experimentos de enriquecimiento con la T y algunos metabolitos, sin embargo, se observó que las recuperaciones no eran reproducibles en múltiples experimentos. Ante esta situación, se procedió a evaluar si la marca comercial de los cartuchos SPE C18 podría afectar las recuperaciones. Por lo que se evaluaron las tres marcas de cartuchos de extracción que se estaban utilizando Thermo Scientific, J.T.Baker y CRS. Los resultados de recuperación

obtenidos con las tres marcas indicaron que si existen diferencias entre ellas y los porcentajes de recuperación varían. En la Tabla 8 se muestran los resultados de recuperación de la T y los metabolitos 6 β -OHT, 16 α -OHT y 2 β -OHT de las tres marcas probadas. Los cartuchos SPE C18 de la marca J.T. Baker presentaron los mejores valores de recuperación, respecto a las otras dos, por lo cual se decidió usar únicamente los cartuchos de la marca J.T. Baker. Todos estos resultados indicaban que antes de llevar a cabo la hidrólisis enzimática con β -glucuronidasa/sulfatasa de la T y sus metabolitos conjugados no era necesario realizar ningún tratamiento de la muestra y la extracción sólido-líquido usando cartuchos SPE C18 de la marca J.T. Baker representaba el medio más eficaz para su extracción de la orina.

Tabla 8. Porcentajes de recuperación para la extracción de diferentes metabolitos de la orina humana usando cartuchos SPE C-18 de diferentes marcas comerciales.

Analito	Recuperación (%)		
	Marca		
	Thermo Scientific	J.T. Baker	CRS
6 β -OHT	57.65	73.62	65.95
16 α -OHT	74.66	105.48	102.64
2 β -OHT	83.74	110.03	97.73
T	84.7	97.16	82.49

Así mismo, también se evaluó el tipo de disolvente para realizar la elución de los metabolitos de los cartuchos SPE C-18 durante el procesamiento de la extracción en fase sólida, usando diferentes combinaciones de agua, metanol, acetonitrilo, éter y cloruro de metileno. En la Tabla 9 se presentan los resultados de recuperación obtenidos con las diferentes condiciones probadas, y se observó que el lavado con agua seguido de la elución con metanol mostró los

valores más altos de recuperación de los metabolitos evaluados para llevar a cabo esta elución. Con base en estos resultados se decidió llevar a cabo la elución solamente con metanol, después de lavar con agua.

Tabla 9. Porcentajes de recuperación para la elución de 6 β -OHT, 16 α -OHT, 2 β -OHT y testosterona usando diferentes mezclas de disolventes para la extracción en fase sólida.

ELUYENTE	METABOLITOS			
	6 β -OHT	16 α -OHT	2 β -OHT	T
Lavado 3 ml agua + 3 ml de MeOH	74.17	107.51	104.94	91.9
Lavado agua + 5 ml MeOH	40.38	36.99	40.75	65.86
Lavado agua + 3 ml MeOH +1 ml CH ₂ Cl ₂	35.47	54.40	45.02	94.67
Lavado agua + 3 ml MeOH:CH ₂ Cl ₂ 50:50	52.83	72.04	68.81	84.76
Lavado agua + 3 ml MeOH:éter 50:50	59.28	84.24	82.27	77.43
Lavado agua + 3 ml MeOH:ACN 50:50	52.16	69.60	71.62	83.96
3 ml MeOH. Sin lavado	41.39	53.94	63.77	46.34
3 ml MeOH +1 ml agua. Sin lavado	30.93	53.16	62.86	20.98

Posteriormente se procedió a determinar las condiciones óptimas para llevar a cabo la hidrólisis enzimática de la T y de sus metabolitos hidroxilados conjugados. En base a lo reportado en la literatura se plantearon dos opciones: en la primera, se realizó la hidrólisis enzimática de los analitos y después la extracción y en la segunda, se hizo la extracción y posteriormente la hidrólisis de los metabolitos conjugados. No se observaron diferencias significativas al comparar los resultados de la recuperación de la 6 β -OHT en las dos condiciones. Sin embargo, un evento que si marcó la diferencia entre ambas condiciones fue que al llevar a cabo primero la hidrólisis enzimática, el frente del solvente en el cromatograma era muy grande y dificultaba la resolución y definición de los picos que eluían en la primera

parte del cromatograma, lo cual puede implicar un problema analítico, ya que algunos analitos de interés pueden eluir solapados con el frente de corrida, razón por la cual se decidió realizar primero la extracción y después la hidrólisis enzimática de los analitos (Figura 13).

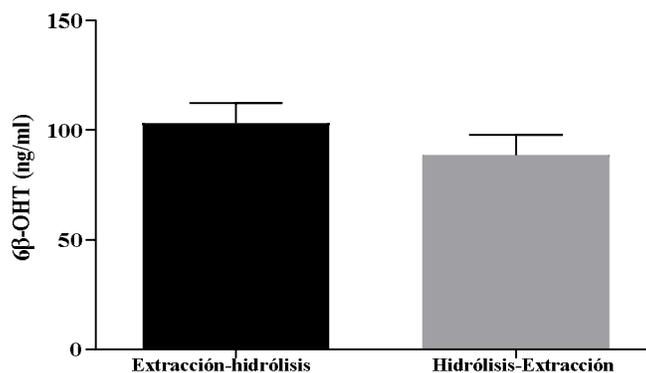


Figura 13. Evaluación del orden de la extracción-hidrólisis o hidrólisis extracción de los metabolitos conjugados en orina. La hidrólisis se realizó a una concentración de 7500 UI de β -glucuronidasa/sulfatasa de *H. pomatia*, a 50 °C durante una hora. Los resultados representan la media \pm E.E. (n=3) de tres experimentos independientes. Prueba de “t” de Student ($p=0.320$).

Está bien establecido que una gran proporción de la T y sus metabolitos se excretan conjugados con ácido sulfúrico y glucurónico en la orina. Sin embargo, no se han descrito en la literatura las condiciones experimentales para llevar a cabo la hidrólisis enzimática de los metabolitos hidroxilados de la T en la orina humana. Por lo tanto, la concentración de enzima β -glucuronidasa/sulfatasa óptima para la hidrólisis se estableció a partir de la cuantificación de T, la 16 α -OHT y la 6 β -OHT. En la Figura 14 se presenta la cuantificación de los metabolitos a diferentes concentraciones de la enzima. Todas las concentraciones probadas produjeron un aumento notable y significativo en la formación de los analitos probados en comparación con la ausencia de la enzima en el medio de incubación. Las concentraciones

de 7,500 y 10,000 UI/ml mostraron los niveles más altos de metabolitos generados, aumentando los niveles de 6 β -OHT 51 y 52 veces, respectivamente y de 16 α -OHT en aproximadamente 12 y 11 veces, respectivamente (Figura 14). Por lo tanto, se seleccionó la concentración de 7,500 UI/ml de β -glucuronidasa/sulfatasa ya que fue la concentración que produjo la mayor concentración de metabolitos no conjugados en la orina.

Adicionalmente a la concentración de la enzima para llevar a cabo la hidrólisis enzimática de los metabolitos conjugados de la T, en este estudio también se evaluó el tiempo y la temperatura de la reacción enzimática. En este caso utilizando la concentración de 7,500 UI/ml de β -glucuronidasa/sulfatasa se hicieron 2 condiciones de incubación para la reacción, la primera de ellas fue a 55 °C durante una hora y a 37 °C durante toda la noche. En ambos casos, la formación de los metabolitos evaluados 6 β -OHT y 16 α -OHT fueron similares. En base a estos resultados se decidió llevar a cabo la reacción para la hidrólisis enzimática de los metabolitos hidroxilados de la T a 55 °C durante 1 hora, lo que nos permitió ahorrar tiempo en el procesamiento de las muestras.

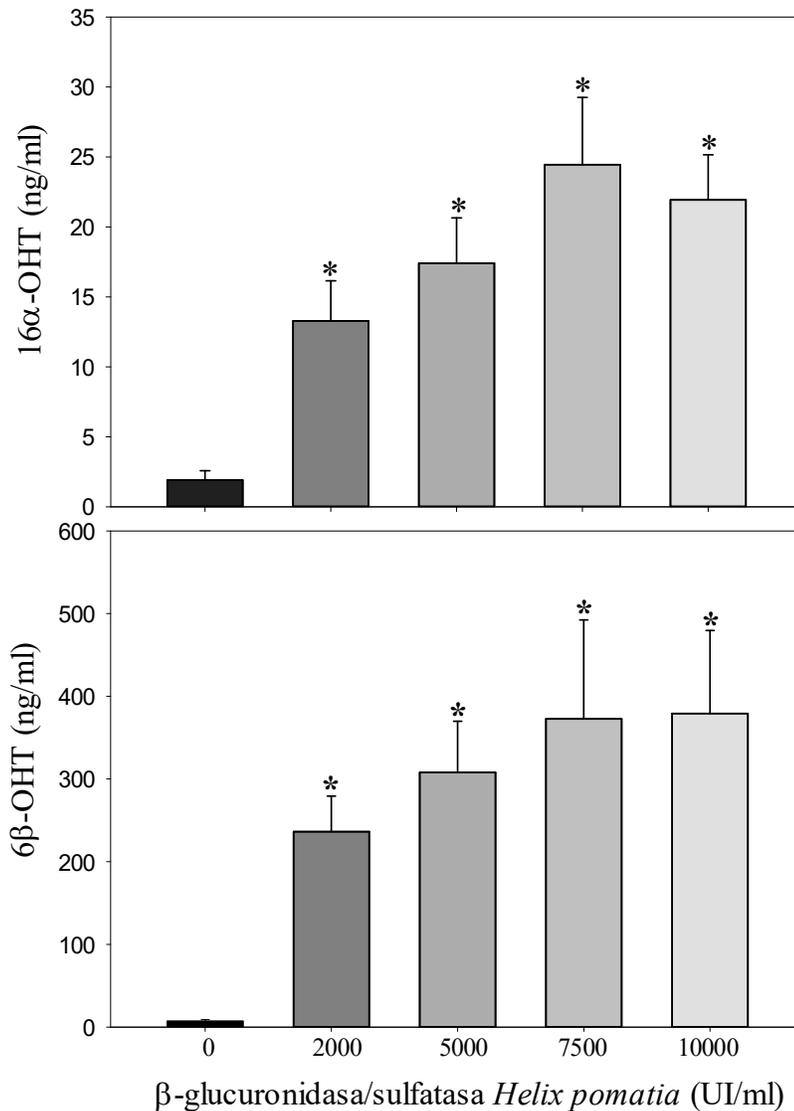


Figura 14. Efecto de la β -glucuronidasa/sulfatasa de *H. pomatia* sobre la formación de los metabolitos 16 α -OHT y 6 β -OHT en orina humana. La incubación se realizó durante 1 hora a 50 °C. Los datos representan la media \pm D.E. (n=3). *Estadísticamente significativo comparado con 0 UI/ml, $p < 0.001$, de acuerdo con la prueba de ANOVA seguido de la prueba *post hoc* Holm-Sidak.

3.3 Determinación de la concentración de creatinina

Debido a que la determinación de la T y sus metabolitos se realizó en orina fue necesario normalizar por la concentración de creatinina para evitar variaciones respecto al volumen de

orina recolectada. También como parte del control de calidad se determinó la exactitud y la precisión de esta determinación, usando para ello la muestra certificada que viene en el kit del ensayo. La exactitud de la medida de creatinina fue de 98.28% (DE=1.56) y una precisión de 4.25 (DE=0.91), valores que estuvieron dentro de los niveles de aceptación. La media del valor de creatinina en orina para los adultos jóvenes fue de 3.46 mg/dl (1.17 - 6.31), mientras que para los adultos mayores fue de 3.10 mg/dl (0.76 - 4.45).

3.4 Análisis de las muestras de orina de los voluntarios

Después de haber establecido las condiciones cromatográficas para el análisis de la T y sus metabolitos hidroxilados por UPLC-MS, optimizadas las condiciones para el procesamiento de las muestras y validado el método, se procedió a la cuantificación de la T y sus metabolitos hidroxilados en las muestras de orina de los hombres adultos jóvenes y mayores participantes. Los resultados mostraron la presencia de siete metabolitos hidroxilados, la AD y la T (Tabla 10). Los analitos identificados en concentración mayor fueron la 6 β -OHT y la 16 α -OHT en los dos grupos de edad, y hubo una disminución aparente en el total de metabolitos en los adultos mayores, excepto en la 15 β -OHT, 2 α -OHT y 11 β -OHT, cuyas concentraciones fueron similares en los dos grupos. Aunque solo se analizaron cinco muestras por grupo, se observó un patrón metabólico diferente de la T y sus metabolitos hidroxilados en la orina con respecto a la edad. Los niveles sin corrección por creatinina de AD fueron significativamente menores en los hombres mayores y otros analitos, como la T, 16 α -OHT y 6 β -OHT también mostraron una reducción; sin embargo, estos resultados no fueron estadísticamente significativos.

Tabla 10. Concentración urinaria de los metabolitos hidroxilados de la testosterona, androstenediona y testosterona en hombres jóvenes y mayores.

Analito	Grupo de 25-30 años (ng/ml)	Grupo de 50-75 años (ng/ml)	<i>p</i>
15 β -OHT	5.73 (3.91-17.85)	7.23 (2.59-14.92)	0.967
6 β -OHT	189.88 (26.35-223.52)	80.55 (7.38-192.68)	0.317
16 α -OHT	181.86 (30.71-315.06)	65.6 (25.14-196.54)	0.155
16 β -OHT	38.65 (28.16-82.67)	30.23 (5.03-202.47)	0.562
11 β -OHT	6.65 (3.61-19.78)	8.41 (2.19-18.08)	0.890
2 α -OHT	17.07 (6.87-25.16)	14.25 (7.38-52.32)	0.874
2 β -OHT	23.3 (2.84-35.69)	11.65 (6.11-35.72)	0.474
T	58.91 (2.67-81.95)	23.46 (4.24-98.47)	0.260
AD	19.83 (5.29-42.84)	7.83 (1.61-17.69)	0.023*

Los datos representan la mediana, y los valores entre paréntesis indican el rango. * Diferencia estadística significativa entre hombres jóvenes y mayores (n = 5), p <0.05, prueba de suma de rango de Mann-Whitney.

Por otra parte, debido que los metabolitos fueron cuantificados en una matriz como la orina, algunos autores han planteado que la orina puede tener diferentes grados de concentración por múltiples factores y esta diferencia de concentración puede afectar la cantidad de analito presente en las muestras. Como método para normalizar la diferencia de la concentración de la orina en los diferentes individuos se corrigió la concentración de los metabolitos por mg de creatinina en orina y se realizó el análisis estadístico. Los resultados de este análisis muestran que los metabolitos preponderantes en los dos grupos de edad fueron 16 α -OHT, 6 β -OHT y T, aunque se observó que las muestras en el grupo de los 50 a 75 años presentaban

menor cantidad de estos, en cuanto al análisis estadístico entre los dos grupos se encontró que sólo la T presentaba una disminución significativa en el grupo de los 50 a los 75 años en comparación con los individuos jóvenes (Tabla 11).

Tabla 11. Concentraciones de los metabolitos hidroxilados de testosterona, androstenediona y testosterona en orina de humano ajustados por creatinina.

Compuesto	Grupo de 25-30 años (ng/mg de creatinina)	Grupo de 50-75 años (ng/mg de creatinina)	<i>p</i>
15 β -OHT	259.11 (111.78 - 468.50)	298.03 (139.13 - 606.81)	0.428
6 β -OHT	3760.64 (1010.48 - 6541.95)	2881.42 (1081.85 - 6564.81)	0.350
16 α -OHT	7789.96 (486.55 - 20788.24)	3224.43 (745.58 - 11286.50)	0.257
16 β -OHT	1536.85 (788.86 - 2406.91)	1661.52 (343.60 - 4730.69)	0.571
11 β -OHT	294.27 (105.48 - 579.05)	308.16 (184.84 - 592.74)	0.867
2 α -OHT	481.88 (270.48 - 660.42)	646.42 (251.98 - 1441.31)	0.343
2 β -OHT	873.65 (45.07 - 1992.20)	633.22 (228.89 - 1488.24)	0.455
T	2952.26 (1546.32 - 6104.71)	1071.16 (115.04 - 2215.41)	0.020*
AD	857.17 (83.87 - 1695.06)	293.33 (70.21 - 629.36)	0.089

Los datos representan la mediana y los valores en paréntesis indican el rango. *Diferencia significativa estadísticamente entre hombres jóvenes y mayores (n=5), $p < 0.05$, prueba de suma de rangos de Mann-Whitney.

4. DISCUSIÓN

En este estudio, observamos que los metabolitos hidroxilados de la T representan una forma importante de eliminación de este andrógeno en la orina humana, además, de otros metabolitos frecuentemente analizados en esta muestra biológica (Fabregat et al, 2010; Gower, 2010b). Para lograr el objetivo del presente trabajo, se desarrolló y validó un método por UPLC-MS para la cuantificación de la T, AD y siete metabolitos hidroxilados de la T en la orina humana. Este método resultó en un aumento notable en la sensibilidad en comparación con un método desarrollado en nuestro laboratorio por HPLC-DAD (Escobar-Wilches, 2011), mejoró la resolución cromatográfica y en un tiempo de análisis más corto, así como un ahorro notable en la cantidad de solventes usados.

Por otra parte, a pesar de que varios metabolitos poseen el mismo peso molecular y t_{ret} similares, las condiciones cromatográficas establecidas en este estudio permitieron la separación, identificación y cuantificación de nueve analitos y el EI en 15 min. Incluso este método es útil también para el análisis de pares de isómeros hidroxilados como 16α -OHT/ 16β -OHT y 2α -OHT/ 2β -OHT, ya que la separación de estos analitos es difícil debido a su complejidad desde el punto de vista cromatográfico dado que tienen el mismo peso molecular. La identificación de los analitos en las muestras analizadas se realizó mediante el patrón de fragmentación observado en el espectro de masas de cada analito tomando como base a la molécula protonada $[M+H]^+$ y el t_{ret} observado con los estándares puros. Esto nos permitió identificar con gran certeza cada metabolito, así como también detectar la presencia de posibles impurezas. Para demostrar que no hay interferencia con otros posibles esteroides isoméricos endógenos en las muestras, se realizaron corridas de estos esteroides con el método desarrollado en modo positivo y negativo para identificar cual era el patrón de

fragmentación predominante, todos los analitos se extrajeron selectivamente de los cromatogramas y se compararon con los obtenidos de patrones puros y su t_{ret} . Los esteroides analizados fueron E₃, 16-epiE₃, 16 α -OHE₁, 4-OHE₂, 2-OHE₂, 2-OHE₁, 4-OHE₁, 5-androstenediol, E₂, 4-MeOE₂, 2-MeOE₂, E₁, DHEA, 4-MeOE₁ y 3-MeOE₁, los cuales pueden estar presentes en la orina. Todos estos analitos se diferenciaron selectivamente de los analitos utilizados en este trabajo y no coeluyeron. Por lo tanto, este método también podría usarse para el análisis de los estrógenos y sus metabolitos en muestras biológicas.

Se ha planteado que, si la separación cromatográfica proporciona componentes bien resueltos, al estar separados los analitos se pueden obtener los datos espectrales de cada uno y hacer más fácil la interpretación. Si no se logra una separación eficiente es probable que una sola fracción este constituida por una mezcla, y los espectros de estas fracciones son difíciles de interpretar sin el uso de un detector de masas en tandem (MS-MS), el cual es un equipo mucho más costoso. De hecho, se puede argumentar que el advenimiento de las técnicas y la ionización suave en combinación con la separación por HPLC fue una de las principales razones por las cuales el uso de la espectroscopía de masas ha tomado mucha fuerza en los últimos años (Ardrey, 2003).

El método desarrollado también mostró una excelente linealidad ($r > 0.9972$) en un amplio rango dinámico de concentraciones (25 a 1250 ng/ml), esto es muy importante ya que se conoce que las concentraciones de andrógenos en muestras de orina humana pueden presentar una gran variabilidad según el género, la etnia, la edad, el metabolismo y el polimorfismo de los CYPs, a pesar de que para este tipo de metabolitos no existe información publicada.

Los LOD calculados en este estudio para todos los analitos fueron mejores que los reportados en otros estudios (Wang and Zhang, 2007), en los cuales determinaron metabolitos hidroxilados de la T producidos en un ensayo *in vitro*, utilizando microsomas hepáticos de rata por UPLC-MS o GC-MS para el análisis de andrógenos, incluidos algunos metabolitos de la T y fármacos en orina humana (Van Renterghem et al., 2010; Moon et al., 2014). Además, los CV observados en las determinaciones intra e interdiarias fueron inferiores al 7.1% y el CV de los $t_{ret} < 1.5\%$, lo que refleja una repetibilidad adecuada. Del mismo modo, se realizaron las cartas control para los analitos, llevadas hasta seis meses, las cuales mostraron valores dentro de los límites aceptables (± 2 DE), lo cual refleja la estabilidad de la T, sus metabolitos hidroxilados y la AD, además, de confirmar la repetibilidad del método.

Los LODs determinados en nuestro estudio están entre 1.360 y 13.054 ng/ml y las curvas de calibración se hicieron entre 25 a 1250 ng/ml. En el caso de la T fue necesario incluir puntos de menor concentración debido a su elevada sensibilidad. Debido a que en la literatura no hay reportes sobre las concentraciones urinarias de los metabolitos hidroxilados de la T, en las gráficas de calibración se incluyeron concentraciones relativamente elevadas para asegurar que las concentraciones que se obtuvieran cayeran dentro del rango de linealidad. En la literatura hay varios métodos descritos para el análisis de la T y otros esteroides. Whalley y col. (2001) describieron un método de HPLC acoplado a un detector UV con el que se determinó: 7α -OHT, 6β -OHT, 16α -OHT, 16β -OHT, 11β -OHT, 2α -OHT, 2β -OHT, AD y T y refirió un LOD en columna de 300 ng/ml y sus curvas de calibración fueron realizadas entre 300 ng/ml y 10 μ g/ml. En otro estudio que utilizaron UPLC-MS/MS para determinar siete metabolitos hidroxilados de la T (16α -OHT, 2α -OHT, 7α -OHT, 6α -OHT,

2 β -OHT, 6 β -OHT y 16 β -OHT) en extractos de ensayos *in vitro* usando microsomas de rata, reportaron que las gráficas de calibración las hicieron en un rango de 0.005 a 5 μ g/ml y reportaron también los LOD entre 0.32 a 2 ng/ml (Wang and Zhang, 2007). Otro estudio en el que evaluaron esteroides anabolizantes, entre los que se encontraban la T y la AD, en orina humana por HPLC-MS/MS, los autores realizaron las gráficas de calibración de 0.5 a 20 ng/ml con LOD para T de 0.27 ng/ml y de 4.72 ng/ml para la AD por inyección directa, con recuperaciones para la T de 99.3 y 96.1% y de 92.2 y 106.4% para la AD (Saito et al., 2010). Por otra parte, en otro estudio se determinaron varias hormonas esteroideas, entre las cuales se encontraban la T y la AD en orina humana por CG-MS; en este estudio reportó un LOD para la T de 0.05 ng/ml y con una gráfica de calibración entre 0.1 y 200 ng/ml y para la AD el LOD fue de 0.05 ng/ml y la gráfica de calibración entre 0.1 y 200 ng/ml (Moon et al., 2009). Adicionalmente, otros autores cuantificaron varios esteroides en orina humana usando CG-MS y reportaron un LOD de 0.5 ng/ml para la T con recuperaciones de 92.8% y para la AD un LOD de 1.0 con recuperaciones de 103% (Martínez-Brito et al., 2013). Los resultados obtenidos en cuanto a límites de detección y de cuantificación en este estudio son similares a los reportados en estos estudios, sin embargo, presentan algunas ventajas importantes. Entre ellas sobresale el uso de un equipo más económico que el UPLC-MS/MS, adicionalmente al usar UPLC se disminuye notablemente la cantidad de solventes utilizada, una disminución notable en el tiempo de corrida ya que con una metodología similar en HPLC la resolución y definición de los analitos podría tardar hasta 56 min y con esta metodología los analitos se pudieron resolver, definir e identificar en 15 min, usando el detector de masas se pudieron realizar corridas en modo positivo y negativo al mismo tiempo también ahorrando tiempo de análisis de las muestras, en cuanto al procesamiento de las muestras no es necesario hacer la

derivatización de los analitos, lo cual es indispensable para usar GC-MS, lo que conduce a un menor tiempo de análisis. Adicionalmente es el primer estudio que evalúa los metabolitos hidroxilados de la T, la T y la androstenediona en una muestra de fácil acceso como es la orina ya que algunos estudios ya habían reportado estos analitos en microsomas de hígado, pero la obtención es éstos es compleja.

Un hecho que apoya la metodología desarrollada en el presente estudio es que las concentraciones urinarias de la T en los individuos participantes son similares a las reportados en los estudios que utilizaron UPLC-MS/MS (Gonzalo-Lumbreras et al, 2003; Koal et al., 2012) y GC-MS (Martínez-Brito et al., 2013; Moon et al., 2014) en personas de diferentes etnias. Además, las concentraciones de los metabolitos hidroxilados de la T obtenidos en este estudio pueden servir de referencia en estudios posteriores, ya que hasta el momento no hay reportes sobre las concentraciones de ellos en la orina humana.

Es bien sabido que el análisis de la T y otros esteroides en la orina suele ir acompañado de interferencias, también conocido como efecto de la matriz como se ha determinado mediante el uso de diferentes técnicas (Gonzalo-Lumbreras et al., 2003; Matuszewski, 2006; Van Eeckhaut et al., 2009; Moon et al., 2014). En el presente trabajo, estas interferencias se detectaron comparando los valores de la pendiente de las curvas de calibración construidas sobre un *pool* de orina o en metanol, y la diferencia entre las dos pendientes fue superior al 10%, lo que indicó la presencia de interferencias por efecto de la matriz. Para corregir este efecto se preparó un lote único de OLE (procedente de 10 individuos) con el que se construyeron las curvas de calibración y también fue usada para preparar las muestras enriquecidas con las diferentes cantidades. Esta estrategia permitió eliminar virtualmente los

efectos de la matriz de la mayoría de los analitos evaluados dado que en la mayoría de éstos obtuvimos recuperaciones que se encuentran dentro de los rangos aceptables. Debido a que las interferencias de la matriz se corrigieron utilizando OLE en las gráficas de calibración, se utilizó a la 6-DHT como EI para evaluar la repetibilidad del método, tanto para los estándares como para las muestras de los voluntarios. En cuanto a las recuperaciones para los metabolitos 15 β -OHT, 16 α -OHT y 11 β -OHT se observaron valores altos de recuperación, los cuales pueden ser debidos a un efecto matriz producido por la orina, muy probablemente algún componente de la matriz produjo este aumento en la respuesta de estos metabolitos durante la ionización, efecto que no fue corregido a pesar de la realización de las curvas de calibración sobre orina libre de esteroides y del uso de un estándar interno. En particular se ha descrito que el efecto matriz aparece con mucha frecuencia en la cuantificación de los esteroides en la orina y una de las posibles opciones para corregir esto es el uso de estándares deuterados. Por lo tanto, se requieren más investigaciones sobre estrategias para superar los posibles efectos de la matriz para lograr mejores recuperaciones, sin embargo, hasta la fecha no hay estándares deuterados de los metabolitos hidroxilados de la T disponibles comercialmente para su inclusión durante el análisis.

En este estudio, se seleccionó a la 6-DHT como EI ya que tiene una estructura química similar a la T, no se encuentra en nuestra matriz de estudio y no coeluye con ninguno de los analitos de interés (t_{ret} 7.48 min), además, es generado a partir de un proceso bioquímico dependiente de CYP similar al de los metabolitos hidroxilados, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* en ratas y humanos (Waxman et al., 1991; Fabregat et al., 2010). Algunos artículos han referido la presencia de la 6-DHT en el ser humano, pero la detección de éste en la orina humana solo

ha sido posible a niveles bajos después del tratamiento alcalino de las muestras que contienen esteroides conjugados con cisteinilo (Fabregat et al., 2010). En este estudio, la 6-DHT no se detectó en las muestras de orina humana antes o después del ensayo enzimático utilizando β -glucuronidasa/sulfatasa de *H. pomatia* y nuestras condiciones de análisis fueron ácidas, además, este compuesto es muy estable. Basados en las propiedades fisicoquímicas de los analitos de interés, la 6-DHT es una excelente alternativa para que se use en este análisis.

En el presente estudio demostramos que los metabolitos hidroxilados de la T se eliminan como conjugados con ácido glucurónico y sulfúrico, ya que su detección aumentó notablemente después de la hidrólisis enzimática con β -glucuronidasa/sulfatasa. Estos resultados resaltan la importancia de agregar también sulfatasa al ensayo enzimático para la hidrólisis de los metabolitos hidroxilados de la T que estén sulfatados para evitar su subestimación, ya que de forma clásica en algunos análisis de esteroides usan a la β -glucuronidasa de *E. coli*, la cual no contiene sulfatasa lo que produciría una subestimación de los metabolitos que se excretan conjugados con ácido sulfúrico. Muchos autores recomiendan para el análisis de la T y sus metabolitos en la orina humana el uso de β -glucuronidasa de *E. coli* para el procesamiento de la muestra para evitar un aumento en la proporción de la tasa T/epitestosterona y la formación de la 4-AD (Mareck et al., 2008; Moon et al., 2014; Du Toit et al., 2017). Estos aumentos se atribuyeron a la actividad enzimática de la 3β -hidroxi- Δ^5 -esteroide-deshidrogenasa y la esteroide- Δ -isomerasa en el jugo de *H. pomatia*. Es importante resaltar que la tasa T/epitestosterona se usa como un marcador de dopaje, ya que en caso de la administración exógena de T, la proporción de T/epitestosterona se encuentra elevada (Danaceau et al., 2008), por esta razón, desde el punto de vista analítico

es de vital importancia la elección de la enzima, pero debido a que el objetivo de este estudio fue la cuantificación del catabolismo de la T, la mejor elección fue la β -glucuronidasa/sulfatasa de *Helix pomatia* que contiene ambas enzimas en comparación con la de *E. coli* que no posee sulfatasa. Hasta el momento, no hay información disponible sobre si el extracto de la *H. pomatia* contiene actividades enzimáticas secundarias que modifiquen la formación de metabolitos hidroxilados de la T. Por lo tanto, es posible suponer que los niveles de metabolitos hidroxilados de la T determinados en este estudio fueron solo el resultado del metabolismo de la T dependiente del CYP en el hígado.

El análisis de las muestras de orina humana utilizando las condiciones experimentales validadas y estandarizadas en este estudio muestra la presencia de siete metabolitos hidroxilados de la T, la AD y T en hombres jóvenes y mayores; estos metabolitos incluyen isómeros hidroxilados en las posiciones α - y β - en diferentes posiciones del anillo esteroideo. El principal metabolito determinado en ambos grupos de edad fue la 6β -OHT, que es el metabolito reportado en estudios *in vitro* en donde evaluaron el aumento de la acción catalítica del CYP3A4 para metabolizar esteroides endógenos y xenobióticos (Yamazaki and Shimada, 1997b; Niwa et al., 1998; Usmani et al., 2003a). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la 6β -OHT puede usarse como un marcador del CYP3A4 hepático *in vivo*, similar a los estudios *in vitro* (Waxman, 1988; Waxman et al., 1988; Usmani et al., 2003a). Del mismo modo, el CYP3A4 también juega un papel importante en la 6β -hidroxilación de la progesterona y el cortisol (Ged et al., 1989; Yamazaki and Shimada, 1997a) y cataliza la 16α -hidroxilación de otros esteroides como la progesterona, la pregnenolona, la DHEA y la E_1 ; sin embargo, en el caso de la formación de la 16α -OHT, los CYP2B6, 2C8 y 2C19 pueden

ser más importantes. Por el contrario, en las ratas, la 16 α -hidroxilación de la T se atribuye principalmente al CYP2C11, una isoforma masculina específica que desempeña un papel en la relación 6 α -OHT/16 α -OHT, y se ha utilizado como un indicador de alteración endocrina cuando es alterado por un xenobiótico (Wilson and LeBlanc, 2000; Sanderson, 2006). La 16 β -OHT fue otro metabolito importante detectado en ambos grupos de hombres y su formación se atribuye principalmente a la actividad de los CYP2B6, 3A4 y 3A7 (Niwa et al., 1998; Monostory and Dvorak, 2011). El CYP3A4 también tiene una participación importante en la formación de la 2 β -OHT y 15 β -OHT; sin embargo, en el presente estudio, la 15 β -OHT y 11 β -OHT se mostraron como metabolitos menores de la T, lo que está de acuerdo con los estudios *in vitro* (Monostory and Dvorak, 2011). La AD fue otro metabolito detectado en las muestras de orina humana, su formación es a partir de la deshidrogenación de la T que es catalizada principalmente por los CYP2D6 y 2C19 y la HDS17 β 2. Esta reacción contribuye al conjunto de precursores de andrógenos dentro del organismo y constituye una vía de rescate para la AD (Waxman et al., 1988). Los datos obtenidos en el presente estudio proporcionan información sobre el catabolismo de la T y refleja la dificultad de predecir cuál isoforma del CYP es la principal responsable de la formación de cada metabolito *in vivo*, por lo tanto, se requiere más investigación sobre el catabolismo de la T por parte del CYP para predecir su contribución individual. Estos hallazgos también muestran claramente que los metabolitos hidroxilados de la T no deben excluirse al evaluar la homeostasis de la T, porque su catabolismo depende del CYP y un cambio en su perfil de biotransformación puede ser potencialmente útil como biomarcador del estado de andrógenos.

Una alteración en la tasa de biotransformación de la T debido a factores internos y externos está asociada con una alteración en la tasa de eliminación y pueden resultar en un desbalance de la T que varía de un sujeto a otro y de una población a otra (Niwa et al., 1998; Usmani et al., 2003a). A la fecha, no hay reportes sobre la determinación de metabolitos hidroxilados de la T en la orina humana, lo que nos indica que este cambio no ha sido evaluado en el balance total de la T en los humanos, de ahí la importancia de un método de cuantificación de estos metabolitos.

Un hallazgo importante en este estudio es que, aunque solo se analizó un número pequeño de muestras de orina, hubo un cambio significativo y evidente en el perfil de los metabolitos hidroxilados de la T, AD y la propia T de una manera dependiente de la edad. Se ha observado que los hombres mayores tienen niveles más bajos de T que los hombres jóvenes debido a la menor producción de ésta por parte de las células de Leydig y al aumento de la biotransformación de la T a E₂ por la aromatasa (Monostory and Dvorak, 2011). Los resultados del presente estudio podrían respaldar esta afirmación a pesar del reducido número de muestras analizadas. Sin embargo, se deben realizar otros estudios con un número mayor de muestras donde se evalúe el papel que representa el catabolismo de la T dependiente del CYP, ya que nunca ha sido incluido en el balance total de la hormona, como se ha explicado anteriormente, además, la alteración en la expresión del CYP hepático puede influir en el catabolismo de la T con las consecuencias fisiológicas a nivel de múltiples sistemas debido a las diversas funciones que regula la T. Adicionalmente, un cambio en la expresión de los CYPs que participan en el metabolismo de la T posterior a la exposición a xenobióticos afectaría el metabolismo de esta hormona; se ha descrito que compuestos como el

ketoconazol, el endosulfán y el DDT, entre otros, alteran la expresión de CYP hepáticos con efectos variables sobre el perfil de los metabolitos de la T en estudios *in vitro* e *in vivo* (Wilson and Leblanc, 1998; Wilson and LeBlanc, 2000; Gunderson et al., 2001; Sierra-Santoyo et al., 2005). Un hallazgo que respalda los resultados de este estudio respecto a los niveles de la T en orina, es que son similares a los observados en personas de diferentes etnias exentas de procesos patológicos en los que se usaron otros métodos analíticos (Martínez-Brito et al., 2013; Moon et al., 2014; Gonzalo-Lumbreras et al., 2003; Koal et al., 2012).

El perfil urinario de esteroides está compuesto por varias hormonas producidas endógenamente, incluidos sus precursores y metabolitos (Mareck et al., 2008). Los resultados de este estudio muestran que los metabolitos hidroxilados de la T pueden representar una proporción significativa de los productos de eliminación de este andrógeno, por lo tanto, se necesita realizar más estudios para caracterizar la contribución de los metabolitos hidroxilados de la T en el balance total de este andrógeno, lo que nos puede ayudar a predecir si contribuye en el desarrollo de algunas enfermedades, como la hipertensión inducida por angiotensina II, la hipertrofia cardíaca asociada, la disfunción renal, el estrés oxidante (Pingili et al., 2016), el cáncer de próstata (Green et al., 2012) o disrupción endocrina (Wilson and LeBlanc, 2000).

Así como se han discutido varias de las ventajas que tiene este método, es importante también mencionar sus limitaciones. Una de las limitaciones del método es que sólo se podría aplicar en muestras de orina, ya que no ha sido aplicado a otro tipo de muestras y para poder evaluar los metabolitos hidroxilados de la T en otra matriz, ésta debería ser evaluada en la búsqueda de interferencias, principalmente en la etapa de procesamiento de la muestra. Otra limitante

es, que, hasta ahora, sólo se aplicó en hombres en dos rangos de edad, en los cuales los niveles son relativamente altos y la T es el principal andrógeno. Existen otras etapas de la vida en las cuales estos niveles pueden ser menores como la infantil, así como en mujeres con distintas condiciones fisiológicas como el embarazo y la posmenopausia. A pesar de que logramos la resolución y definición de otros andrógenos y principalmente estrógenos que pueden estar presentes en la orina, con el método actual, estos compuestos no pudieron ser evaluados debido a que para la cuantificación de estrógenos en la orina humana es necesario la adición de ácido ascórbico como conservante para evitar la oxidación de los catecoles (Xu et al., 2005). Otra limitante es que actualmente no hay disposición comercial de estándares conjugados de los metabolitos hidroxilados con ácido glucurónico y sulfúrico para probar la eficiencia de la hidrólisis, ni tampoco de metabolitos deuterados para su inclusión durante el análisis como estándares internos adicionales. Otros factores que se podría evaluar es i) la aplicación a otro tipo de muestras como suero, plasma o extractos de tejidos, entre otras; ii) analizar muestras de orina de personas de ambos sexos con otras condiciones fisiopatológicas; iii) determinar el efecto que puede tener la adición de conservadores y finalmente, iv) determinar cuáles componentes de la orina pueden estar afectando la recuperación de los metabolitos que en este estudio mostraron valores elevados.

En resumen, se desarrolló un método de cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (UPLC-MS) para el análisis de la T y sus metabolitos hidroxilados y la AD en orina humana. El método desarrollado presenta una adecuada resolución, definición, sensibilidad, linealidad, reproducibilidad, exactitud y precisión en una muestra de fácil obtención como es la orina humana. Este método puede ser de gran ayuda para el desarrollo de estudios de

metabolismo hepático en seres humanos, estudios de los sistemas reproductivo y endocrino, toxicológicos y de dopaje.

5. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló y optimizó un método analítico de UPLC-MS para la determinación de siete metabolitos hidroxilados de T, la AD y la T en orina humana.
2. Se optimizaron las condiciones experimentales para la extracción e hidrólisis enzimática de los metabolitos conjugados de la T, sus metabolitos hidroxilados y la AD en orina humana para su análisis por UPLC-MS.
3. La T, la AD y los metabolitos hidroxilados se conjugan con ácido glucurónico y sulfúrico, por lo tanto, es necesario la hidrólisis enzimática para su determinación.
4. El método analítico desarrollado y optimizado se aplicó en muestras biológicas de voluntarios para comprobar su utilidad, lo que permitió detectar y cuantificar nueve analitos en muestras de hombres en dos rangos de edad: la T, AD, 6 β -OHT, 16 β -OHT, 15 β -OHT, 2 β -OHT, 11 β -OHT, 2 α -OHT y 16 α -OHT.
5. La 6 β -OHT y 16 α -OHT fueron los metabolitos hidroxilados mayoritarios de la T en los hombres jóvenes y mayores.
6. El patrón metabólico de eliminación de la T en la orina humana cambia con la edad.
7. Este método puede ser de gran ayuda para el desarrollo de estudios del metabolismo hepático de la T en seres humanos y su efecto en los sistemas reproductivo y endocrino, toxicológicos y de dopaje.

6. PERSPECTIVAS

1. Acoplar el método desarrollado de UPLC-MS a un detector de masas en tándem UPLC-MS-MS lo que permitiría aumentar la sensibilidad y mejorar los LOD y LOQ para poder aplicarlo a la caracterización del perfil catabólico de la T en poblaciones con menores niveles de T como mujeres y niños.
2. Caracterizar el perfil de excreción completo de la T teniendo en cuenta los metabolitos hidroxilados de la T, la DHT, la AD, E₂, E₁, AD, 5-androstanediol, androstanediona, androstenediol (3 α -diol y 3 β -diol), etiocolanolona y la DHEA.
3. Caracterizar el perfil metabólico de excreción de la T en hombres jóvenes y mayores en diferentes condiciones fisiopatológicas para evaluar su aplicabilidad en la clínica y en investigación.
4. Estandarizar y validar el método desarrollado incluyendo a los estrógenos y sus metabolitos hidroxilados.

7. REFERENCIAS

- Almeida M, Laurent MR, Dubois V, et al (2017) Estrogens and Androgens in Skeletal Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* 97:135–187. <https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2015>
- Ardrey RE (2003) Mass Spectrometry. In: Ardrey RE (ed) *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An introduction*, 1st edn. John Wiley & Sons, pp 33–73
- Arnold AP (2017) A general theory of sexual differentiation. *J Neurosci Res* 95:291–300. <https://doi.org/10.1002/jnr.23884>
- Auchus R, Miller W (2015) P450 Enzymes in Steroid Processing. In: Ortiz de Montellano P (ed) *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, 4th edn. Springer US, San Francisco, pp 851–867
- Bachman E, Feng R, Travison T, et al (2010) Testosterone suppresses hepcidin in men: a potential mechanism for testosterone-induced erythrocytosis. *J Clin Endocrinol Metab* 95:4743–4747. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0864>
- Bachman E, Travison TG, Basaria S, et al (2014) Testosterone Induces Erythrocytosis via Increased Erythropoietin and Suppressed Hepcidin : Evidence for a New Erythropoietin / Hemoglobin Set Point. *J Gerontol Med Sci* 69:725–735. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt154>
- Bain J (2007) The many faces of testosterone. *Clin Interv Aging* 2:567–576
- Bartels H, Bohmer M, Heierli C (1972) [Serum creatinine determination without protein precipitation]. *Clin Chim Acta* 37:193–197. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(72\)90432-9](https://doi.org/10.1016/0009-8981(72)90432-9)
- Basaria S (2013) Reproductive aging in men. *Endocrinol Metab Clin North Am* 42:255–270. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2013.02.012>
- Bhasin S (2008) Testicular Disorders. In: Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM (eds) *Williams Textbook of Endocrinology E-Book*, 11th edn. Elsevier Health Sciences, p 1936
- Bhasin S, Taylor WE, Singh R, et al (2003) The mechanisms of androgen effects on body composition: mesenchymal pluripotent cell as the target of androgen action. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 58:M1103-10. <https://doi.org/10.1093/gerona/58.12.m1103>

- Bhasin S, Woodhouse L, Casaburi R, et al (2005) Older men are as responsive as young men to the anabolic effects of graded doses of testosterone on the skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab* 90:678–688. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1184>
- Braunstein G (2007) Testes. In: Gardner D, Shoback D (eds) *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology*, Eighth. McGraw-Hill Companies, Incorporated, pp 470–501
- Calabia E, Arias M (2009) Estudio de la función renal. In: Avendaño L, Aljama P, Arias M, et al. (eds) *Nefrología Clínica*, Tercera. Editorial Medica Panamericana, Madrid, pp 135–140
- Calof OM, Singh AB, Lee ML, et al (2005) Adverse events associated with testosterone replacement in middle-aged and older men: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60:1451–1457. <https://doi.org/10.1093/gerona/60.11.1451>
- Caron P, Turcotte V, Guillemette C (2015) A chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous profiling of ten endogenous steroids, including progesterone, adrenal precursors, androgens and estrogens, using low serum volume. *Steroids* 104:16–24. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.07.009>
- Carre JM, Archer J (2018) Testosterone and human behavior: the role of individual and contextual variables. *Curr Opin Psychol* 19:149–153. <https://doi.org/10.1016/j.copsyc.2017.03.021>
- Chang K-H, Li R, Papari-Zareei M, et al (2011) Dihydrotestosterone synthesis bypasses testosterone to drive castration-resistant prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:13728–13733. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107898108>
- Chen S, Hao X, Zhang Y, et al (2016) Androgen receptor in Sertoli cells regulates DNA double-strand break repair and chromosomal synapsis of spermatocytes partially through intercellular EGF-EGFR signaling. *Oncotarget* 7:18722–18735. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7916>
- Choi MH, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (2005) Characterization of testosterone 11 β -hydroxylation catalyzed by human liver microsomal cytochromes P450. *Drug Metab Dispos* 33:714–718. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.003327>
- Dalton JT, Gao W (2010) Androgen Receptor. In: Bunce CM, Campbell MJ (eds) *Nuclear*

Receptors: Current Concepts and Future Challenges. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 143–182

- Danaceau JP, Morrison MS, Slawson MH (2008) Quantitative confirmation of testosterone and epitestosterone in human urine by LC / Q-ToF mass spectrometry for doping control. *J Mass Spectrom* 43:993–1000. <https://doi.org/10.1002/jms>
- Deng Q, Zhang Z, Wu Y, et al (2017) Non-Genomic Action of Androgens is Mediated by Rapid Phosphorylation and Regulation of Androgen Receptor Trafficking. *Cell Physiol Biochem* 43:223–236. <https://doi.org/10.1159/000480343>
- Du Toit T, Bloem LM, Quanson JL, et al (2017) Profiling adrenal 11 β -hydroxyandrostenedione metabolites in prostate cancer cells, tissue and plasma: UPC2-MS/MS quantification of 11 β -hydroxytestosterone, 11keto-testosterone and 11keto-dihydrotestosterone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 166:54–67. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.06.009>
- Durdiakova J, Ostatnikova D, Celec P (2011) Testosterone and its metabolites – modulators of brain functions. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 71:434–454
- Ereño Artabe A, González-Gago A, Suarez Fernández A, et al (2019) Isotope dilution LC-ESI-MS/MS and low resolution selected reaction monitoring as a tool for the accurate quantification of urinary testosterone. *J Pharm Biomed Anal* 163:113–121. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.09.038>
- Escobar-Wilches DC (2011) Efectos de la Vinclozolina sobre el hígado y la excreción de la testosterona y sus metabolitos en ratas adultas. CINVESTAV-IPN. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
- Fabregat A, Pozo OJ, Marcos J, et al (2010) Quantification of testosterone and metabolites released after alkaline treatment in human urine. *Drug Test Anal* 2:630–636. <https://doi.org/10.1002/dta.227>
- Falany JL, Falany CN (1996) Expression of cytosolic sulfotransferases in normal mammary epithelial cells and breast cancer cell lines. *Cancer Res* 56:1551–1555
- Feldman HA, Longcope C, Derby CA, et al (2002) Age Trends in the Level of Serum Testosterone and Other Hormones in Middle-Aged Men : Longitudinal Results from the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab* 87:589–598

- Francis RM (1999) The effects of testosterone on osteoporosis in men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 50:411–414. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2265.1999.00730.x>.
- Fukami M, Homma K, Hasegawa T, Ogata T (2013) Backdoor Pathway for Dihydrotestosterone Biosynthesis : Implications for Normal and Abnormal Human Sex Development. *Dev Dyn* 242:320–329. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23892>
- Ged C, Rouillon JM, Pichard L, et al (1989) The increase in urinary excretion of 6 beta-hydroxycortisol as a marker of human hepatic cytochrome P450III_A induction. *Br J Clin Pharmacol* 28:373–387. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1989.tb03516.x>
- Gonzalo-Lumbreras R, Pimentel-Trapero D, Izquierdo-Hornillos R (2003) Development and method validation for testosterone and epitestosterone in human urine samples by liquid chromatography applications. *J Chromatogr Sci* 41:261–5. https://doi.org/NO_DOI
- Gower DB (2010a) Analysis of androgens and their derivatives. In: Makin HL, Gower DB (eds) *Steroid Analysis*. Springer Science+Business Media B.V., pp 457–558
- Gower DB (2010b) Analysis of Androgens and Their Derivatives. In: Makin HLJ, Gower DB (eds) *Steroid Analysis, Second*. Springer, London, pp 457–505
- Green SM, Mostaghel EA, Nelson PS (2012) Androgen action and metabolism in prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol* 360:3–13. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.046>
- Gunderson MP, Leblanc GA, Guillette LJ (2001) Alterations in sexually dimorphic biotransformation of testosterone in juvenile American alligators (*Alligator mississippiensis*) from contaminated lakes. *Environ Health Perspect* 109:1257–1264. <https://doi.org/10.1289/ehp.011091257>
- Gust M, Vulliet E, Giroud B, et al (2010) Development, validation and comparison of LC-MS/MS and RIA methods for quantification of vertebrates-like sex-steroids in prosobranch mollusks. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 878:1487–1492. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.03.046>
- Hall JE (2011) Funciones reproductoras y hormonales masculinas. In: Guyton y Hall. *Tratado de fisiología médica*, 12th edn. Elsevier Health Sciences, pp 1003–1008
- Harris D (2010) High-Performance Liquid Chromatography. In: Harris D (ed) *Quantitative Chemical Analysis*, Octava edi. W. H. Freeman and Company, New York, pp 595–599
- Heinlein C, Chang C (2002) The Roles of Androgen Receptors and Androgen- Binding

- Proteins in Nongenomic Androgen Actions. *Mol Endocrinol* 16:2181–2187.
<https://doi.org/10.1210/me.2002-0070>
- Herbst KL, Bhasin S (2004) Testosterone action on skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7:271–277. <https://doi.org/10.1097/00075197-200405000-00006>
- Hikin A, Swerdloff R, Wang C (2007) The testis. In: Melmed S, Conn PM (eds) *Endocrinology: Basic and Clinical Principles*, Second. Humana Press, New Jersey, pp 405–418
- Hines M (2010) Sex-related Variation in Human Behavior and the Brain. *Trends Cogn Sci* 14:448–456. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2010.07.005>.Sex-related
- Hiort O (2002) Androgens and puberty. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 16:31–41. <https://doi.org/10.1053/beem.2002.0178>
- Holt EH, Peery HE (2010) Hormonal Control of Reproduction in the Male. In: Holt EH, Peery HE (eds) *Basic Medical Endocrinology*, 4th edn. Academic Press, pp 239–256
- ICH (2005) ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). *Int Conf Harmon Tech Requir Regist Pharm Hum* 1–17
- Jones SDJ, Dukovac T, Sangkum P, et al (2015) Erythrocytosis and Polycythemia Secondary to Testosterone Replacement Therapy in the Aging Male. *Sex Med Rev* 3:101–112. <https://doi.org/10.1002/smrj.43>
- Kalogera E, Pistos C, Provatopoulou X, et al (2013) Androgen glucuronides analysis by liquid chromatography tandem-mass spectrometry: Could it raise new perspectives in the diagnostic field of hormone-dependent malignancies? *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 940:24–34
- Kamrath C, Hochberg Z, Hartmann MF, et al (2012) Increased Activation of the Alternative “ Backdoor ” Pathway in Patients with 21-Hydroxylase Deficiency: evidence from urinary steroid hormone analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 97:367–375. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-1997>
- Kaufman JM, Vermeulen A (2005) The Decline of Androgen Levels in Elderly Men and Its Clinical and Therapeutic Implications. *Endocrinol Rev* 26:833–876. <https://doi.org/10.1210/er.2004-0013>
- Kicman AT (2010) Biochemical and physiological aspects of endogenous androgens. *Handb.*

Exp. Pharmacol. 195:25–64

- Koal T, Schmiederer D, Pham-Tuan H, et al (2012) Standardized LC-MS/MS based steroid hormone profile-analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 129:129–138. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.12.001>
- Li J, Li X, Li M, et al (2005) Decline of serum levels of free testosterone in aging healthy Chinese men. *Aging Male* 8 (3–4):203–206. <https://doi.org/10.1080/13685530500356010>
- Lubahn DB, Joseph DR, Sar M, et al (1988) The Human Androgen Receptor: Complementary Deoxyribonucleic Acid Cloning, Sequence Analysis and Gene Expression in Prostate. *Mol Endocrinol* 2:1265–1275. <https://doi.org/10.1210/mend-2-12-1265>
- Luu-The V (2013) Assessment of steroidogenesis and steroidogenic enzyme functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 137:176–182. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.05.017>
- Luu-The V, Labrie F (2010) The intracrine sex steroid biosynthesis pathways. *Prog Brain Res* 181:177–192. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)81010-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)81010-2)
- Marcos J, Pozo OJ (2016) Current LC–MS methods and procedures applied to the identification of new steroid metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol* 162:41–56. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.12.012>
- Mareck U, Geyer H, Opfermann G, et al (2008) Factors influencing the steroid profile in doping control. *J Mass Spectrom* 43:877–891. <https://doi.org/10.1002/jms>
- Martínez-Brito D, Correa Vidal MT, de la Torre X, et al (2013) Reference ranges for the urinary steroid profile in a Latin-American population. *Drug Test Anal* 5:619–626. <https://doi.org/10.1002/dta.1448>
- Matsumoto A (2001) Androgen stimulates neuronal plasticity in the perineal motoneurons of aged male rats. *J Comp Neurol* 430:389–395. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20010212\)430:3<389::aid-cne1038>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20010212)430:3<389::aid-cne1038>3.0.co;2-3)
- Matsumoto A (2005) Testosterone prevents synaptic loss in the perineal motoneuron pool in the spinal cord in male rats exposed to chronic stress. *Stress* 8:133–140. <https://doi.org/10.1080/10253890500140642>
- Matuszewski BK (2006) Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in

- quantitative HPLC-MS bioanalysis. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 830:293–300. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.11.009>
- Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM (2003) Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC – MS/MS, *Anal Chem*. 75 (2003) 3019 – 3030. *Anal Chem* 75:3019–3030
- Mcardle SEB, Ali SA, Li G, et al (2003) Realizing the potential of ejaculate/seminal fluid in detecting and predicting natural history. *Methods Mol Med* 81:199–217. <https://doi.org/10.1385/1-59259-372-0:199>
- Mohamad N-V, Soelaiman I-N, Chin K-Y (2016) A concise review of testosterone and bone health. *Clin Interv Aging* 11:1317–1324. <https://doi.org/10.2147/CIA.S115472>
- Monostory K, Dvorak Z (2011) Steroid regulation of drug-metabolizing cytochromes P450. *Curr Drug Metab* 12:154–172. <https://doi.org/10.2174/138920011795016854>
- Moon J-Y, Jung H-J, Moon MH, et al (2009) Heat-map visualization of gas chromatography-mass spectrometry based quantitative signatures on steroid metabolism. *J Am Soc Mass Spectrom* 20:1626–1637. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.04.020>
- Moon JY, Kwon W, Suh S, et al (2014) Reference ranges for urinary levels of testosterone and epitestosterone, which may reveal gonadal function, in a Korean male population. *J Steroid Biochem Mol Biol* 140:100–105. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.12.001>
- Morelli A, Filippi S, Zhang X-H, et al (2005) Peripheral regulatory mechanisms in erection. *Int J Androl* 28 Suppl 2:23–27. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00550.x>
- Negri-Cesi P, Colciago A, Celotti F, Motta M (2004) Sexual differentiation of the brain: role of testosterone and its active metabolites. *J Endocrinol Invest* 27:120–127
- Niessen WMA (2006) Liquid Chromatography and Sample Pretreatment. In: Niessen WMA (ed) *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*, Third. Taylor & Francis, pp 3–21
- Niwa T, Yabusaki Y, Honm K a, et al (1998) Contribution of human hepatic cytochrome P450 isoforms to regioselective hydroxylation of steroid hormones. *Xenobiotica* 28:539–547
- Norman AW, Mizwicki MT, Norman DPG (2004) Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev Drug Discov* 3:27–41. <https://doi.org/10.1038/nrd1283>

- Ohlander SJ, Varghese B, Pastuszak AW (2018) Erythrocytosis Following Testosterone Therapy. *Sex Med Rev* 6:77–85. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2017.04.001>
- Pertierra AG, Garrido A V, Olmo R, Aznar CC (2001) Metabolismo de proteínas y aminoácidos. In: Pertierra AG, Garrido A V, Olmo R, Aznar CC (eds) *Bioquímica Metabólica: Conceptos y Tests*. Tebar Flores, pp 96–97
- Pingili AK, Thirunavukkarasu S, Kara M, et al (2016) 6 β -hydroxytestosterone, a cytochrome P450 1B1-testosterone-metabolite, mediates angiotensin II-induced renal dysfunction in male mice. *Hypertension* 67:916–926. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06936>
- Ponzetto F, Mehl F, Boccard J, et al (2016) Longitudinal monitoring of endogenous steroids in human serum by UHPLC-MS/MS as a tool to detect testosterone abuse in sports. *Anal Bioanal Chem* 408:705–719. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9185-1>
- Rogol AD (2002) Androgens and puberty. *Mol Cell Endocrinol* 198:25–29. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(02\)00365-9](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(02)00365-9)
- Romeo RD, Waters EM, McEwen BS (2004) Steroid-induced hippocampal synaptic plasticity: sex differences and similarities. *Neuron Glia Biol* 1:219–229. <https://doi.org/10.1017/S1740925X05000086>
- Rubinson KA, Rubinson JF (2001) Introducción a la espectrometría. In: Rubinson KA, Rubinson JF (eds) *Análisis Instrumental Rubinson & Rubinson*. Pearson Educación, Madrid, pp 281–310
- Russell DW, Wilson JD (1994) Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem* 63:25–61. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.000325>
- Saito K, Yagi K, Ishizaki A, Kataoka H (2010) Determination of anabolic steroids in human urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 52:727–733. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.02.027>
- Sanderson JT (2006) The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicol. Sci.* 94:3–21
- Saugy M, Cardis C, Robinson N, Schweizer C (2000) Test methods: Anabolics. Baillière's

- Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 14:111–133.
<https://doi.org/10.1053/beem.2000.0058>
- Schiffer L, Arlt W, Storbeck K (2018) Molecular and Cellular Endocrinology Intracrine androgen biosynthesis , metabolism and action revisited. *Mol Cell Endocrinol* 465:4–26. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.08.016>
- Schiffer L, Barnard L, Baranowski ES, et al (2019) Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology Human steroid biosynthesis , metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes : A comprehensive review. *J Steroid Biochem Mol Biol* 194:105439. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105439>
- Schirmeister J, Willmann H, Kiefer H (1964) [Plasma Creatinine as rough indicator of renal function]. *Dtsch Med Wochenschr* 89:1018–1023. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1111251>
- Shahani S, Braga-Basaria M, Maggio M, Basaria S (2009) Androgens and erythropoiesis: past and present. *J Endocrinol Invest* 32:704–716. <https://doi.org/10.1007/BF03345745>
- Shang Y, Myers M, Brown M (2002) Formation of the Androgen Receptor Transcription Complex. *Mol Cell* 9:601–610. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00471-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00471-9)
- Shrivastava A, Gupta V (2011) Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles Young Sci* 2:21–25. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>
- Shupe J, Cheng J, Puri P, et al (2011) Regulation of Sertoli-germ cell adhesion and sperm release by FSH and nonclassical testosterone signaling. *Mol Endocrinol* 25:238–252. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0030>
- Sierra-Santoyo A, Herna M, Albores A, Cebria ME (2005) DDT increases hepatic testosterone metabolism in rats. *Arch Toxicol* 79:7–12. <https://doi.org/10.1007/s00204-004-0603-y>
- Simoncini T, Genazzani AR (2003) Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol* 148:281–292. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1480281>
- Singh R, Artaza JN, Taylor WE, et al (2003) Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-

- mediated pathway. *Endocrinology* 144:5081–5088. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0741>
- Singh R, Artaza JN, Taylor WE, et al (2006) Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells: nuclear translocation of androgen receptor complex with beta-catenin and T-cell factor 4 may bypass canonical Wnt signaling to down-regulate adipogenic transcription factors. *Endocrinology* 147:141–154. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1649>
- Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA (2000a) Cromatografía de líquidos de alta eficacia. In: Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA (eds) *Principios de análisis instrumental*, Quinta. McGraw-Hill, pp 785–830
- Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA, Gómez MCM (2000b) Introducción a las separaciones cromatográficas. In: Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA, Gómez MCM (eds) *Principios de análisis instrumental*, Quinta. McGraw-Hill, pp 730–755
- Smith LB, Mitchell RT, McEwan IJ (2013) Where Does Testosterone Come from and How Does It Act? In: Smith LB, Mitchell RT, McEwan IJ (eds) *Testosterone: From Basic Research to Clinical Applications*. Springer New York, pp 17–29
- Snyder L, Kirkland J, Glajch J (2012a) Detection, Sensitivity and Selectivity. In: Snyder L, Kirkland J, Glajch J (eds) *Practical HPLC method development*, Segunda. John Wiley & Sons, pp 59–99
- Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL (2012b) Getting Started. In: Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL (eds) *Practical HPLC Method Development*, Second. John Wiley & Sons, pp 1–20
- Stocco D (2007) The Role of StAR in Leydig Cell Steroidogenesis. In: Payne AH, Hardy MP (eds) *The Leydig Cell in Health and Disease*. Humana Press, Totowa. N.J, pp 149–155
- Storer TW, Basaria S, Traustadottir T, et al (2017) Effects of Testosterone Supplementation for 3 Years on Muscle Performance and Physical Function in Older Men. *J Clin Endocrinol Metab* 102:583–593. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-2771>
- Storer TW, Magliano L, Woodhouse L, et al (2003) Testosterone dose-dependently increases maximal voluntary strength and leg power, but does not affect fatigability or specific tension. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1478–1485. <https://doi.org/10.1210/jc.2002->

021231

- Storer TW, Woodhouse L, Magliano L, et al (2008) Changes in muscle mass, muscle strength, and power but not physical function are related to testosterone dose in healthy older men. *J Am Geriatr Soc* 56:1991–1999. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2008.01927.x>
- Swain A (2006) Sex Determination and Differentiation. In: Neill JD (ed) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third*. Elsevier, pp 245–256
- Swerdloff RS, Dudley RE, Page ST, et al (2017) Dihydrotestosterone: Biochemistry, physiology, and clinical implications of elevated blood levels. *Endocr Rev* 38:220–254. <https://doi.org/10.1210/er.2016-1067>
- Tachibana S, Tanaka M (2001) Simultaneous determination of testosterone metabolites in liver microsomes using column-switching semi-microcolumn high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 295:248–256. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5223>
- Tan ME, Li J, Xu HE, et al (2014) Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin* 36:1–21. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.18>
- Travison TG, Araujo AB, O'Donnell AB, et al (2007) A population-level decline in serum testosterone levels in American men. *J Clin Endocrinol Metab* 92:196–202. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-1375>
- Tuck S, Francis R (2009) Testosterone, bone and osteoporosis. *Front Horm Res* 37:123–132. <https://doi.org/10.1159/000176049>
- Usmani KA, Rose RL, Hodgson E (2003a) Inhibition and activation of the human liver microsomal and human cytochrome P450 3A4 metabolism of testosterone by deployment-related chemicals. *Drug Metab Dispos* 31:384–391
- Usmani KA, Rose RL, Hodgson E (2003b) Inhibition and activation of the human liver microsomal and human cytochrome P450 3A4 metabolism of testosterone by deployment-related chemicals. *Drug Metab Dispos* 31:384–391
- Van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, et al (2009) Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 877:2198–2207. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.01.003>
- Van Renterghem P, Van Eenoo P, Geyer H, et al (2010) Reference ranges for urinary

- concentrations and ratios of endogenous steroids, which can be used as markers for steroid misuse, in a Caucasian population of athletes. *Steroids* 75:154–163. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2009.11.008>
- Wang D, Zhang M (2007) Rapid quantitation of testosterone hydroxyl metabolites by ultra-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 855:290–294. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.05.022>
- Waxman DJ (1988) Interactions of hepatic cytochromes P-450 with steroid hormones. Regioselectivity and stereospecificity of steroid metabolism and hormonal regulation of rat P-450 enzyme expression. *Biochem Pharmacol* 37:71–84. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(88\)90756-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(88)90756-3)
- Waxman DJ, Attisano C, Guengerich FP, Lapenson DP (1988) Human liver microsomal steroid metabolism: Identification of the major microsomal steroid hormone 6 β -hydroxylase cytochrome P-450 enzyme. *Arch Biochem Biophys* 263:424–436. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(88\)90655-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90655-8)
- Waxman DJ, Lapenson DP, Aoyama T, et al (1991) Steroid hormone hydroxylase specificities of eleven cDNA-expressed human cytochrome P450s. *Arch Biochem Biophys* 290:160–166. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90602-F](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90602-F)
- Whalley PM, Bakes D, Grime K, Weaver RJ (2001) Rapid high-performance liquid chromatographic method for the separation of hydroxylated testosterone metabolites. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 760:281–288. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00286-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00286-9)
- Wilson JD (2001) The role of 5 α -reduction in steroid hormone physiology. *Reprod Fertil Dev* 13:673–678. <https://doi.org/10.1071/rd01074>
- Wilson VS, Leblanc GA (1998) Endosulfan elevates testosterone biotransformation and clearance in CD-1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 148:158–168. <https://doi.org/10.1006/taap.1997.8319>
- Wilson VS, LeBlanc GA (2000) The contribution of hepatic inactivation of testosterone to the lowering of serum testosterone levels by ketoconazole. *Toxicol Sci* 54:128–37
- Xu X, Veenstra TD, Fox SD, et al (2005) Simultaneously in Human Urine by High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal Chem* 77:6646–6654.

<https://doi.org/10.1021/ac050697c>

- Yamazaki H, Shimada T (1997a) Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 346:161–169. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0302>
- Yamazaki H, Shimada T (1997b) Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 346:161–169. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0302>
- Yasuda M, Furuya K, Yoshii T, et al (2007) Low testosterone level of middle-aged Japanese men – the association between low testosterone levels and quality-of-life. *J Men’s Heal Gend* 4:149–155. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmhg.2007.03.006>
- Zang X, Jones CM, Long TQ, et al (2014) Feasibility of detecting prostate cancer by ultraperformance liquid chromatography-mass spectrometry serum metabolomics. *J Proteome Res* 13:3444–3454. <https://doi.org/10.1021/pr500409q>



Analysis of testosterone-hydroxylated metabolites in human urine by ultra high performance liquid chromatography-Mass Spectrometry



Derly Constanza Escobar-Wilches^a, Arianna Ventura-Bahena^a, Ma. de Lourdes López-González^a, Luisa Torres-Sánchez^b, Mario Figueroa^{c,*}, Adolfo Sierra-Santoyo^{a,*}

^a Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN), Av. IPN No. 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Ciudad de México, CP 07360, Mexico

^b Instituto Nacional de Salud Pública, Centro de Investigación en Salud Poblacional, Cuernavaca, CP 62100, Mexico

^c Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, CP 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Testosterone-hydroxylated metabolites
UPLC-MS method
Testosterone biotransformation
Human urine

ABSTRACT

Testosterone regulates the male reproductive system and acts directly or indirectly on nearly all systems during fetal, pubertal and adult life. Testosterone homeostasis depends on its synthesis and degradation. The major biotransformation reactions are hydroxylation by different cytochrome P450 (CYP) isoforms. There are no described methods to determine the profile of testosterone-hydroxylated metabolites in human urine. The aim of this study was to develop an analytical method to determine testosterone-hydroxylated metabolites in human urine using UPLC-MS. Seven testosterone-hydroxylated metabolites, androstenedione, and testosterone, were identified by comparison of their t_{ret} and positive electrospray ionization (ESI⁺) data, with those of analytical standards. The method developed is sensitive, specific, repeatable, and precise. Limits of detection and quantitation for all compounds ranged from 1.360 to 13.054 ng/ml and 4.234–39.679 ng/ml, respectively. The percentages of recovery were between 81.2 and 128.8%. The applicability of the analytical method was confirmed by analysis of urine samples obtained from two groups of healthy men (25–30 and 50–75 years old). All analytes were identified with slightly different metabolites profiles in both groups. In conclusion, the UPLC-MS method developed here was validated for the analysis of testosterone-hydroxylated metabolites in human urine.

1. Introduction

Five classes of steroid hormones are recognized in mammals: progestogens, glucocorticoids, mineralocorticoids, estrogens, and androgens [1]. Testosterone, the main androgen in humans, is involved in several functions such as maintaining sexual function, germ cell and accessory sex organ development, metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates, stimulation of erythropoiesis, promotion of skeletal muscle growth, coagulation, and participation in cognitive and psychosexual behavior [2,3].

Testosterone levels are maintained through a dynamic balance between its biosynthesis, interactions among hormones, rates of excretion, transport, catabolism, and elimination. Testosterone balance could be disrupted by affecting these physiological processes. Biosynthesis of testosterone occurs primarily in the Leydig cells of the testes, and the theca- and granulosa-derived luteal cells of the ovaries. Testosterone is synthesized from cholesterol by a series of reactions catalyzed by

enzymes from the cytochrome P450 (CYP) 11 and 17 families, as well as other enzymes. This pathway includes the formation of several intermediary metabolites, as is shown in Fig. 1 [4,5]. After synthesis, it is secreted into the bloodstream, and a small amount is converted into dihydrotestosterone (5-DHT) in peripheral tissues by 5 α -reductase [6]. Another fraction of testosterone, jointly with androstenedione (AD), are aromatized on ring A to form estrone (E₁) and estradiol (E₂), respectively, in a reaction catalyzed by the aromatase CYP19A1 [5].

The liver plays an important role in maintaining testosterone balance and has several mechanisms for its biotransformation. The major metabolic reactions of testosterone are hydroxylation, and further oxidation carried out by CYP in a stereo- and regio-selectivity manner by attaching hydroxyl groups to the steroid ring (Fig. 1) [7]. Another catabolism pathway is oxide-reduction reactions, in which testosterone, AD, and dehydroepiandrosterone (DHEA) lead to the formation of androsterone, etiocholanolone, and androstenediol [8]. Testosterone and its hydroxylated metabolites are conjugated with glucuronic acid or

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: asierra@cinvestav.mx, sisadolfo@gmail.com (A. Sierra-Santoyo).

<https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113670>

Received 12 November 2019; Received in revised form 7 February 2020; Accepted 27 February 2020

Available online 29 February 2020

0003-2697/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

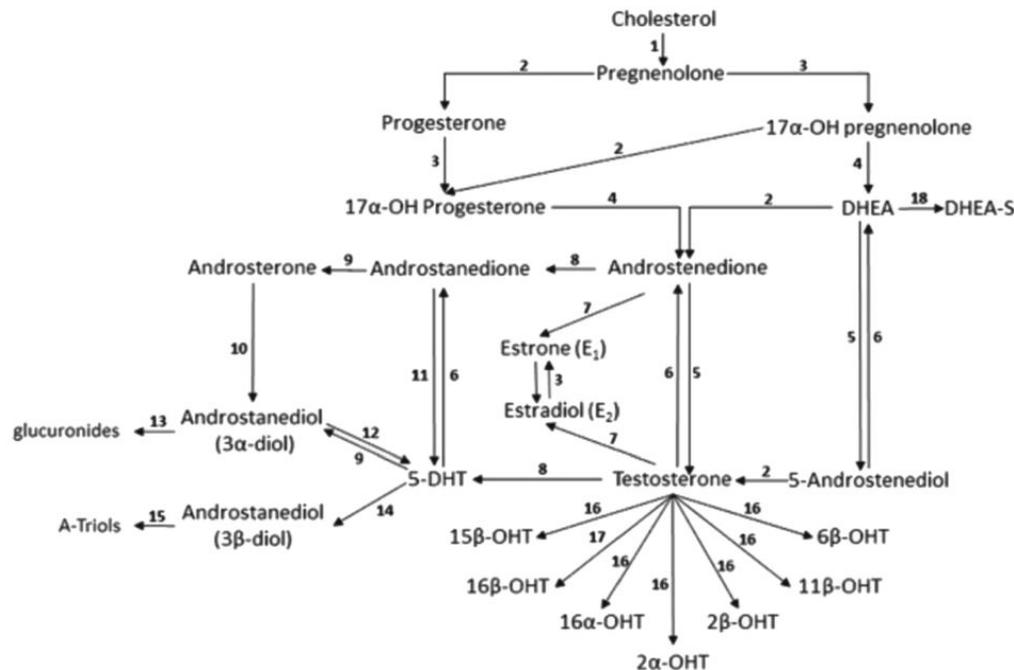


Fig. 1. Synthesis and metabolism of androgens in humans. ¹CYP11A1 (CYPside-chain cleavage); ²HSD3β 1,2 (3β-hydroxy-steroid dehydrogenase type 1 and type 2); ³CYP17A1 hydroxylase; ⁴CYP17A1 lyase; ⁵HSD17β3 and AKR1C3, (17β-hydroxy-steroid dehydrogenase type 3 and aldo-keto reductase family 1 member 3); ⁶HSD17β2 (17β-hydroxy-steroid dehydrogenase type 2) and AKR1C3 (testosterone to AD); ⁷CYP19A1 (aromatase); ⁸SRD5A 1,2 (5α-reductase type 1 or 2); ⁹AKR1C2 (aldo-keto reductase family 1 member 2); ¹⁰HSD17β3 (17β-hydroxy-steroid dehydrogenase type 3); ¹¹AKR1C3 (aldo-keto reductase family 1 member 3); ¹²HSD17β6, HSD17β10 and HSD17β13 (17β-hydroxy-steroid dehydrogenase type 6, 10 and 13); ¹³UGT2β15 and UGT2β17 (UDP glucuronosyltransferase family 2 member β15 and β17); ¹⁴AKR1C1 (aldo-keto reductase family 1 member 1); ¹⁵CYP7B1, ¹⁶CYP3A4; ¹⁷CYP2B6, 2C9, 2C19, 3A4; ¹⁸SULT (sulfo-transferase). 5-Dihydrotestosterone (5-DHT), dehydroepiandrosterone (DHEA), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), and -hydroxytestosterone (-OHT).

sulfate and excreted in bile and urine. The introduction of hydroxyl groups into one or more of the testosterone rings, as well as the conjugated formation, increases the water solubility of the molecule and reduces or abolishes activity at androgen receptor [5].

Several CYP isoforms are involved in the oxidative metabolism of testosterone, with a varying degree of catalytic activity on hydroxylation reactions as has been described *in vitro* studies (Fig. 1) [7,9]. The major testosterone-hydroxylated metabolite found in humans is 6β-hydroxytestosterone (6β-OHT), and it is often used as a marker of hepatic CYP3A4 for *in vitro* and *in vivo* studies [10,11]. CYP3A4 is the predominant isoform involved in the formation of 6β-OHT; however, other isoforms such as CYP3A5, 3A7, 1A1/2, 2D6, 2C19 and 2B6 are also involved. CYP3A4 also catalyzes the formation of 15β-OHT, 16β-OHT, and 2β-OHT [12], as well as the formation of 16α-OHT, 2α-OHT, and 11β-OHT. The formation of 16β-OHT is catalyzed by CYP2B6, 2C9, 2C19, and 3A4 isoforms [5]. The metabolites 2β-OHT and 15β-OHT represent the second major metabolites after 6β-OHT, whereas 2α-OHT and 11β-OHT are minor metabolites produced by CYP3A4. The oxidation of testosterone to AD is catalyzed by CYP2C19 and 2D6 more actively than any other CYP isoform [13]. This information indicates that *in vitro* testosterone metabolism by CYP exhibits a large variability which is difficult to predict which CYP isoforms are mainly responsible for testosterone metabolism *in vivo*. Likewise, this difficulty also has limited the characterization of the profile of testosterone-hydroxylated metabolites either in human serum or urine since it has received less attention.

Different analytical methods have been reported for the analysis of steroids in urine [8,14–16]. Radioimmunoassay and enzyme

immunoassay are the most widely used methods for the analysis of testosterone and other steroid hormones. These methods have high sensitivity, but they also have some disadvantages [17,18]. Gas chromatography coupled to Mass Spectrometry (MS) is the gold standard technique for steroids determination because shows high resolution, selectivity and sensitivity; however, the analytes need to be derivatized due they are not volatile compounds, which in some cases may result in an unpractical and time-consuming process [16,19]. Liquid chromatography coupled to MS (LC-MS) with an electrospray ionization (ESI) source is a powerful tool for the analysis of steroids for clinical purposes without requiring any sample derivatization procedure. This technique possesses high specificity and sensitivity and is widely used for the simultaneous identification of testosterone and other steroids in urine samples [15,16,19–22]. There are no methods to identify and quantify testosterone-hydroxylated metabolites in human urine using ultra-high performance liquid chromatography coupled to MS (UPLC-MS).

Since the profile of testosterone-hydroxylated metabolites in human urine remains to be fully elucidated, which could provide a comprehensive point of view on CYP-dependent testosterone catabolism, the aim of this study was to develop a liquid chromatography method for the analysis of testosterone-hydroxylated metabolites in human urine by UPLC-MS.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and standards

Testosterone, AD, 6β-OHT, 16β-OHT, 15β-OHT, 2β-OHT, 11β-OHT,

2 α -OHT, 16 α -OHT, 2-OHE₂, 4-OHE₂, 4-OHE₁, 4-MeOE₁, DHEA, 5-androstenediol, and 6-dehydrotestosterone (6-DHT), used as an internal standard (IS), were obtained from Steraloids Inc. (Newport, RI, USA). β -glucuronidase/sulfatase type HP-2 from *Helix pomatia* was purchased from Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA). Liquid chromatography-mass (LC-MS) spectrometry grade acetonitrile, water, and methanol, anhydrous sodium sulfate, and solid-phase extraction (SPE) C18 cartridges (BAKERBOND spe™ 40 μ m, 60 Å) were purchased from J.T. Baker (Center Valley, PA, USA). Sodium carbonate and sodium hydrogen carbonate were acquired from Merck (Darmstadt, Germany).

Stock solutions (1 mg/ml) of testosterone, AD, testosterone-hydroxylated metabolites, and 6-DHT were individually prepared in methanol. These solutions were used to prepare 0.1, 0.01, 0.001, and 0.0001 mg/ml standards in LC-MS grade methanol and were stored at -20 °C. Stock solutions were newly prepared when the peak area response decreased by more than 10%.

2.2. Chromatographic conditions

Testosterone-hydroxylated metabolites, AD, testosterone, and 6-DHT were analyzed on a Waters Acquity UHPLC-H Class system (Waters, Milford, MA, USA) equipped with a quaternary pump, sample manager, column oven, and photodiode array detector (PDA), interfaced with a SQD2 single-quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray ion source (ESI). MassLynx software version 4.1 was used to control the UHPLC-MS system and for data acquisition and processing. The analytical method was developed using a Kinetex XB-C18 column (100 \times 2.1 mm, 1.7 μ m particle size, 100 Å, Phenomenex, Torrance, CA, USA). The mobile phases consisted of 0.1% formic acid in water (A), acetonitrile (B) and methanol (C). The initial solvent conditions were 64:29:7 (A:B:C). After sample injection, a 10 min linear gradient to 53:40:7 (A:B:C) was applied, followed by a 3 min linear gradient to 52.3:41.1:6.6 (A:B:C). The initial conditions were then re-established by a 0.1 min step gradient and were maintained for 2 min to re-equilibrate the column. The flow rate was 0.2 ml/min, column temperature was set at 40 °C, and the injection volume was 2 μ l. MS parameters were as follows: cone and capillary voltages, 35.0 V and 3.0 kV; source and desolvation temperatures, 350 and 450 °C, respectively, and nitrogen as the collision gas. For the identification of compounds, the PDA detector scanned from 190 to 500 nm and the ESI-MS spectra were obtained within a mass range of m/z 100–1000 (scan duration of 0.5 s), in both positive and negative modes.

2.3. Steroid-free human urine (SFHU)

A urine pool from 10 healthy male volunteers was percolated through SPE C18 cartridges previously activated with 5 ml methanol followed by 5 ml water. The unretained fraction was collected and checked to verify the absence of analytes of interest [20]. Steroid-free urine was used as a matrix to prepare calibration graphs for all metabolites and steroid spikes.

2.4. Method validation

Calibration graphs were prepared on SFHU to avoid possible matrix effects. The calibration curves were prepared in a range from 5 to 1250 ng/ml and was different for each one analyte using authentic standards, which involved the measurement of the peak area of six concentrations in triplicate and the addition of 80 ng/ml 6-DHT as the IS. The correct integration of every UPLC-MS peak area of each standard was checked manually to verify the presence and absence of the metabolite in the urine samples. The regression coefficient, slope, and intercept were calculated from the calibration graphs using SigmaPlot software version 13.0.

The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were determined using the following equations $LOD = 3.29 \times SD$ (standard

deviation) and $LOQ = 10 \times SD$. The SD for each metabolite was calculated by injecting seven replicates of the standard solutions at a low concentration of the calibration graph [23].

The accuracy was evaluated by determining the recovery in SFHU samples spiked with 6 β -OHT, 15 β -OHT, 16 β -OHT, 16 α -OHT, 11 β -OHT, 2 α -OHT, 2 β -OHT, AD, and testosterone using three amounts 100 (low), 500 (medium), and 1000 ng/ml (high) in triplicate. These samples were processed for analysis in a similar manner to the real human samples. Precision data were expressed by the coefficient of variation (CV) percentage. The intra- and inter-day precision analysis was used to evaluate the repeatability of the developed method. For intra-day precision, each standard was analyzed at three different concentrations in triplicate within one day. For inter-day precision, each standard was analyzed at three different concentrations in triplicate every day of analysis. Control charts for testosterone, AD, and 6-DHT were used as internal quality controls of the method for checking the ionization of analytes and evaluating the stability of standards.

2.5. Human urine samples

Human urine samples were collected from 10 healthy adult male volunteers from Mexico City: five of them were aged 25–30 years old, and the other five were 50–75 years old. The participants received medical examinations, and no issues with blood pressure, glucose, and lipid blood levels, alcoholism, pathological antecedents such as prostate cancer diagnosis, prostate or testicular pathology, and any other type of disease caused on the reproductive system, or medical treatments were detected. The sampling protocol was approved by the Institutional Ethical Committee for the Research in Humans (COBISH) of the Center for Research and Advanced Studies (Cinvestav-IPN). All subjects gave written informed consent for their participation, and urine samples were collected early in the morning. After collection, samples were immediately stored at -70 °C until their processing.

2.6. Processing of samples

To a 3 ml aliquot of human urine, 80 ng/ml of the IS (6-DHT) was added. The mixture was shaken for 1 min, and analytes were extracted from urine using SPE C18 cartridges previously activated and eluted with 3 ml methanol. Then, the solvent was evaporated to dryness under a stream of N₂ at 40 °C; the residues were dissolved in 1 ml of acetate buffer (pH 5.0; 0.5 M) and 7,500 IU β -glucuronidase/sulfatase type HP-2 from *H. pomatia* were added to carry out the enzymatic hydrolysis at 50 °C for 1 h. The enzymatic reaction was stopped by the addition of 50 mg Na₂CO₃:NaHCO₃ (1:10, w/w) to adjust the pH to 8.5. The hydrolyzed metabolites were extracted using 5 ml of diethyl ether; this mixture was vortexed for 10 min and centrifuged (1600 \times g) for 15 min at 4 °C. The organic layer was passed through anhydrous sodium sulfate and evaporated under a stream of N₂ at room temperature. The extracts were dissolved in 150 μ l of MS grade methanol for analysis by UPLC-MS.

2.7. Statistical analysis

Statistical calculations were performed using the SigmaPlot program version 13.0 (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA). To establish the optimal enzyme concentration for hydrolysis, we used a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Holm-Sidak *post hoc* to test the differences of 16 α -OHT and 6 β -OHT mean concentrations, according to different concentrations of β -glucuronidase/sulfatase concentrations. Differences between younger and older men in relation to testosterone-hydroxylated metabolites, AD and testosterone analyzed in urine were determined using Mann-Whitney rank sum test. Significant statistically differences were set at $p < 0.05$.

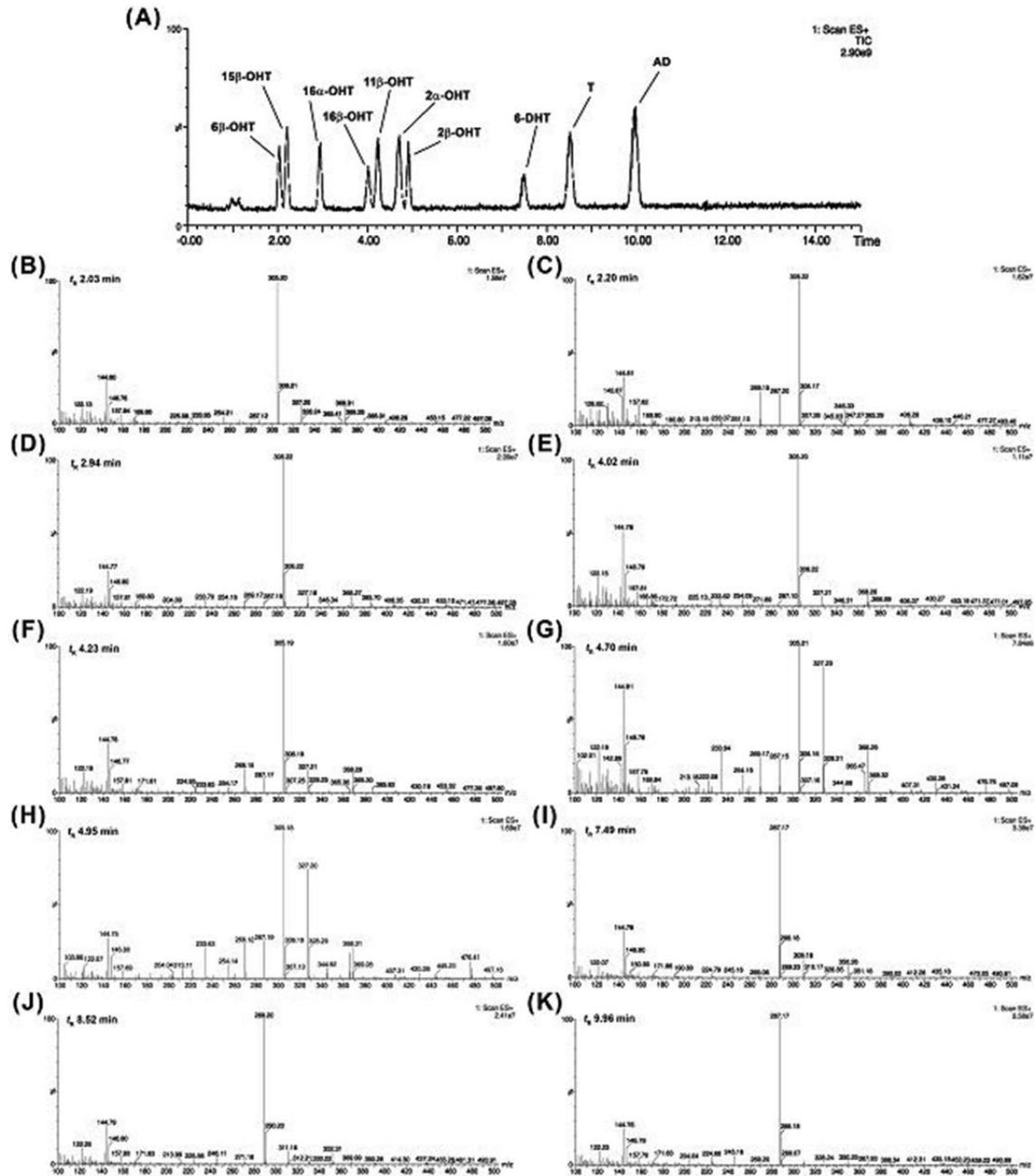


Fig. 2. Total ion current chromatogram of standard solution mix (0.01 μg/mL in methanol) (A). Mass spectra in ESI + mode for 6β-OHT (B), 15β-OHT (C), 16α-OHT (D), 16β-OHT (E), 11β-OHT (F), 2α-OHT (G), 2β-OHT (H), 6-DHT (I), testosterone (J), and androstenedione (K).

3. Results

A suitable UPLC-MS method was developed to quantify seven testosterone-hydroxylated metabolites, AD, and testosterone in human urine samples. The optimal UPLC-MS separation conditions were achieved with a reversed-phase column and a mixture of 0.1% formic

acid in water:acetonitrile:methanol (Fig. 2A–K). Due to testosterone-hydroxylated metabolites share similar mass transition fragments in mass spectrometer analysis all separated analytes were identified according to their *t*_{ret} and molecular ion [M+H]⁺ in the ESI + mode using authentic standards (Table 1). The *t*_{ret} and mass spectra for each analyte were not affected by the matrix components, and the IS, 6-DHT,

Table 1Retention times (t_{ret}), molecular ions, linear regression equations and detection and quantitation limits of testosterone-hydroxylated metabolites, androstenedione, and testosterone.

Analyte	t_{ret} (min)	Molecular ion m/z $[M+H]^+$	Linear regression equations	r	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
6 β -OHT	2.02	305.20	$y = 241.7x + 11201.3$	0.9996	6.426	19.530
15 β -OHT	2.21	305.22	$y = 635.6x + 9374.7$	0.9995	8.973	27.273
16 α -OHT	2.94	305.22	$y = 550.4x + 604.6$	0.9999	12.315	37.432
16 β -OHT	4.02	305.20	$y = 166.5x + 417.2$	0.9990	5.280	16.049
11 β -OHT	4.23	305.19	$y = 537.0x + 3347.9$	0.9995	13.054	39.679
2 α -OHT	4.70	305.21	$y = 302.0x + 2211.7$	0.9996	7.408	22.517
2 β -OHT	4.95	305.18	$y = 358.7x + 1326.2$	0.9992	4.041	12.283
Testosterone	8.52	289.20	$y = 1451.2x + 10811.9$	0.9972	1.360	4.134
Androstenedione	9.96	287.17	$y = 1249.9x + 6417.8$	0.9999	2.938	8.932

was not detected in nonspiked human samples.

Linear relationships ($r > 0.9972$) were observed in the calibration graphs for all analytes from 5 to 1250 ng/ml. The LODs ranged from 1.360 to 13.054 ng/ml, and the LOQs from 4.134 to 39.679 ng/ml (Table 1); while testosterone was the most sensitive analyte 11 β -OHT was the less sensitive. The recovery ranges for 6 β -OHT, 16 β -OHT, 2 β -OHT, testosterone, and AD were found in the range from 81.2 to 128.8% at the three concentrations tested (low, medium, and high). Although, higher values of recovery for 11 β -OHT and 16 α -OHT (at the three levels), 15 β -OHT (medium level), and 2 α -OHT (low level) were observed (Table 2). Precision values were less than 17% for all analytes (Table 2) and the CV of t_{ret} intra- and inter-day were $< 1.04\%$ and $< 1.53\%$, respectively. Recovery and precision control charts for all analytes were performed for six months and showed values within the acceptable limits (± 2 SD), reflecting the stability of testosterone and its metabolites as well as the repeatability of the method.

To optimize the efficiency of extraction of the analytes in the urine samples, the following critical factors were evaluated: pretreatment of the sample, type of extraction, and concentration of β -glucuronidase/sulfatase for enzymatic hydrolysis. The extraction efficiency was evaluated by the recovery of 16 α -OHT, 2 β -OHT, 6 β -OHT and testosterone added to the urine. First, when precipitant material was eliminated either by centrifugation at 1600 $\times g$ one or two times or filtering (20.0, 0.47 or 0.20 μm size pore), important losses of up 45% of testosterone and 6 β -OHT were observed. The extraction efficiency was also evaluated using liquid-liquid and liquid-solid extraction. Better results for the recovery of all compounds were observed by liquid-solid extraction using SPE C18 cartridges (74 and 110%). Based on these results, it was decided that urine samples do not require pretreatment to eliminate precipitant material, and only solid-phase extraction was used prior to enzymatic hydrolysis of the conjugated metabolites in the samples.

It is well known that testosterone and its hydroxylated metabolites are mainly excreted as sulfate- and glucuronide-conjugates in urine [24,25]. Therefore, the optimal enzyme concentration for hydrolysis was established based on the formation of 16 α -OHT and 6 β -OHT at different concentrations of β -glucuronidase/sulfatase, as shown in

Fig. 3. All the tested concentrations produced a significant increase in the concentration of 16 α -OHT and 6 β -OHT, in contrast with samples with no addition of enzyme into the incubation medium. Concentrations of 7,500 and 10,000 IU/ml showed the highest levels of metabolites generated, increasing the levels of 6 β -OHT in 51- and 52-fold, respectively, and approximately 12- and 11-fold for 16 α -OHT, respectively. Other metabolites were also evaluated; however, their formation after enzymatic hydrolysis was not as efficient as 6 β -OHT and 16 α -OHT (data not shown). The effect of reaction time was evaluated using 7,500 IU/ml of β -glucuronidase/sulfatase at 50 °C for 1 h of incubation and overnight at 37 °C. Similar results were obtained in both conditions, therefore, the experimental conditions for enzyme hydrolysis of testosterone-hydroxylated conjugated metabolites in urine were set at 7,500 IU/ml of β -glucuronidase/sulfatase incubated at 50 °C for 1 h.

The applicability of this validated method of UPLC-MS and the conditions for enzymatic hydrolysis were used to determine the extraction profile of testosterone-hydroxylated metabolites, AD, and testosterone in urine samples of healthy young (25–30 years old) and senior (50–75 years old) men. The quantification of the peaks was carried out by the external standard method. The analysis of the extracts showed the presence of seven testosterone-hydroxylated metabolites, AD and testosterone (Table 3). Even though only five samples per group were analyzed, among the oldest men there was an apparent decrease in most of these metabolites and a different metabolic pattern of testosterone-hydroxylated metabolites, AD and testosterone with respect to age. In both groups, the main analytes were 6 β -OHT and 16 α -OHT, followed by testosterone in the group of young men, and 16 β -OHT in the group of senior men, as well as their levels, were higher than those of testosterone. However, only AD levels were significantly lower among older adults.

4. Discussion

In this study, we developed and validated a UPLC-MS method for the simultaneous determination of seven testosterone-hydroxylated metabolites, testosterone, and AD in human urine after enzymatic

Table 2

Recovery and precision for testosterone and other metabolites analyzed in steroid-free human urine.

Analyte	Low (100 ng/ml)		Medium (500 ng/ml)		High (1000 ng/ml)	
	Recovery	C.V.	Recovery	C.V.	Recovery	C.V.
6 β -OHT	100.0	4.3	105.7	0.5	97.4	5.1
15 β -OHT	126.9	15.6	194.9	0.1	128.8	4.9
16 α -OHT	187.0	3.7	145.7	0.7	184.0	3.0
16 β -OHT	105.1	9.3	113.7	12.5	106.9	0.8
11 β -OHT	146.5	9.3	174.6	4.6	186.1	1.9
2 α -OHT	171.8	16.7	117.1	4.7	106.2	10.3
2 β -OHT	108.2	14.5	110.8	16.8	95.8	14.9
Testosterone	110.1	8.1	119.0	4.2	85.4	7.6
Androstenedione	89.7	15.8	81.2	7.0	95.7	1.4

Recovery represents %, of the mass of analyte detected in the spiked samples. The precision is represented by the coefficient of variation (C.V.) of the assay.

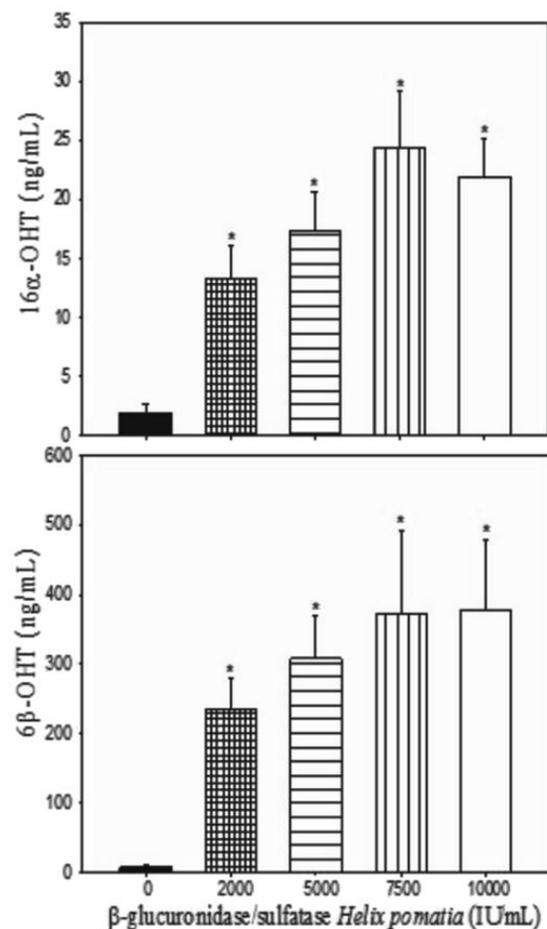


Fig. 3. Effect of enzymatic hydrolysis on 16 α -OHT and 6 β -OHT formation in human urine using different concentrations of β -glucuronidase/sulfatase from *H. pomatia*. Data represent mean \pm SD ($n = 3$). *Statistically significant from 0 IU/ml, $p < 0.001$, ANOVA followed by a *post hoc* Holm-Sidak test.

Table 3

Profile of testosterone-hydroxylated metabolites, androstenedione and testosterone in human urine.

Analyte	25–30 years group (ng/ml)	50–75 years group (ng/ml)	p
15 β -OHT	5.73 (3.91–17.85)	7.23 (2.59–14.92)	0.967
6 β -OHT	189.88 (26.35–223.52)	80.55 (7.38–192.68)	0.317
16 α -OHT	181.86 (30.71–315.06)	65.6 (25.14–196.54)	0.155
16 β -OHT	38.65 (28.16–82.67)	30.23 (5.03–202.47)	0.562
11 β -OHT	6.65 (3.61–19.78)	8.41 (2.19–18.08)	0.890
2 α -OHT	17.07 (6.87–25.16)	14.25 (7.38–52.32)	0.874
2 β -OHT	23.3 (2.84–35.69)	11.65 (6.11–35.72)	0.474
Testosterone	58.91 (2.67–81.95)	23.46 (4.24–98.47)	0.260
Androstenedione	19.83 (5.29–42.84)	7.83 (1.61–17.69)	0.023*

Data represent the median, and values in parenthesis indicate the range.

* Significant statistically difference between young and old men ($n = 5$).

$p < 0.05$, Mann-Whitney rank sum test.

hydrolysis and without the necessity of the derivatization process. This method resulted in a notable increase in sensitivity, chromatographic resolution, and shorter time of analysis. In addition, the analysis of

these analytes in a few numbers of samples reinforce that testosterone-hydroxylated metabolites would represent an important way of elimination of this hormone in urine human, in addition to other metabolites traditionally analyzed in this biological sample [8,14].

Despite similar t_{ret} and molecular weights of several testosterone-hydroxylated metabolites, the chromatographic conditions established in this study allowed the separation, identification, and quantitation of nine analytes within 15 min. Even this method is useful for analysis of pairs of hydroxylated isomers such as 16 α -OHT/16 β -OHT and 2 α -OHT/2 β -OHT. The t_{ret} of testosterone-hydroxylated metabolites, AD, and testosterone was constant ($CV < 1.5\%$) during all method development and sample analysis. The comparison of the mass spectra for each peak ($[M+H]^+$) in the analyzed samples, with those obtained from pure standards, allowed us to unequivocally identify each metabolite as well as to detect the presence of possible impurities. To demonstrate the non-interference with the endogenous isomeric steroids in the samples, the $[M+H]^+$ molecular ions for all analytes were selectively extracted from the chromatograms and compared with those obtained from authentic standards and their t_{ret} . For example, steroids such as estriol (E_3) (m/z 289.6 $[M+H]^+$, t_{ret} 2.1 min), 16-*epiE*₃ (m/z 271.2 $[M-OH]^+$ and t_{ret} 3.4 min), 16 α -OHE₁ (m/z 287.1 $[M+H]^+$ and t_{ret} 3.5 min), 4-OHE₂ (m/z 287.7 $[M-H]^-$ and t_{ret} 4.8), 2-OHE₂ (m/z 287.2 $[M-H]^-$ and t_{ret} 5.0 min), 2-OHE₁ (m/z 287.2 $[M+H]^+$ and t_{ret} 6.3 min), 4-OHE₁ (m/z 287.2 $[M+H]^+$ and t_{ret} 6.6 min), 5-androstenediol (m/z 273.1 $[M-OH]^+$ and t_{ret} 7.4 min), E_2 (m/z 255.2 $[M-OH]^+$ and t_{ret} 7.5 min), 4-MeOE₂ (m/z $[M-OH]^+$ 285.22, t_{ret} 8.17 min), 2-MeOE₂ (m/z 303.3 $[M+H]^+$, t_{ret} 9.0 min), E_1 (m/z 271.6 $[M+H]^+$ and t_{ret} 9.5 min), DHEA (m/z 271.2 $[M-OH]^+$ and t_{ret} 9.9 min), 4-MeOE₁ (m/z 301.7 $[M+H]^+$ and t_{ret} 10.3 min), and 3-MeOE₁ (m/z 301.3 $[M+H]^+$ and t_{ret} 11.8 min), which could be present in the urine, were selectively differentiated from the analytes used in this work. Thus, this method could also be used for the analysis of the estrogens and their metabolites in biological samples with effective analytical performance and selectivity.

The developed method also showed excellent linearity ($r > 0.9972$) over a large dynamic range of concentrations assayed (5–1250 ng/ml). This may be very important since it has been reported that androgens levels in human urine samples present great variability [20], and in the case of testosterone-hydroxylated metabolites levels excreted in the urine are depending on gender, ethnicity, age, metabolism, and CYP polymorphism. The LOD values for all analytes ranged from 1.360 to 13.054 ng/ml and the LOQ values ranged from 4.134 to 39.679 ng/ml, which are comparable to those reported by Wang and Zhang [26], whom determined testosterone-hydroxylated metabolites by UPLC-MS/MS produced in an *in vitro* assay using rat liver microsomes or using GC-MS for analysis of androgens, including some testosterone metabolites and drugs in human urine [27,28]. Recovery values of the method for seven analytes were acceptable (76.22–133.7%), however, metabolites such as 16 α -OHT and 11 β -OHT were out of range. The determination of endogenous steroids in urine with reference standards has frequently caused problems, which are mainly attributed to matrix effects. The major issue include signal enhancement, some possible alternatives to overcome these effects could be the use of a deuterated IS in the calibration samples and each urine sample to correctness and the use of artificial urine which represents a convenient way to imitate a biological matrix [29]. Therefore, further research is needed to overcome possible matrix effects to achieve better recoveries, however, to date, there are no commercially available testosterone-hydroxylated deuterated metabolites. The CV observed in intra- and inter-day determinations were less than 7.1%, which reflects adequate repeatability. Likewise, control charts for the analytes were performed at six months that showed values within the acceptable limits (± 2 SD), reflecting the stability of testosterone and its metabolites, and confirmed the repeatability of the method. A finding that supports the results of this study, is that under the experimental conditions developed in this study, human urine testosterone levels are

similar to those previously reported by GC-MS [27,30] and LC-MS methods [17,20].

It is well known that the analysis of testosterone and other steroids in urine is typically accompanied by interference, as determined by using different techniques [20,27,31,32]. In our work, these interferences were detected by comparing the slope values from the calibration curves individually constructed for urine from five different individuals or for methanol and showed a CV higher than 10% [31]. To correct the matrix effects, a single lot of SFHU (10 individuals) was prepared and, calibration curves for spiked steroid samples were constructed. This strategy allowed us to virtually eliminate the matrix effects since the CV dramatically decreased to < 3%. These results are in agreement with those reported by Matuszewski [31] for the bioanalysis of different analytes by HPLC-MS. Because matrix interferences were corrected using SFHU in the calibration graphics, 6-DHT was used as the IS to evaluate the repeatability of the method for both standards and samples.

In this study, 6-DHT was selected as the IS since it is a common metabolic product from testosterone *in vitro* assays using rat liver microsomes [33,34]. The detection of 6-DHT in human urine has been only possible at low levels after alkaline treatment of samples containing cysteinyl conjugates steroids [14]. Here, 6-DHT was not detected in human urine samples before or after the enzymatic assay using β -glucuronidase/sulfatase from *H. pomatia*. This compound is very stable, and while its chemical structure and molecular mass are similar to other testosterone-hydroxylated metabolites, it did not coelute with the other compounds (t_{ret} 7.48 min). Based on the physicochemical properties of analytes determined in this study, an excellent alternative as IS instead of 6-DHT could be a testosterone-hydroxylated deuterated metabolite, but at this time there are no commercially available anyone of them.

In the present study, we demonstrated that testosterone-hydroxylated metabolites are eliminated as glucuronide and sulfate conjugates since after the enzymatic hydrolysis using β -glucuronidase/sulfatase their formation pronouncedly increased. These results highlight the importance of adding also sulfatase to the enzymatic assay for the hydrolysis of testosterone-hydroxylated sulfate conjugates to avoid their underestimation. For the analysis of testosterone metabolites in human urine, some authors recommended the use of β -glucuronidase from *E. coli* during sample preparation to avoid an increased ratio of testosterone/epitestosterone and the formation of 4-AD [27,29,35]. These increases were attributed to the enzymatic activity of the 3 β -hydroxy- Δ^5 -steroid-dehydrogenase and the steroid- Δ -isomerase in *H. pomatia* juice. There is no information available regarding whether *H. pomatia* juice contains side enzyme activities that modify the formation of testosterone-hydroxylated metabolites. Therefore, it is possible to assume that the levels of testosterone-hydroxylated metabolites determined in this study were only the result of the CYP-dependent testosterone metabolism in the liver.

The analysis of human urine samples using the developed and validated experimental conditions in this study shows the presence of seven testosterone-hydroxylated metabolites, AD, and testosterone in young (25–30 years) and older (50–75 years) men. These metabolites include α - and β -hydroxylated isomers at different positions of the steroidal ring. The major metabolite determined in both age groups was 6 β -OHT, which is in agreement with *in vitro* studies that assessed the increased catalytic action of CYP3A4 to metabolize endogen steroids and xenobiotics [9,10,36]. These results support the hypothesis that 6 β -OHT may be used as a marker of hepatic CYP3A4 *in vivo*, similar to *in vitro* studies [10,11]. Likewise, CYP3A4 also plays a major role in 6 β -hydroxylation of progesterone and cortisol [36,37] and catalyzes 16 α -hydroxylation of other steroids such as progesterone, pregnenolone, DHEA, and E_1 . All together results confirm that the CYP3A4 is the main isoform in 6 β -hydroxylation of steroids in humans, but in the case of 16 α -OHT formation, CYP2B6, 2C8, and 2C19 may be more important. In contrast, in rats, the 16 α -hydroxylation of testosterone is attributed

mainly to CYP2C11, a male-specific isoform which plays a role in the 6 α -OHT/16 α -OHT ratio, and has been used as an indicator of endocrine disruption when is altered by a xenobiotic [34,38]. 16 β -OHT was another important metabolite detected in both groups, and its formation is mainly attributed to CYP2B6, 3A4 and 3A7 activity [5,9]. CYP3A4 also has strong activity for the formation of 2 β -OHT and 15 β -OHT; however, in this study, 15 β -OHT and 11 β -OHT were shown as minor testosterone metabolites, which is in agreement to *in vitro* studies [5]. AD was another metabolite detected in human urine samples; its formation is from testosterone dehydrogenation, which is mainly catalyzed by CYP2D6 and 2C19, and HDS17 β 2. This reaction contributes to the pool of androgen precursors within the body and constitutes a salvage pathway for AD [11]. The present information gives insight into the testosterone catabolism and reflexes the difficulty in predicting which CYP isoform is mainly responsible for the formation of each metabolite *in vivo*. However, these findings clearly also show that testosterone-hydroxylated metabolites should not be excluded when assessing testosterone balance, because its catabolism is CYP-dependent, and a change in its biotransformation profile may be potentially useful as a biomarker of androgen status.

Increases in the rate of testosterone biotransformation due to internal and external factors are associated with an increase in the rate of elimination and may result in an imbalance of testosterone that varies from subject to subject and population to population [9,10]. To date, there are no reports on the determination of testosterone-hydroxylated metabolites in human urine. An important finding in this study is that the profile of testosterone-hydroxylated metabolites testosterone seems to show an age-dependent change. It has been reported that older men have lower levels of testosterone than young men due to the lower production by Leydig cells and increased biotransformation to E_2 by aromatase [5], and results support this statement. However, a complication to this asseveration is that physiologic changes may modify the function of CYP-dependent enzyme activities [9]. Therefore, more studies are needed to elucidate the metabolism of testosterone by different CYP isoforms to predict their contributions to *in vivo* metabolism as well as on its biosynthesis. In the same sense, it is important to increase the number of individuals to clarify the apparent decrease in most of these metabolites to characterize the metabolic pattern of testosterone-hydroxylated metabolites. Likewise, the chemical perturbation on liver CYP expression may influence the subsequent testosterone catabolism with possible sexual homeostatic consequences. Exposure to xenobiotics that induce CYP expression may enhance the overall clearance of testosterone. Compounds such as ketoconazole, endosulfan, and DDT, to name a few differentially modulate hepatic CYP expression with varying effects on the profile of testosterone metabolites in *in vitro* and *in vivo* studies [34,39–41]. All observations together suggest that more definitive studies are needed to determine the profile hydroxylated-testosterone metabolites in humans in different physiological conditions.

The urinary steroid profile is composed of various endogenously produced steroidal hormones, including their precursors and metabolites [29]. The results of this study showed that the testosterone-hydroxylated metabolites could represent a significant proportion of testosterone elimination products; therefore, further investigation is needed to predict their relative contributions to some illnesses, such as angiotensin II-induced hypertension, associated cardiac hypertrophy, renal dysfunction, oxidative stress [42], prostate cancer [4] or endocrine disruption [34]. The analytical method described in this study could be of great help to achieve this purpose, in a similar manner as the urinary 6 β -hydroxycortisol level has been used as a non-invasive clinical marker of basal expression and induction of CYP3A4 in human exposed to DDT [43,44].

5. Conclusion

In summary, we developed and validated a highly sensitive and

specific UPLC-MS method for quantifying testosterone-hydroxylated metabolites in human urine. The relevance of these testosterone-hydroxylated metabolites is that they appear to be the testosterone metabolites profile analysis in the urine, therefore, they should not be underestimated. The pretreatment of the urine samples, as well as the ionization and detection parameters of the analytes on the UPLC-MS system, were optimized. Finally, this is the first method applied to determine testosterone-hydroxylated metabolites in human urine obtained from healthy men of varying ages. It can also be useful in studies on testosterone-dependent physiopathologies due to liver metabolism, reproductive health, hormonal concerns, behavior, and toxicology.

CRediT authorship contribution statement

Derly Constanza Escobar-Wilches: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Visualization, Writing - review & editing. **Arianna Ventura-Bahena:** Methodology, Conceptualization, Validation, Formal analysis. **Ma. de Lourdes López-González:** Conceptualization, Resources, Methodology, Validation, Writing - review & editing. **Luisa Torres-Sánchez:** Validation, Formal analysis, Investigation, Visualization, Writing - review & editing. **Mario Figueroa:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Visualization, Supervision, Writing - review & editing, Funding acquisition. **Adolfo Sierra-Santoyo:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Visualization, Supervision, Writing - review & editing, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was partially supported by grants from CONACYT (grant numbers CB-168384, -236564, -140482), INFRA (grant number 252226), and UNAM-DGAPA (IA205017).

References

- [1] V. Stanišić, D.M. Lonard, B.W. O'Malley, Modulation of steroid hormone receptor activity, *Prog. Brain Res.* 181 (2010) 153–176, [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)81009-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)81009-6).
- [2] S. Bhasin, Testicular disorders, in: S. Melmed, K.S. Polonsky, P.R. Larsen, H.M. Kronenberg (Eds.), *Williams Textb. Endocrinol. E-B. eleventh ed.*, Elsevier Health Sciences, 2008, p. 1936.
- [3] F. Ponzetto, F. Mehl, J. Boccard, N. Baume, S. Rudaz, M. Saugy, R. Nicoli, Longitudinal monitoring of endogenous steroids in human serum by UHPLC-MS/MS as a tool to detect testosterone abuse in sports, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 705–719, <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9185-1>.
- [4] S.M. Green, E.A. Mostaghel, P.S. Nelson, Androgen action and metabolism in prostate cancer, *Mol. Cell. Endocrinol.* 360 (2012) 3–13, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.046>.
- [5] K. Monostory, Z. Dvorak, Steroid regulation of drug-metabolizing cytochromes P450, *Curr. Drug Metabol.* 12 (2011) 154–172, <https://doi.org/10.2174/138920011795016854>.
- [6] H.V. Heemers, D.J. Tindall, Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex, *Endocr. Rev.* 28 (2007) 778–808, <https://doi.org/10.1210/er.2007-0019>.
- [7] D.J. Waxman, D.P. Lapenson, T. Aoyama, H.V. Gelboin, F.J. Gonzalez, K. Korzekwa, Steroid hormone hydroxylase specificities of eleven cDNA-expressed human cytochrome P450s, *Arch. Biochem. Biophys.* 290 (1991) 160–166, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90602-F](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90602-F).
- [8] D.B. Gower, Analysis of androgens and their derivatives, in: H.L.J. Makin, D.B. Gower (Eds.), *Steroid Anal.* Springer Netherlands, Dordrecht, 2010, pp. 457–558, <https://doi.org/10.1023/b135931.6>.
- [9] T. Niwa, Y. Yabasaki, K. Honma, N. Matsuo, K. Tatsuta, F. Ishibashi, M. Katagiri, Contribution of human hepatic cytochrome P450 isoforms to regioselective hydroxylation of steroid hormones, *Xenobiotica* 28 (1998) 539–547, <https://doi.org/10.1080/004982598239290>.
- [10] K.A. Usmani, R.L. Rose, E. Hodgson, Inhibition and activation of the human liver microsomal and human cytochrome P450 3A4 metabolism of testosterone by deployment-related chemicals, *Drug Metab. Dispos.* 31 (2003) 384–391 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12642463> accessed December 11, 2017.
- [11] D.J. Waxman, C. Attisano, F.P. Guengerich, D.P. Lapenson, Human liver microsomal steroid metabolism: identification of the major microsomal steroid hormone 6 β -hydroxylase cytochrome P-450 enzyme, *Arch. Biochem. Biophys.* 263 (1988) 424–436, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(88\)90655-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90655-8).
- [12] H.M. Choi, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum, Characterization of testosterone 11 β -hydroxylation catalyzed by human liver microsomal cytochromes P450, *Drug Metab. Dispos.* 33 (2005) 714–718, <https://doi.org/10.1124/dmd.104.003327>.
- [13] S. Tachibana, M. Tanaka, Simultaneous determination of testosterone metabolites in liver microsomes using column-switching semi-microcolumn high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.* 295 (2001) 248–256, <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5223>.
- [14] A. Fabregat, O.J. Pozo, J. Marcos, J. Segura, R. Ventura, Quantification of testosterone and metabolites released after alkaline treatment in human urine, *Drug Test. Anal.* 2 (2010) 630–636, <https://doi.org/10.1002/dta.227>.
- [15] A. Ereño Artabe, A. González-Gago, A. Suarez Fernández, J. Pitarch Motellón, A.F. Roig-Navarro, O.J. Pozo, P. Rodríguez-González, J.I. García Alonso, Isotope dilution LC-ESI-MS/MS and low resolution selected reaction monitoring as a tool for the accurate quantification of urinary testosterone, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 163 (2019) 113–121, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.09.038>.
- [16] P. Caron, V. Turcotte, C. Guillemette, A chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous profiling of ten endogenous steroids, including progesterone, adrenal precursors, androgens and estrogens, using low serum volume, *Steroids* 104 (2015) 16–24, <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.07.009>.
- [17] T. Koal, D. Schmiederer, H. Pham-Tuan, C. Röhring, M. Rauh, Standardized LC-MS/MS based steroid hormone profile-analysis, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 129 (2012) 129–138, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.12.001>.
- [18] M. Gust, E. Vulliet, B. Giroud, F. Garnier, S. Couturier, J. Garric, T. Buronfosse, Development, validation and comparison of LC-MS/MS and RIA methods for quantification of vertebrates-like sex-steroids in prosobranch molluscs, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010) 1487–1492, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.03.046>.
- [19] E. Kalogera, C. Pistos, X. Provatopoulou, S. Athanaselis, C. Spiliopoulou, A. Gounaris, Androgen glucuronides analysis by liquid chromatography tandem-mass spectrometry: could it raise new perspectives in the diagnostic field of hormone-dependent malignancies? *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 940 (2013) 24–34, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.09.022>.
- [20] R. Gonzalo-Lumbreras, D. Pimentel-Trapero, R. Izquierdo-Hornillos, Development and method validation for testosterone and epitestosterone in human urine samples by liquid chromatography applications, *J. Chromatogr. Sci.* 41 (2003) 261–265, <https://doi.org/10.1093/chromsci/41.5.261>.
- [21] J. Marcos, O.J. Pozo, Current LC-MS methods and procedures applied to the identification of new steroid metabolites, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 162 (2016) 41–56, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.12.012>.
- [22] T. Zhang, D. Tamae, C. Mesaros, Q. Wang, M. Huang, I.A. Blair, T.M. Penning, Simultaneous quantitation of nine hydroxy-androgens and their conjugates in human serum by stable isotope dilution liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 165 (2017) 342–355, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.08.001>.
- [23] L.M. Baker, L.S. Clesceri, G.A. E. A.D. Eaton (Eds.), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 1998, p. 1 Washington, D.C..
- [24] C.A. Strott, Steroid sulfotransferases, *Endocr. Rev.* 17 (1996) 670–697, <https://doi.org/10.1210/edrv-17-6-670>.
- [25] M.L. Johnson, D.L. Ely, M.E. Turner, Steroid sulfatase and the Y chromosome hypertensive locus of the spontaneously hypertensive rat, *Steroids* 60 (1995) 681–685, [https://doi.org/10.1016/0039-128X\(95\)00091-4](https://doi.org/10.1016/0039-128X(95)00091-4).
- [26] D. Wang, M. Zhang, Rapid quantitation of testosterone hydroxyl metabolites by ultra-performance liquid chromatography and mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 855 (2007) 290–294, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.05.022>.
- [27] J.Y. Moon, W. Kwon, S. Suh, J.C. Cheong, M.K. In, B.C. Chung, J.Y. Kim, M.H. Choi, Reference ranges for urinary levels of testosterone and epitestosterone, which may reveal gonadal function, in a Korean male population, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 140 (2014) 100–105, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.12.001>.
- [28] P. Van Renterghem, P. Van Eenoo, H. Geyer, W. Schänzer, F.T. Delbecke, Reference ranges for urinary concentrations and ratios of endogenous steroids, which can be used as markers for steroid misuse, in a Caucasian population of athletes, *Steroids* 75 (2010) 154–163, <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2009.11.008>.
- [29] U. Marek, H. Geyer, G. Opfermann, M. Thevis, W. Schänzer, Factors influencing the steroid profile in doping control analysis, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 877–891, <https://doi.org/10.1002/jms.1457>.
- [30] D. Martínez-Brito, M.T. Correa Vidal, X. de la Torre, V. García-Mir, O. Ledea Lozano, M. Granda Fraga, Reference ranges for the urinary steroid profile in a Latin-American population, *Drug Test. Anal.* 5 (2013) 619–626, <https://doi.org/10.1002/dta.1448>.
- [31] B.K. Matuszewski, Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 830 (2006) 293–300, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.11.009>.
- [32] A. Van Eckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, Y. Michotte, Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 2198–2207, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.01.003>.
- [33] D.J. Waxman, P.A. Ram, G. Notani, G.A. LeBlanc, J.A. Alberta, J.J. Morrissey, S.S. Sundseth, Pituitary regulation of the male-specific steroid 6 β -hydroxylase P-450 2a (gene product HIA2) in adult rat liver. Suppressive influence of growth

- hormone and thyroxine acting at a pretranslational level, *Mol. Endocrinol.* 4 (1990) 447–454, <https://doi.org/10.1210/mend-4-3-447>.
- [34] V.S. Wilson, G.A. Leblanc, The contribution of hepatic inactivation of testosterone to the lowering of serum testosterone levels by ketoconazole, *Toxicol. Sci.* 54 (2000) 128–137, <https://doi.org/10.1093/toxsci/54.1.128>.
- [35] T. du Toit, L.M. Bloem, J.L. Quanson, R. Ehlers, A.M. Serafin, A.C. Swart, Profiling adrenal 11 β -hydroxyandrostenedione metabolites in prostate cancer cells, tissue and plasma: UPC2-MS/MS quantification of 11 β -hydroxytestosterone, 11keto-testosterone and 11keto-dihydrotestosterone, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 166 (2017) 54–67, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.06.009>.
- [36] H. Yamazaki, T. Shimada, Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.* 346 (1997) 161–169, <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0302>.
- [37] C. Ged, J. Rouillon, L. Pichard, J. Combalbert, N. Bressot, P. Bories, H. Michel, P. Beaune, P. Maurel, The increase in urinary excretion of 6 beta-hydroxycortisol as a marker of human hepatic cytochrome P450III α induction, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 28 (1989) 373–387, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1989.tb03516.x>.
- [38] J.T. Sanderson, The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals, *Toxicol. Sci.* 94 (2006) 3–21, <https://doi.org/10.1093/toxsci/ktf051>.
- [39] A. Sierra-Santoyo, M. Hernández, A. Albores, M.E. Cebrián, DDT increases hepatic testosterone metabolism in rats, *Arch. Toxicol.* 79 (2005) 7–12, <https://doi.org/10.1007/s00204-004-0603-y>.
- [40] M.P. Gunderson, G.A. Leblanc, L.J. Guillette, Alterations in sexually dimorphic biotransformation of testosterone in juvenile American alligators (*Alligator mississippiensis*) from contaminated lakes, *Environ. Health Perspect.* 109 (2001) 1257–1264, <https://doi.org/10.1289/ehp.011091257>.
- [41] V.S. Wilson, G.A. Leblanc, Endosulfan elevates testosterone biotransformation and clearance in CD-1 mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 148 (1998) 158–168, <https://doi.org/10.1006/taap.1997.8319>.
- [42] A.K. Pingili, S. Thirunavukkarasu, M. Kara, D.D. Brand, A. Katsurada, D.S.A. Majid, L.G. Navar, F.J. Gonzalez, K.U. Malik, 6 β -hydroxytestosterone, a cytochrome P450 1B1-testosterone-metabolite, mediates angiotensin II-induced renal dysfunction in male mice, *Hypertension* 67 (2016) 916–926, <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06936>.
- [43] C.F.B. Nhachi, R. Loewenson, Comparison study of the sensitivities of some indices of DDT exposure in human blood and urine, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43 (1989) 493–498, <https://doi.org/10.1007/BF01701925>.
- [44] A. Poland, D. Smith, R. Kuntzman, M. Jacobson, A.H. Conney, Effect of intensive occupational exposure to DDT on phenylbutazone and cortisol metabolism in human subjects, *Clin. Pharmacol. Ther.* 11 (1970) 724–732, <https://doi.org/10.1002/cpt1970115724>.