

Resum

Els esteroides anabolitzants androgènics (AAS) són compostos sintètics que mimetitzen l'efecte que produeix la testosterona, androgen endogen.

Aquest tipus de compostos s'utilitzen per l'augment del rendiment físic en esportistes o per l'augment de la producció de carn en l'àmbit de la ramaderia. Aquest tipus de pràctiques estan regulades i prohibides per diferents organismes tant governamentals com esportius.

En aquesta tesi doctoral es detalla informació sobre els AAS respecte la seva història, fisiologia, mode d'acció, efectes, legislació i problemàtica, així com, tècniques d'anàlisi basades en cromatografia.

El propòsit d'aquesta tesi doctoral ha sigut el desenvolupament de noves metodologies basades en receptors selectius per a la determinació de diferents AAS en matris biològiques. Es descriuen el desenvolupament i l'aplicació de diferents tècniques immunoquímiques (ELISA i Immunosorbents) per la determinació de Estanozolol, Boldenona i Metilboldenona en orina bovina. Així com es desenvolupa un ELISA per la determinació de la Tetrahidrogestronina, THG, un nou anabolitzant de disseny que va ser sintetitzat per no ser detectat. També es descriu el desenvolupament d'un nou tipus de receptors sintètics, els MIPs, selectius per Testosterona i Boldenona.



Tesi doctoral

Juan Pablo Salvador Vico

2007

Estratègies Analítiques per a la Detecció d'Hormones Anabolitzants Basades en l'Ús de Receptors Específics



Juan Pablo Salvador Vico

Barcelona 2007



**Departament de Química Orgànica
Facultat de Química
Universitat de Barcelona**



**Institut d'Investigacions
Químiques i Ambientals de
Barcelona**



**Grup de Receptors Moleculars Aplicats
Departament de Química Orgànica
Biològica**

Estratègies Analítiques per a la Detecció d'Hormones Anabolitzants Basades en l'Ús de Receptors Específics

Memòria presentada per optar al títol de Doctor en Química per

Juan Pablo Salvador Vico

Universitat de Barcelona
Departament de Química Orgànica

Programa de Doctorat de Química Orgànica
(Bienni 1999-2001)

Estratègies Analítiques per a la Detecció d'Hormones
Anabolitzants Basades en l'Ús de Receptors Específics

Memòria presentada per optar al títol de Doctor en Química per

Juan Pablo Salvador Vico

Directors:

Dra. M^a Pilar Marco Colás
Investigador
Dept. Química Orgànica Biològica
Institut de Investigacions
Químiques i Ambientals
Josep Pascual Vila – CSIC

Tutor:

Dr. Anna Grandas Sagarra
Professor Titular
Dept. Química Orgànica
Facultat de Química
Universitat de Barcelona

Dr. Francisco Sánchez Baeza
Científic Titular
Dept. Química Orgànica Biològica
Institut de Investigacions
Químiques i Ambientals.
Josep Pascual Vila – CSIC

Agraïments

Bueno, bueno. Por fin llegan los acknowledgments. Estas líneas están dedicadas a aquellos que siempre han estado a mi lado y que me han apoyado tanto a nivel personal como profesional (tópico en el que siempre caemos).

Primero de todo quiero agradecer a mis directores de tesis, la Dra. M.-Pilar Marco y el Dr. Francisco Sánchez Baeza. A ellos les debo mi máxima gratitud por haber confiado en mí desde el primer momento, los cuales hicieron una apuesta arriesgada ya que llegué con muchas ganas de hacer el doctorado pero sin ningún tipo de experiencia. Pilar, que te puedo contar, siempre has tenido la puerta abierta para mis interminables interrupciones y sobre todo has tenido la paciencia para ayudarme en todo lo que te pedía. Francisco, gracias por tu ayuda, sobre todo al principio, donde no tenía ni idea de como poner una reacción, y después, por confiar en mi criterio para dejarme andar solo. Gracias a los dos.

También al Dr. Francisco Camps, primero como Director del IIQAB por admitirme en en instituto, y, segundo, al Dr. Angel Messeguer, nuevo Director del IIQAB, y responsable de nuestra segunda casa, por haberse preocupado de mi tesis y por dejarme caer por el lab309 para degustar esos maravillosos pasteles de seminario.

A mi tutora en la Universidad de Barcelona, la Dra. Anna Grandas, la cual siempre me ha prestado toda la ayuda necesaria para los tediosos trámites de la defensa.

También quiero dar las gracias a los diferentes servicios de la casa que han facilitado el trabajo que se ha realizado. Por una parte al servicio de espectroscopia, con la Montse, la Lourdes y la Venci, por haberme ayudado con la RMN y el IR. Por otra parte al servicio de espectrometría de masas, con la Roser y la Dori en la que siempre han tenido tiempo para ayudarme con los equipos. Por supuesto no me puedo olvidar de Pepita Casas y el servicio de estabulario, los cuales han sufrido en sus propias carnes la animadversión que tengo con los animales. También a las secres del departamento, la Josefina y Àngels.

Quiero dar las gracias, también, a Toni Rubies, responsable del HPLC-MS/MS de la Agencia de Salud Pública de Barcelona, por haberme enseñado los secretos del equipo, así como al Dr. Francesc Centrich por permitirme utilizar el equipo y realizar parte de este trabajo en sus instalaciones.

Durante esta tesis, realicé una estancia en la Lehrstuh für Zell Biologie de la Technische Universität of München. Me gustaría agradecer en primer lugar al Prof. Bethold Hock y especialmente al Dr. Karl Kramer, por haberme acogido en su laboratorio y trabajar con él. Tampoco puedo olvidarme de Karol, Andrea y Julia, mis niñas alemanas, con las que

se me hizo amena mi estancia en el laboratorio. Tampoco puedo olvidarme de Ralph, Georg y Bastian, mis compañeros de farras por Freising. También a la gente española que conocí allí, a Miguel, Ainhoa y Edurne, con los que pasamos buenos ratos y muchas risas.

Bueno llegamos a la casa número 2, el lab 309. Primero tengo que empezar con los clásicos, a la Isabel, al Marc, a la Maia, a Su y especialmente a la Anna, compañera incansable de pitis. También un agradecimiento especial a Núria, por esa incansable sonrisa, a Jordi Escabrós, compañero de papeleo y a Quim, compañero de cursos y que siempre que he necesitado algo del lab me ha ayudado en todo lo que podía. No me puedo olvidar de los que han llegado más tarde y no tuve el placer de coincidir, como la Noemí, el Raúl, la Annita, la Sandra y la Gloria.

Y como casa número 1, los Eliseros. No me puedo olvidar de la gente que ha pasado por aquí y que luego nos a dejado, como la Núria Sanvicens, coincidimos poco, pero su coraje a la hora de trabajar me impresionó mucho. Y para coraje, la Mika, nuestra búlgara particular, currante como la que más, con la cual nos echamos unas risas con las sirenas y demás tonterías. A Manu, nuestra italiana particular, por sus recetas de rica pasta y el tiramisú. Como no, también a Mark, nuestro irlandés, de él debo agradecer su paciencia con nuestro inglés, y los buenos momentos que hemos pasado tanto de fiesta como en el laboratorio.

No me puedo olvidar con los actuales miembros del AMRg con los que he compartido la rutina diaria del curro, y todos ellos súper trabajadores. A Roger, actual compi de despacho, por su ayuda en el lab, y uno de los que más me ayudó al llegar al grupo. A Heक्टर, con el que compartí mucho tiempo de trabajo. A Dani, un buen compañero, con el que hemos compartido juntos muchas discusiones científicas (entre pitis, claro). A Javi, por su capacidad de trabajo y consecuente con sus principios. A Xavi, con su capacidad de trabajo mayor de la que él se cree, ánimo. A Eva por la fuerza de voluntad que desprende. A Raquel por su paciencia en el trabajo diario. A Núria y Alex, que han continuado el trabajo que comencé, y que están empezando su carrera en la investigación, suerte!. Y a Fátima, que acaba de llegar al grupo y le deseo todo lo mejor. También, no me puedo dejar a Begoña, con la que ha participado activamente en este trabajo con los ELISAs y IAC, gracias guapa. Y muy especialmente a Mari Carmen, con la que he compartido muchísimo tiempo en el lab y nos hemos echado unas buenas risas (I konw, I konw...), casi ha sido como una segunda jefa para mí, te deseo lo mejor, y espero volver a vernos muy pronto cuando vuelvas. A todos ellos otra vez, formamos un buen grupo y espero que sigamos siempre así.

Tampoco puedo dejarme a mis colegas. Los de la facultad, a Eve, Sonia, Marc, Olga, Pereto y Gemma, por haber confiado siempre en mis posibilidades y interesarse por lo

que hacía. Durante muchos años compartimos los años de la uni, donde tuvimos muchas alegrías y algunas penas, pero lo mejor de todo es que todavía las seguimos compartiendo en esta nueva etapa que estamos empezando. A los colegas del Molina, a todos ellos, por esos buenos momentos que pasamos cuando necesitábamos salir de la rutina diaria. El fin de semana siempre ha sido nuestra escapatoria. Muy especialmente a Amable, Luis, Ricard y Carlos, con los que he crecido desde que éramos unos críos que jugábamos a pelota en el cole y en el callejón. Por último, al Alberto y a la Laia, unos buenos amigos que sé que siempre los tendré a mi lado. A todos ellos, Gracias;

A mi segunda familia. Al Joan y a la Alegria, los cuales me han recibido en su seno como a uno más de ellos. También han participado en la redacción de esta tesis y me han enseñado a luchar por algo más que en lo personal.

Y, finalmente, a mi familia. Con ellos he aprendido los valores más importantes que se puede aprender en la vida, como la estima, el respeto mutuo y el trabajo bien realizado. Siempre han confiado en mí, aunque no han entendido mucho lo que he estado haciendo, a ellos les debo todo lo que soy.

Y como no, a mi mejor amiga, compañera y mujer. A Lali, ha sido mi sustento y lo que da sentido a todo lo que hago. Paciente conmigo y siempre a mi lado. Todas estas páginas están dedicadas a tí, tú sabes lo ha costado y el sacrificio que a veces a representado. Ahora empezamos una nueva etapa juntos y espero que seamos igual de felices como hemos sido hasta ahora. Gracias y dedicado a tí, te quiero;

Gracias a todos!!!

Com llegir aquesta tesi?

Amb aquest tesi doctoral s'adjunta un CD amb una còpia de la tesi en format PDF. També s'inclouen uns documents adjunts que poden ser d'utilitat per al lector. Durant la lectura de la tesi, es trobaran paraules o frases les quals estan subratllades, i que indiquen, que contenen un hipervincle que pot anar a una pàgina web, document PDF o vídeo. Per aquest motiu s'inclou el CD on buscant la pàgina on està l'hipervincle podreu prémer i a continuació es mostrarà la informació que ve adjuntada.

Aquesta tesi doctoral està organitzada en diferents blocs. Una introducció, que correspon al capítol 1, uns resultats i discussió, que estan inclosos als capítols 2-6, un capítol corresponent a materials i mètodes al capítol 9 on aquesta part està recolzada amb un annex on s'inclou la caracterització dels productes de síntesi. A més s'inclouen uns apèndixs que corresponen a experiments relacionats amb la tesi doctoral (capítols 7-8). Finalment, es trobaran les conclusions del treball realitzat durant aquest període.

Espero que sigui d'utilitat.

1	Introducció.....	1
1.1	Hormones anabolitzants	1
1.1.1	Descripció estructural	1
1.1.2	Antecedents de les hormones anabolitzants.....	3
1.1.3	Fisiologia i mecanismes d'acció dels AAS.....	7
1.1.3.1	<i>Fisiologia de la testosterona</i>	<i>7</i>
1.1.3.2	<i>Receptor androgènic</i>	<i>9</i>
1.1.3.3	<i>Mecanisme d'acció.....</i>	<i>11</i>
1.1.4	Efecte anabolitzant i androgènic.....	12
1.1.5	Formes d'administració	13
1.1.6	Efectes adversos.....	14
1.1.7	Metabolisme i excreció dels AAS.....	15
1.1.7.1	<i>Metabolisme en Fase I.....</i>	<i>15</i>
1.1.7.2	<i>Metabolisme en Fase II.....</i>	<i>18</i>
1.1.8	Aplicacions dels AAS.....	19
1.1.8.1	<i>Utilització terapèutica.....</i>	<i>19</i>
1.1.8.2	<i>Utilització inadequada dels AAS en la ramaderia: problemàtica i legislació 20</i>	
1.1.8.2.1	<i>Problemàtica mediambiental i de salut pública.....</i>	<i>22</i>
1.1.8.2.2	<i>Legislació dels AAS a la ramaderia</i>	<i>23</i>
1.1.8.3	<i>Utilització inadequada dels AAS en l'àmbit esportiu: regulacions ...</i>	<i>26</i>
1.1.8.3.1	<i>Historia dels anabolitzants en el camp dels esports</i>	<i>26</i>
1.1.8.3.2	<i>Control antidopatge.....</i>	<i>29</i>
1.1.8.4	<i>Utilització dels AAS per esportistes no professionals.....</i>	<i>30</i>
1.1.8.5	<i>Utilització i regulació dels AAS en cavalls de competició.....</i>	<i>31</i>
1.1.9	Tècniques analítiques emprades per la detecció d'AAS.....	32
1.1.9.1	<i>Matrius</i>	<i>32</i>
1.1.9.2	<i>Tractament de mostra</i>	<i>32</i>
1.1.9.3	<i>Mètodes d'anàlisi.....</i>	<i>33</i>
1.2	Tècniques basades en la utilització de receptors específics	36
1.2.1	Receptors d'origen biològic.....	37
1.2.1.1	<i>L'anticòs.....</i>	<i>37</i>
1.2.1.2	<i>Tècniques immunoquímiques</i>	<i>40</i>
1.2.1.2.1	<i>ELISA</i>	<i>41</i>
1.2.1.2.2	<i>Cromatografia d'immunoafinitat</i>	<i>42</i>
1.2.1.2.3	<i>Immunosensors</i>	<i>43</i>
1.2.1.3	<i>Avantatges i limitacions de les tècniques immunoquímiques.....</i>	<i>43</i>
1.2.1.4	<i>Tècniques immunoquímiques utilitzades per AAS.....</i>	<i>44</i>
1.2.2	Receptors de tipus sintètic	46
1.2.2.1	<i>Polímers d'empremta molecular.....</i>	<i>46</i>
1.2.2.2	<i>Aplicacions dels MIPS.....</i>	<i>48</i>
1.2.2.3	<i>Utilització dels MIPS per la detecció de AAS.....</i>	<i>49</i>
1.3	Projecte RaDAR	50
1.4	Objectius	51
2	Disseny i síntesi d'haptens per hormones anabolitzants	53

2.1	Disseny d'haptens d'immunització	53
2.1.1	Disseny d'haptens per boldenona i metilboldenona.....	55
2.1.2	Dissenys d'haptens per l'estanozolol i els metabòlits.....	57
2.1.3	Disseny de l'haptè de la tetrahydrogestrinona.....	58
2.2	Síntesi dels haptens per hormones anabolitzants	60
2.2.1	Haptens d'immunització per estanozolol.....	61
2.2.1.1	<i>Síntesi de l'haptè tipus A d'estanozolol: Estratègia 1</i>	61
2.2.1.2	<i>Síntesi de l'haptè tipus A d'estanozolol: Estratègia 2</i>	62
2.2.1.2.1	Síntesi del 17-NorSt.....	62
2.2.1.2.2	Preparació de l'haptè A d'estanozolol a partir de NorSt.....	63
2.2.1.3	<i>Haptè de tipus B d'estanozolol</i>	64
2.2.1.3.1	Alquilació de N2' de l'estanozolol.....	64
2.2.2	Haptens d'immunització per Boldenona i Metilboldenona.....	66
2.2.2.1	<i>Haptè de tipus A per Boldenona</i>	66
2.2.2.2	<i>Haptè B de Metilboldenona</i>	66
2.2.3	Haptens d'immunització per la Tetrahydrogestrinona.....	68
2.2.3.1	<i>Síntesi de la Tetrahydrogestrinona</i>	68
2.2.3.2	<i>Síntesi de l'haptè de tetrahydrogestrinona</i>	70
2.3	Disseny i síntesi de competidors	71
2.3.1	Competidors dels haptens d'estanozolol.....	72
2.3.2	Competidors dels haptens de boldenona i metilboldenona.....	72
2.3.2.1	<i>Síntesi de l'haptè A de testosterona</i>	73
2.3.2.2	<i>Síntesi de l'haptè B de Boldenona</i>	73
2.3.3	Competidor per la tetrahydrogestrinona.....	73
2.3.3.1	<i>Síntesi de l'haptè de gestrinona</i>	73
2.4	Síntesi de la α-boldenona	74
2.4.1	Inversió de configuració de C17 de la boldenona.....	74
2.4.2	Hidròlisi de l'ester de o-nitrobenzoat de 17 α -boldenona.....	75
3	Preparació d'immunoreactius i obtenció d'anticossos policlonals per anabolitzants	79
3.1	Preparació dels immunògens	79
3.2	Preparació dels antigens de tapissat a BSA	81
3.3	Preparació dels traçadors enzimàtics a HRP	82
3.4	Determinació de la densitat d'haptè dels competidors de BSA i HRP	83
3.5	Model de conjugació de hA_St	86
3.6	Protocol d'immunització	88
3.6.1	Immunització homòloga: producció d'Ac per St, B, MB i THG.....	88
3.6.2	Immunització heteròloga: producció d'Ac per MB.....	88
3.7	Evolució del títol d'anticòs	89
4	Desenvolupament d'immunoassajos per a la determinació d'hormones anabolitzants	93
4.1	Desenvolupament d'un ELISA indirecte per la THG	95
4.1.1	Valoració de l'afinitat As168-170 pels AT hTHG-BSA i hG-BSA.....	96
4.1.2	Assaigs competitius indirectes per la THG.....	96
4.1.3	Optimització i avaluació de l'ELISA As170/hG-BSA per THG.....	98
4.1.3.1	<i>Efecte del Tween 20</i>	98

4.1.3.2	<i>Efecte del temps de preincubació i el temps de competència</i>	98
4.1.3.3	<i>Efecte del pH</i>	99
4.1.3.4	<i>Efecte de la conductivitat</i>	100
4.1.4	Especificitat de l'ELISA As170/hG-BSA.....	101
4.1.5	Estudis d'exactitud de l'ELISA optimitzat.....	103
4.1.6	Efecte dels dissolvents orgànics a l'assaig As170/hG_BSA.....	104
4.1.7	Sumari de l'ELISA As170/hG-BSA per THG.....	104
4.2	Desenvolupament d'immunoassaigs per St	106
4.2.1	Valoració de l'afinitat dels As145,147-149 pels AT(hA_St-BSA i hB_St-BSA) i pels TE (hA_St-HRP i hB_St-HRP).....	106
4.2.2	Assaigs competitiu pel St.....	107
4.2.3	Optimització i avaluació de l'ELISAs per St.....	109
4.2.3.1	<i>Efecte del Tween 20</i>	109
4.2.3.2	<i>Efecte del temps de preincubació i el temps de competència</i>	110
4.2.3.3	<i>Efecte del pH</i>	111
4.2.3.4	<i>Efecte de la conductivitat</i>	112
4.2.4	Especificitat dels assaigs per St.....	113
4.2.4.1	<i>Especificitat de l'assaig As145/hA_St-HRP</i>	114
4.2.4.2	<i>Especificitat de l'assaig As147/hB_St-BSA</i>	115
4.2.4.3	<i>Especificitat de l'assaig As147/hA_St-BSA</i>	116
4.2.4.4	<i>Efecte d'hormones endògenes sobre l'assaig As147/hB_St-BSA</i>	117
4.2.5	Estudis d'exactitud per la determinació de St.....	117
4.2.6	Efecte dels dissolvents orgànics a l'assaig.....	118
4.2.7	Condicions finals dels ELISAs per St.....	120
4.2.7.1	<i>ELISA As147/hB_St-BSA</i>	120
4.2.7.2	<i>ELISA As145/hA_St-HRP</i>	121
4.2.7.3	<i>ELISA As147/hA_St-BSA</i>	122
4.3	Desenvolupament d'immunoassaigs per B i MB	124
4.3.1	Estudi d'afinitat dels As138,140-143,153 amb els competidors a BSA i HRP.....	125
4.3.2	Desenvolupament d'assaigs pel reconeixement simultani de B i MB (hA_B-HCH).....	126
4.3.3	Desenvolupament d'assaigs per MB.....	127
4.3.3.1	<i>Immunització homòloga (hB_MB-HCH)</i>	127
4.3.3.2	<i>Immunització heteròloga</i>	128
4.3.3.2.1	<i>Efecte sobre l'especificitat de la immunització heteròloga</i>	129
4.3.3.2.2	<i>Anàlisi del comportament dels As heteròlegs en funció del competidor</i>	130
4.3.4	Optimització i avaluació dels ELISAs per B i MB.....	133
4.3.4.1	<i>Optimització i avaluació de l'assaig As141/hA_T-HRP</i>	133
4.3.4.2	<i>Optimització i avaluació de l'assaig As143/hB_B-HRP</i>	134
4.3.5	Especificitat dels assaigs per B i MB.....	135
4.3.5.1	<i>Especificitat de As141/hA_T-HRP per B</i>	136
4.3.5.2	<i>Especificitat de l'assaig As143/hB_B-HRP per MB</i>	136
4.3.6	Estudis d'exactitud per a la determinació de B i MB.....	137
4.3.7	Efecte dels dissolvents orgànics als assaigs As141/hA_T-HRP i As143/hB_B-HRP.....	138

4.3.8	Condicions finals dels ELISAs per B i MB i paràmetres dels assaigs.....	139
4.3.8.1	<i>ELISA per B As141/hA_T-HRP</i>	139
4.3.8.2	<i>ELISA per MB As143/hB_B-HRP</i>	140
5	Determinació d'anabolitzants en mostres biològiques mitjançant tècniques immunoquímiques.	143
5.1	Determinació immunoquímica de St i metabòlits en mostres biològiques	145
5.1.1	Mostres de sèrum humà.....	145
5.1.1.1	<i>Avaluació de l'efecte matriu del sèrum</i>	145
5.1.1.2	<i>Determinació de St en sèrum humà</i>	146
5.1.2	Mostres d'orina humana.....	148
5.1.2.1	<i>Avaluació de l'efecte matriu</i>	148
5.1.3	Mostres d'orina bovina.....	149
5.1.3.1	<i>Avaluació de l'efecte matriu</i>	149
5.1.3.2	<i>Desenvolupament d'un SPE-ELISA per la detecció de St i metabòlits en mostres d'orina bovina.</i>	150
5.1.3.2.1	<i>Desenvolupament i avaluació d'un procediment RP-SPE-ELISA utilitzant cartutxos C₁₈ Set-Pak®</i>	151
5.1.3.2.2	<i>Establiment d'un protocol HTS-C18-SPE-ELISA per a l'anàlisi de St en mostres d'orina bovina</i>	153
5.1.3.2.3	<i>Desenvolupament d'un protocol HTS-IS-SPE-ELISA per la detecció de St i metabòlits</i>	157
5.2	Determinació de B i MB en mostres d'orina bovina mitjançant IAC	168
5.2.1	Avaluació de la matriu.....	168
5.2.2	Preparació de l'immunosorbent.....	169
5.2.3	Caracterització dels IS. Optimització, de IS-SPE mitjançant mostres de PBS.	169
5.2.4	Efecte matriu de l'orina hidrolitzada per SPE-IS-ELISA per B i MB.....	170
5.2.5	Protocol general per a la determinació de B i MB mitjançant IS-ELISA..	171
5.2.6	Estudis d'exactitud per B i MB en orina amb el protocol SPE-IS-ELISA	172
5.2.7	Mesura de mostres reals de B i MB.....	173
5.3	Determinació de THG en mostres d'orina humana	175
5.3.1	Avaluació de l'efecte matriu.....	175
5.3.2	Avaluació d'un procediment d'extracció per eliminar l'efecte matriu.....	176
5.3.3	Estudis d'exactitud per la determinació de THG en orina humana.....	177
5.3.3.1	<i>Protocol general per a la determinació de THG en orina humana</i> ..	178
6	Disseny racional, preparació i avaluació de polímers d'empremta molecular per testosterona i boldenona	181
6.1	Modelatge molecular i càlculs teòrics	182
6.2	Estudis Experimentals per RMN	185
6.2.1	Experiments de valoració per RMN.....	185
6.2.2	Ajust de Job per RMN.....	188
6.3	Preparació del MIP per testosterona	189
6.4	Avaluació del MIP per testosterona	191
7	Apèndix I: Aproximació al desenvolupament d'un Microarray per a la detecció d'Atrazina.	195
7.1	Introducció	196

7.1.1	Utilització i problemàtica de l'Atrazina.....	196
7.1.2	Microarray amb anticossos	196
7.1.3	Estudis previs del grup.....	197
7.1.4	Objectius	198
7.2	Producció d'anticossos recombinants anti-Atrazina amb His₆-tag.....	198
7.2.1	Obtenció dels plàsmids	200
7.2.2	Digestió dels plàsmids amb BstEII i NcoI.....	201
7.2.3	Lligació i electroporació del His-tag als IPRi.....	202
7.3	Síntesi del derivat fluorescent: Cy3-EDA-Atr. (29).....	203
7.3.1	Síntesi de Cy3-EDA.....	204
7.3.2	Síntesi del Cy3-EDA-Atr.....	205
7.4	Immobilització dels Fab a un suport de vidre	206
7.4.1	Optimització dels paràmetres de immobilització.....	207
7.4.2	Estudis preliminars per desenvolupar un microarray.....	208
8	Apèndix II: Anàlisi cromatogràfic dels anabolitzants esteroidals.....	211
8.1	Condicions del LC-MS-MS	211
8.1.1	Ionització dels compostos	211
8.1.2	Comportament cromatogràfic	212
8.1.3	Recta de calibratge.....	215
8.2	Avaluació de la reactivitat creuada de l'IS As145.....	216
8.3	Avaluació de l'efecte matriu de l'orina bovina aplicant el protocol SPE-IS amb el LC-MS-MS	217
9	Materials i mètodes	221
9.1	Síntesi	221
9.1.1	Materials i instrumentació.....	221
9.1.1.1	<i>Cromatografia de gasos amb detector d'ionització de flama (GC-FID).</i>	222
9.1.1.2	<i>Espectrometria de masses</i>	223
9.1.1.3	<i>Càlculs teòrics i modelatge molecular.</i>	223
9.1.1.4	<i>Caracterització.</i>	223
9.1.2	Mètodes.....	223
9.1.2.1	<i>Síntesi dels haptens d'anabolitzants</i>	223
9.1.2.1.1	Haptens per Estanozolol	224
9.1.2.1.2	Haptè per testosterona.....	228
9.1.2.1.3	Haptens per Boldenona i Metilboldenona.....	229
9.1.2.1.4	Haptens per Tetrahydrogestrinona.....	231
9.1.2.2	<i>Síntesi de α-Boldenona</i>	232
9.1.2.3	<i>Preparació de l'amida hA_{St}-MTyr (26)</i>	233
9.2	Desenvolupament de ELISAs per anabolitzants	233
9.2.1	Materials i instrumentació.....	233
9.2.2	Reactius químics i immunoquímics	234
9.2.3	Tampons.....	235
9.2.4	Conjugació dels haptens a molècules transportadores	236
9.2.4.1	<i>Preparació dels immunògens pels haptens d'anabolitzants a HCH.</i>	236
9.2.5	Test de Bradford	237
9.2.6	Caracterització dels conjugats. Determinació de la densitat d'haptè.....	237

9.2.6.1	Densitat d'haptè dels conjugats a BSA	237
9.2.6.2	Densitat d'haptè dels conjugats a HRP	238
9.2.7	Obtenció dels anticossos policlonals específics	238
9.2.7.1	Protocol d'immunització	238
9.2.7.1.1	Immunització homòloga	239
9.2.7.1.2	Immunització heteròloga	239
9.2.7.2	Extracció de les sangs parcials. Avaluació del títol d'anticòs.	239
9.2.7.3	Obtenció de la sang total	240
9.2.8	Assaigs immunoenzimàtics no competitiu	241
9.2.8.1	Assaig no competitiu en format indirecte	241
9.2.8.1.1	Protocol general	241
9.2.8.1.2	Assaig monodimensional (1D) no competitiu	241
9.2.8.1.3	Assaig bidimensional (2D) no competitiu	242
9.2.8.2	Assaig no competitiu en format directe	242
9.2.8.2.1	Protocol general	242
9.2.8.2.2	Assaig 1D no competitiu	243
9.2.8.2.3	Assaig 2D no competitiu	243
9.2.9	Assaig immunoenzimàtics competitiu	243
9.2.9.1	Protocol general per a un ELISA en format directe	243
9.2.9.2	Protocol general per a un ELISA en format indirecte	244
9.2.9.3	Factors estudiats per a la optimització d'un assaig competitiu	245
9.2.9.3.1	Influència de la concentració de Tween 20 en l'assaig	245
9.2.9.3.2	Influència de la força iònica	245
9.2.9.3.3	Influència del temps de preincubació	245
9.2.9.3.4	Influència del temps de competència	245
9.2.9.3.5	Influència del pH	246
9.2.9.3.6	Influència dels dissolvents orgànics	246
9.2.9.4	Estudis d'especificitat dels ELISAs optimitzats	246
9.2.9.5	Estudis de precisió amb mostres dopades cegues	247
9.2.9.6	ELISAs optimitzats pel Estanozolol	247
9.2.9.6.1	Format directe As145/hA_St-HRP	247
9.2.9.6.2	Format indirecte As147/hB_St-BSA	247
9.2.9.6.3	Format indirecte As147/hA_St-BSA	248
9.2.9.7	ELISAs optimitzats per Boldenona i Metilboldenona.	248
9.2.9.7.1	Format directe As141/hA_T-HRP	248
9.2.9.7.2	ELISA directe As143/hB_B-HRP	248
9.2.9.8	ELISA optimitzat per Tetrahidrogestrinona	249
9.2.9.8.1	Format indirecte As170/hG-BSA	249
9.3	Desenvolupament de mètodes de preparació de mostres biològiques.	249
9.3.1	Materials i instrumentació	249
9.3.2	Estudis d'efecte matriu	250
9.3.3	Mètodes pel pretractament de mostres	250
9.3.3.1	Mostres de sèrum	250
9.3.3.1.1	Tractament del sèrum amb etanol	250
9.3.3.2	Mostres d'orina	251
9.3.3.2.1	Tractament de l'orina amb pentà	252
9.3.3.2.2	Tractament de l'orina amb diferent additiu	252

9.3.3.2.3	Hidròlisi de les orines	252
9.3.3.2.4	Extracció amb toluè	253
9.3.4	Desenvolupament de fases d'extracció selectiva (SPE) per l'anàlisi d'orines per ELISA	253
9.3.4.1	<i>Estudis d'efecte matriu i mesura amb els diferents ELISAs</i>	253
9.3.4.2	<i>Procediment C₁₈-Set-Pak® per la detecció d'estanozolol</i>	253
9.3.4.3	<i>Procediment C₁₈ Versaplate™, HTS-SPE(C₁₈) per la detecció d'estanozolol</i>	254
9.3.4.4	<i>Procediment IAC-SPE per a la detecció de boldenona i metilboldenona</i>	254
9.3.4.4.1	Preparació de l'immunosorbent	254
9.3.4.4.2	Avaluació de la desorció dels analits.	255
9.3.4.4.3	Procediment general de IAC-SPE.....	255
9.3.4.5	<i>Desenvolupament d'un procediment HTS-IAC-ELISA per a la detecció de estanozolol</i>	255
9.3.4.5.1	Preparació de l'immunosorbent.....	255
9.3.4.5.2	Preparació de les columnes mini-IAC	256
9.3.4.5.3	Avaluació de la desorció dels analits.....	256
9.3.4.5.4	Procediment general de HTS-SPE-IAC.....	257
9.4	Producció i avaluació de Polímers d'Empremta Molecular (MIPs).....	257
9.4.1	Materials i instrumentació.....	257
9.4.2	Experiments de RMN	258
9.4.2.1	<i>Valoració de l'afinitat per RMN</i>	258
9.4.2.1.1	Cribatge de potencials monòmers amb testosterona.....	258
9.4.2.1.2	Valoració per RMN de l'afinitat MAA i MAAM amb testosterona.	259
9.4.2.1.3	Determinació de l'estequiometria del complex per ajust del Job per RMN.	259
9.4.3	Preparació dels Polímers d'Empremta Molecular.....	259
9.4.4	Avaluació dels Polímers d'Empremta Molecular	260
9.4.4.1	<i>Rentat dels polímers produïts</i>	260
9.4.4.2	<i>Caracterització cromatogràfica (afinitat i selectivitat)</i>	260
9.5	Aproximació al desenvolupament d'un microarray amb RAc per atrazina.	261
9.5.1	Biologia Molecular	261
9.5.1.1	<i>Materials i instrumentació</i>	261
9.5.1.2	<i>Medi del cultiu bacterià</i>	261
9.5.1.3	<i>Extracció del DNA plasmídic</i>	262
9.5.1.4	<i>Digestió dels plàmid</i> s	262
9.5.1.5	<i>Electroforesis de DNA en gels d'agarosa</i>	262
9.5.1.6	<i>Extracció del DNA del gel d'agarosa</i>	263
9.5.1.7	<i>Lligació</i>	263
9.5.1.8	<i>Electroporació</i>	263
9.5.2	Síntesi de Cy3-EDA-haptè_Atrazina (29)	264
9.5.2.1	<i>Materials i instrumentació</i>	264
9.5.2.2	<i>Cy3-EDA (27)</i>	264
9.5.2.3	<i>Ester actiu de l'haptè d'atrazina (28)</i>	265

9.5.2.4	Cy3-EDA-Atr. (29).....	265
9.5.3	Immunoassaig sobre superfícies de vidre	265
9.5.3.1	Material i equips	265
9.5.3.2	Protocol general de funcionalització de les superfícies de vidre.....	266
9.5.3.3	Assaig immunoenzimàtic sobre superfícies de vidre.....	266
9.6	Determinació d'hormones anabolitzants per LC-MS-MS.....	267
10	Annex: Caracterització estructural.....	269
10.1	RMN	269
10.2	MS.....	276
10.2.1	HRMS.....	276
10.2.2	MS.....	277
10.3	IR.....	278
11	Conclusions.....	279
12	Publicacions, projectes i congressos	283
12.1	Articles sorgits d'aquesta tesi doctoral	283
12.2	Altres publicacions	285
12.3	Relació de publicacions sorgides de col·laboracions	286
12.4	Projectes sorgits a conseqüència del treball realitzat en aquesta tesi doctoral	287
12.5	Congressos	288
13	Referències.....	289

AAS	Esteroides anabolitzants androgènics (<i>Anabolic-Androgenic Steroids</i>)
Abs	Absorbància
Ac	Anticòs
ACN	Acetonitril
AcOEt	Acetat d'etil
AD	Androstenediona
ADD	Androstandiendiona
AEP	2-(2-aminoetil)-piridina
Ag	Antigen
AIBN	2,2'-azobisisobutironitril
AM	Anhídrid mix
Amax	Absorbància màxima
Amin	Absorbància mínima
Anti-IgG	Immunoglobulines de cabra contra immunoglobulines de conill
AP	2-Aminopiridina
AR	Receptor androgènic
As	Antisèrum
AT	Antigen de tapissat
B	Boldenona
α-B	α -Boldenona
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
^{13}C-RMN	Ressonància Magnètica Nuclear de carboni
CCF	Cromatografia en capa fina
CE	Comunitat Europea
CMO	Carboximetoxiloxima
COI	Comitè Olímpic Internacional
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DEAD	Azodicarboxilat de dietil
DGP	Direcció General de la Policia
DHEA	Dihidroepiandrostanolona
DHT	Dihidrotesterona
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfòxid
EA	Ester actiu
EDA	Etilendiamina
EEUU	Estats Units d'Amèrica
EI-MS	Espectrometria de masses amb impacte electrònic (<i>Electronic Impact Mass Spectrometry</i>)
ELISA	Assaig immunoenzimàtic sobre suport sòlid (<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
EPO	Eritropoietina

Abreviatures

Et₂O	Èter dietílic
Et₃N	Trietilamina
EtOH	Etanol
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FEI	Federació d'esports eqüestres (<i>Federation for Equestrian Sports</i>)
FID	Detector de ionització de flama (<i>Flame Ionization Detector</i>)
G	Gestrinona
GC	Cromatografia de gasos (<i>Gas Chromatography</i>)
GC-MS	Cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses
¹H-RMN	Ressonància Magnètica Nuclear d'hidrogen
hA_B	Haptè tipus B de boldenona
hA_St	Haptè tipus A d'estanozolol
hA_T	Haptè tipus A de testosterona
HAc	Àcid acètic
hB_B	Haptè tipus B de boldenona
hB_MB	Haptè tipus B de metilboldenona
hB_St	Haptè tipus B d'estanozolol
HCH	<i>Horseshoe crab hemocyanin</i>
hG	haptè de gestrinona
2-HM-DHT	2-hidroximetilendihidrotestosterona
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPLC-MS	HPLC acoblat a espectrometria de masses
HRMS	Espectrometria de masses d'alta resolució (<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
hTHG	haptè de tetrahidrogestrinona
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
IA	Immunoassaig
IAC	Cromatografia d'immunoafinitat
IC_{20, 50, 80 o 90}	Concentració d'analit necessària per inhibir l'absorbància d'un assaig immunoenzimàtic competitiu al 20, 50, 80, o 90% respectivament
IgG	Immunoglobulines de tipus G
¹PrOH	Alcohol isopropílic
IR	Infraroig
IS	Immunosorbent
JJO	Jocs Olímpics
K_a	constant d'afinitat
LC-MS-MS	Cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses de triple quadrupol
LOD	Límit de detecció
MAA	Àcid metacrílic
MAc	Anticòs monoclonal

MALDI-TOF-MS	Espectrometria de masses d'ionització per desorció per electrospray i detecció de temps en vol. (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight Mass Spectrometer</i>)
MAm	Metacrilamida
MB	Metilboldenona
Me	Metil
MeOH	Metanol
MIP	Polímer d'empremta molecular (<i>Molecular imprinted polymer</i>)
MRPL	Límit mínim de funcionament exigít (<i>Minimum requerid performance limit</i>)
MS	Espectrometria de masses
MT	Metiltestosterona
MTyr	Metoxitiramina
NBu₃	Tributilamina
NHS	N-hidroxysuccinimida
nOe	<i>nuclear Overhauser effect</i>
NorSt	Norestanazolol
NT	nandrolona
16βOH-St	16β-hidroxiestanozolol
3'OH-St	3'-hidroxiestanozolol
PAc	Anticòs policlonal
PBS	Tampó fosfat salí (<i>Phosphate Buffer Saline solution</i>)
PBST	Tampó fosfat salí amb Tween (<i>Phosphate Buffer Saline solution Tween</i>)
PEG	Polietilenglicol
PPh₃	Trifenilfosfina
PVP	Polivinilpirrildona
Pyr	Piridina
RAc	Anticòs recombinant
RaDAR	<i>Rapid Detection of Androgen Residues</i>
RC	Reactivitat creuada
RIA	Radioimmunoassaig
RMN	Ressonància Magnètica Nuclear
RMSE	Error quadràtic mig (<i>root mean square error</i>)
S/N	Relació senyal/soroll
SCVPH	Comitè científic per les mesures veterinàries relacionades amb la salut pública de la UE (<i>Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health</i>)
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
St	Estanozolol
T	Testosterona
TE	Traçador enzimàtic
THF	Tetrahidrofurà
THG	Tetrahidrogestrinona

Abreviatures

TMS	Tetrametilsilà
Tr	Trenbolona
U.A.	Unitats d'absorbància
USADA	Agència Antidopatge dels Estats Units, (<i>United States Anti-Doping Agency</i>)
UV	Ultravioleta
WADA	Agència Mundial de Control Antidopatge (<i>World Antidoping Agency</i>)
WTO	Organització Mundial del Comerç (<i>World Trade Organization</i>)

1 Introducció

Les hormones anabolitzants, o esteroides anabolitzants androgènics (AAS, *Anabolic-Androgenic Steroids*) són derivats sintètics de l'hormona masculina testosterona. Aquests compostos pertanyen al grup d'esteroides androgènics i imiten l'efecte produït per l'hormona endògena. Els andrògens són un grup de substàncies biològicament actives que són sintetitzades a partir del colesterol. En general promouen el creixement de la massa muscular, per tant, s'usen per millorar el rendiment atlètic i l'aspecte físic dels esportistes, per augmentar el pes de la ramaderia i per incrementar el rendiment físic dels cavalls de cursa.

1.1 Hormones anabolitzants

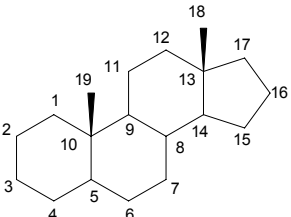
1.1.1 *Descripció estructural*






Els esteroides anabolitzants androgènics mantenen l'estructura esteroidal androgènica característica que consisteix en un sistema d'anells del ciclopentà-perhidrofenantré. Generalment el nombre d'àtoms de carboni associats a les hormones androgèniques és de

Introducció

19 (les estructures de les hormones més emprades es poden veure a la Taula 1.1). Amb aquesta estructura base, per exemple, la testosterona presenta una insaturació entre els carbonis 4-5, un grup hidroxil en la posició 17 i un grup cetònic al carboni 3.

Taula 1.1 Estructures químiques de les hormones anabolitzants més emprades



Compost	Δ	C3	C17	C18	C19	anell
Testosterona	4,5	=O	—OH			
Nandrolona	4,5	=O	—OH		—H	
Metiltestosterona	4,5	=O				
Dihidrotosterona		=O	—OH			
Boldenona	1,2; 4,5	=O	—OH			
Metilboldenona	1,2; 4,5	=O				
Trenbolona	4,5; 9,10; 11,12	=O	—OH	-		
Estanozolol						[3,2-c]- pirazol
Tetrahydrogestriona	4,5; 9,10; 11,12	=O			-	

Donada la seva estructura esteroidal, una de les peculiaritats més característiques és la seva planaritat, on sobresurten els grups metil 18 i 19. Com anàlegs sintètics de la testosterona es van desenvolupar diversos anabolitzants on es va modificar l'estructura androgènica base, canviant diferents grups funcionals. D'aquesta manera tenim per exemple la boldenona on hi ha una insaturació (Δ) addicional a la testosterona entre els carbonis 1 i 2.

La nomenclatura que s'emprarà en aquesta tesi doctoral està basada en les recomanacions de la [IUPAC per esteroides](#) ¹. L'estructura general d'un compost anabolitzant es un C19 que té per nom androstà on l'estructura base es pot veure a la figura inclosa a la **Taula**

1.1. Els anells es denominen per lletres A, B, C i D. Si hi ha un anell addicional, com en el cas de l'estanozolol, s'anomena anell A'. La configuració absoluta de cada un dels centres quirals de la molècula, a part de la nomenclatura sistemàtica, s'accepta per aquests casos una nomenclatura projeccional, és a dir, quan l'estructura esteroidal és plana, els àtoms que queden per sobre del pla de la molècula s'anomenen β (\blacktriangleright), i els que estan per sota s'anomenen α (\cdots). Els dobles enllaços que hi ha a l'estructura esteroidal s'indiquen amb $\Delta^{i,ii}$, on el doble enllaç va de i a ii. De totes maneres, a més del nom sistemàtic, cada anabolitzant esteroidal té un nom comú que històricament se li ha donat, i amb el consentiment de la IUPAC s'accepten modificacions d'aquesta arrel comuna. Així doncs, per exemple, segons es pot veure a la **Figura 1.1**, la testosterona és el nom comú de l'androgen esteroidal natural, però segons les normes de la IUPAC s'hauria de dir 17 β -hidroxi-4-androsten-3-ona, però a més del nom comú s'accepta numerar la insaturació amb un $\Delta^{4,5}$. D'altra banda, un dels metabòlits majoritaris de la testosterona, s'anomena dihidrotestosterona perquè no existeix la insaturació a $\Delta^{4,5}$, d'aquí el prefix dihidro, però, s'hauria de dir 17 β -hidroxi-5 α -androstan-3-ona. En ambdós casos el grup hidroxil està a la posició C17 en posició β , ja que està per sobre del pla de la molècula.

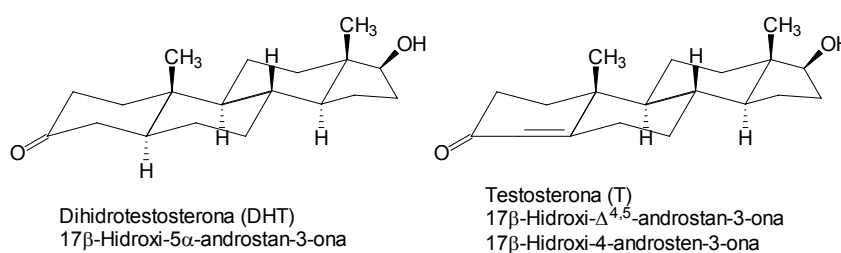


Figura 1.1 Estructures químiques de la testosterona i dihidrotestosterona on s'observa l'estereoquímica de les molècules. S'indica la nomenclatura acceptada per la IUPAC.

1.1.2 Antecedents de les hormones anabolitzants

Les hormones anabolitzants, com s'ha comentat anteriorment, són derivats sintètics de l'hormona endògena testosterona. La testosterona és una hormona sexual que es produeix als testicles. En una primera instància els andrògens naturals es van aïllar d'extractes

d'orina, de testicles i d'altres òrgans genitals. Les primeres que es van aïllar van ser la testosterona, l'androsterona i la dehidroepiandrosterona, les quals són les més importants². Després d'aïllar i saber les seves propietats fisiològiques, tan androgèniques com anabolitzants, es van desenvolupar una gran quantitat de andrògens sintètics per tal de millorar aquestes propietats, com ara la boldenona, la metilboldenona, l'estanozolol o la trenbolona (vegeu **Figura 1.3**).

- **Testosterona** (T, C₁₉H₂₈O₂, CAS n° 58-22-0, pes molecular 288.45). Va ser aïllada per primera vegada per E. Laqueur *et al.*³ l'any 1935 del teixit testicular. La estructura de la testosterona va ser establerta per K. David⁴ d'oxidar la testosterona per obtenir l'androstan-4-ene-3,17-diona. Al 1935, Butenandt *et al.*⁵ i Ruzicka *et al.*⁶ van realitzar la primera síntesi parcial de la testosterona, independent, i simultàniament, pel mateix mètode (vegeu **Figura 1.2**). Una altra síntesi parcial de la testosterona es va aconseguir a partir de l'acetat d'estr-4-en-17b-ol en deu etapes⁷.

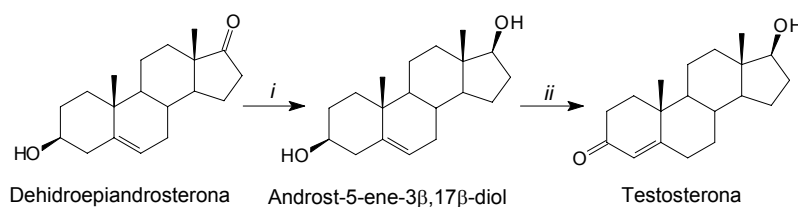


Figura 1.2 Primera síntesi parcial de la testosterona a partir de la dehidroepiandrosterona. i) Na, PrOH; ii) Al(OPh)₃-acetona (oxidació d'Oppenauer).

Un cop que la testosterona va ser identificada i es van demostrar els seus efectes tan androgènics com anabolitzants, la necessitat de modificar químicament la testosterona va sorgir per tal de poder administrar-la oralment o per modular els seus efectes. Respecte al cas, la preparació d'esters, com el propionat o l'undecanoat de 17b-testosterona va aconseguir l'augment de la seva biodisponibilitat. Per tal de maximitzar o minimitzar els efectes de la testosterona va donar lloc als primers anàlegs sintètics, coneguts amb les sigles AAS (*anabolic androgenic steroids*, esteroides androgènics anabolitzants).

- **Metiltestoterona** o 17 α -metiltestosterona (**MT**, C₂₀H₃₀O₂, CAS n° 58-18-4, pes molecular 302.45). La MT va ser el primer anabolitzant sintètic. És considerat un dels andrògens actius per via oral més importants. La primera síntesi data del 1935 pel grup de Ruzicka et al.⁸ els quals la van obtenir a partir de la dehidroepiandrosterona per tractament amb MeMgBr per obtenir la 17 α -metilandrost-5-en-3 β ,17 β -diol, seguit d'una oxidació d'Oppenauer (acetona i Al[OC(CH₃)₃]₃) per obtenir la metiltestosterona.

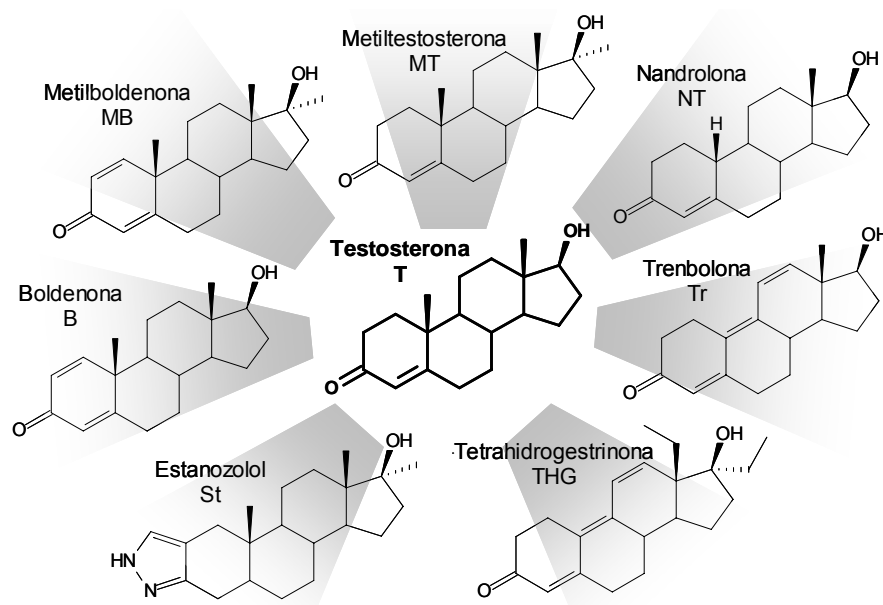


Figura 1.3 Estructures químiques de la testosterona i dels anàlegs sintètics més rellevants.

- **Nandrolona** o 19-nortestosterona (**NT**, C₁₈H₂₆O₂, CAS n° 434-22-0, pes molecular 274.40). Una de les primeres síntesis que es van descriure per aquest potent anabolitzant va ser realitzada per Birch et al.⁹ a través de la reacció de Birch partint del metil éter d'estradiol per obtenir la nandrolona. Tanabe et al.¹⁰ va partir de 3 α ,5 α -cyclo-6 β ,19-oxidoesteroides. Les propietats mostrades per la nandrolona van conduir a la síntesi d'altres 19-nor- Δ^4 -3-oxo-esteroides. D'aquest compost s'han sintetitzat anàlegs de tipus ester per tal de ser administrats per via oral (acetat, decanoat, dodecanoat, etc.)

- **Boldenona** o Δ^1 -dehidrotestosterona (**B**, $C_{19}H_{26}O_2$, CAS n° 846-48-0, pes molecular 286.41). Va ser sintetitzat per primer cop per Meystre et al.¹¹ per deshidrogenació amb diòxid de seleni a partir de la testosterona. També existeixen les formulacions en forma d'ester com acetat i undecanoat.
- **Metilboldenona**, 1-dehidro-17 α -metiltestosterona o metandienona (**MB**, $C_{20}H_{28}O_2$, CAS n° 72-63-9, pes molecular 300.44). Aquest anabolitzant va obtenir per Vischer et al.¹² per deshidrogenació microbiana de la MT l'any 1955. De la mateixa manera que en el cas de la B, es va obtenir la MB a partir de la MT, mitjançant diòxid de seleni¹¹.
- **Estanozolol** o 17 β -hidroxi-17 α -metil-5 α -androstano[3,2-*c*]pirazol (**St**, $C_{21}H_{32}N_2O$, CAS n° 10418-03-8, pes molecular 328.49). La variabilitat que es va introduir en aquest anabolitzant va ser la introducció d'un anell de pirazole fusionat amb l'anell A. D'aquesta manera es van augmentar les propietats anabolitzants i androgèniques. Aquest compost va ser sintetitzat per Clinton et al.^{13,14} al 1959.
- **Trenbolona** o 17 β -hidroxiestra-4,9,11-trien-3-ona (**Tr**, $C_{18}H_{22}O_2$, CAS n° 10161-33-8, pes molecular 270.37). Com en el cas de la nandrolona, la base de l'esquelet d'aquest esteroide es de 18 carbonis, ja que el C19 no existeix. Conté una estructura triènica conjugada que li confereix una planaritat addicional. La primera síntesi de la trenbolona es va realitzar al 1963 per Velluz et al.¹⁵. També és administrat en forma d'acetat o en forma de ciclohexilmetilcarbonat.
- **Tetrahydrogestrinona** o 18a-homo-pregna-4,9,11-trien-17 β -ol-3-one (**THG**, $C_{21}H_{28}O_2$, CAS n° 618903-56-3, pes molecular 312.45). Aquest nou esteroide de disseny, com s'ha denominat, pertany a una nova generació d'esteroides dissenyats per no ser detectats. La primera publicació en la que es descriu la síntesi d'aquest compost és del 2004 i va ser realitzada per Catlin et al.¹⁶, però aquest anabolitzant va ser produït amb anterioritat per l'empresa BALCO. Encara

que no s'ha fet públic qui va ser el responsable de la seva síntesi, sí que es coneixen els responsables de la seva distribució.

A la **Taula 1.2** es mostren les propietats més rellevants dels anabolitzants d'interès. A la taula es mostra el logP calculat mitjançant el programa ACD logP DB™ per tal de tenir una indicació de la seva hidrofobocitat. A més s'indica la λ_{\max} que en la majoria dels casos ve determinada per la cetona α,β insaturada, encara que també hi juga un paper les insaturacions presents en esteroïdes com la trenbolona i la THG. En el cas de l'estanozolol també hi té com a veure l'anell de pirazole.

Taula 1.2 Propietats dels compostos anabolitzants d'interès.

Compost	P.M.	λ_{\max}/nm	Fórmula	logP*
Testosterona	288.43	238	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	3.48
Trenbolona	270.37	340.5	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	2.31
Boldenona	286.41	245	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	3.69
Metiltestosterona	302.46	240	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	4.02
Nandrolona	274.40	241	C ₁₈ H ₂₆ O ₂	3.00
Metilboldenona	300.44	245	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	4.23
Estanozolol	328.50	223	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O	5.05
Tetrahydrogestrinona	312.42	340	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	3.91

*logP, determinat mitjançant ACD logP DB™

1.1.3 Fisiologia i mecanismes d'acció dels AAS

Com s'ha comentat anteriorment la testosterona és la principal hormona masculina i d'aquesta s'han derivat una sèrie d'anàlegs sintètics amb propietats androgèniques i anabolitzants. La testosterona és produïda principalment pels testicles dels mascles, i, en femelles pot ser produïda en menys quantitat pels ovaris o per les glàndules adrenals. Donada la seva activitat hormonal s'han realitzat nombrosos estudis sobre la seva fisiologia i el mecanisme d'acció dels AAS.

1.1.3.1 Fisiologia de la testosterona

Com la majoria d'esteroides, la testosterona es biosintetitza a partir del colesterol, concretament a les cèl·lules de Leydig dels testicles. Quan hi ha una necessitat de

Introducció

testosterona, es desencadenen una sèrie de senyals hormonals que estimulen la seva síntesi (vegeu **Figura 1.4**).

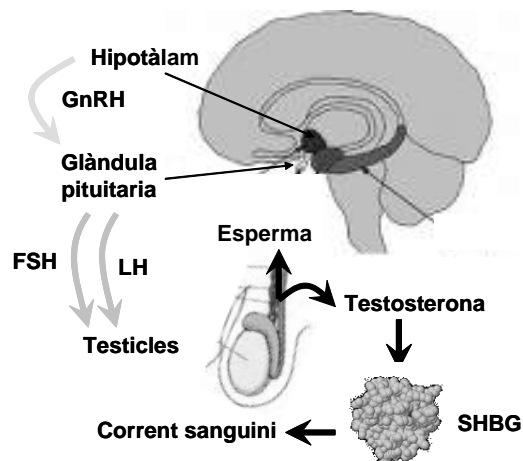


Figura 1.4 Mecanisme de regulació i producció de la testosterona.

L'hipotàlam és una àrea a la base del cervell responsable de la regulació de l'activitat hormonal. Aquest envia un senyal químic a través de la GnRH (*gonadotropin-releasing hormona*). Aquest missatger estimula la glàndula pituitària per la producció de dos hormones més, la FSH (*follicle-stimulating hormona*) i la LH (*luteinizing hormona*), conegudes com gonadotropinas. Ambdues hormones són segregades al corrent sanguini pel qual arriben als testicles. La funció de la FSH és la regulació de la producció d'esperma. La LH interacciona amb les cèl·lules de Leydig als testicles les quals tenen la funció de produir la testosterona a partir del colesterol. Un cop produïda la quantitat suficient de testosterona, aquesta és alliberada al corrent sanguini lligada a una proteïna transportadora. La SHBG (*sex hormone binding globulin*), és la responsable de la regulació de la concentració de testosterona lliure al corrent sanguini i del transport de la testosterona a les cèl·lules que ho necessitin.

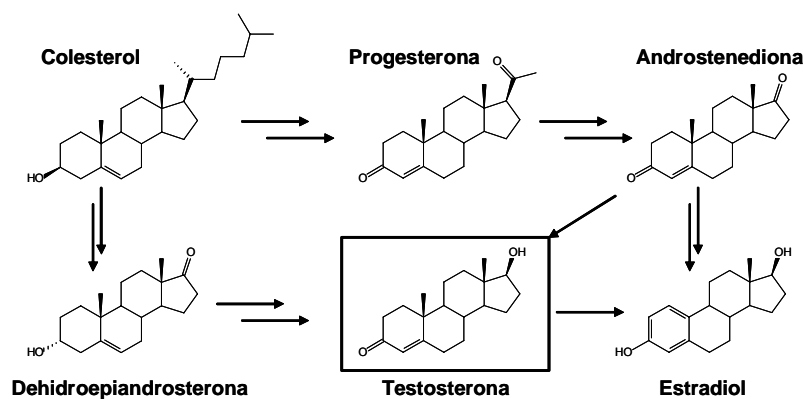


Figura 1.5 Biosíntesi de la [testosterona](#) a partir del [colesterol](#).

La síntesi de la testosterona a partir del colesterol transcorre a través de dues vies, en les quals es produeixen altres tipus de compostos esteroidals (vegeu **Figura 1.5**). En la primera d'elles després de dues etapes s'obté la dehidroepiandrosterona, un altre dels andrògens majoritaris junt amb la testosterona. Seguidament, en dues etapes més, s'obté la testosterona. L'altra via de producció de la testosterona ve de una primera síntesi de progesterona. Seguidament s'obté l'androstendiona que per reducció dóna lloc a la testosterona. Tal i com es pot veure a la figura anterior, a part de la testosterona, a partir del colesterol s'obtenen altres compostos hormonalmentals sexuals, com l'estradiol o la progesterona.

1.1.3.2 Receptor androgènic

El receptor androgènic pertany a la família de receptors nuclears¹⁷. Els receptors nuclears són proteïnes que intervien en la regulació de les cèl·lules. Entre els reguladors més comuns estan les hormones esteroidals (estrògens, andrògens, progestàgens, glucocorticoides, mineralocorticoides, ecdysteroides, vitamina D), les hormones tiroidees i els retinoides. En contrast amb els receptors per hormones peptídiques, els quals estan localitzats a la membrana cel·lular i provoquen un senyal secundari, els receptors nuclears estan dintre de la cèl·lula. Després de l'associació amb els seus respectius lligands, actuen com a factors de transcripció al nucli de la cèl·lula per augmentar l'expressió de determinats gens. Aquests lligands actuen sobre diferents tipus de cèl·lules depenent de la seva funció reguladora. Totes les cèl·lules tenen receptors nuclears, però, en certs tipus de

Introducció

cèl·lules, la concentració d'aquests receptors és molt superior depenent de la funció que tenen. Així, doncs, els receptors estrogènics i progestàgens són abundants a l'úter, la vagina i les glàndules mamàries. Per altra banda, els receptors androgènics estan majoritàriament a la pròstata, vesícules seminals i penis.

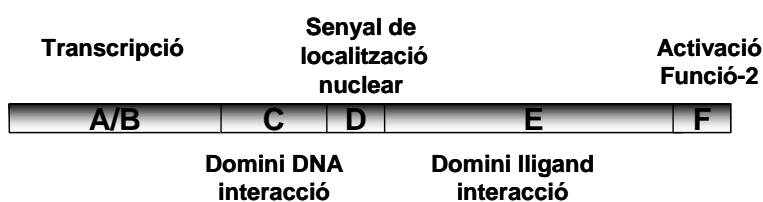


Figura 1.6 Estructura dels dominis dels receptors nuclears

L'estructura del receptor nuclear consta de sis dominis, en la que cadascun d'ells té una funció determinada (vegeu Figura 1.6). El domini A/B, junt amb l'E, tenen per funció l'activació de la transcripció del senyal. Els dominis C i D són els responsables de la unió del receptor nuclear amb el DNA. I finalment, el domini E és on es produeix el reconeixement del lligand corresponent a cada tipus d'hormona, també de la dimerització del receptor nuclear i de la transcripció. Al domini E és on existeix una major diferenciació entre els diversos receptors nuclears, ja que en aquest domini és on té lloc el reconeixement molecular de la proteïna pel lligand. El receptor nuclear no és actiu sense el lligand. En el cas del receptor androgènic reacciona preferentment amb la dihidrotestosterona (**DHT**).

El domini del receptor nuclear androgènic E amb la DHT ha estat cristal·litzat per Sack et al.¹⁸, tal i com es pot observar a la **Figura 1.7**. D'aquesta manera es va poder observar quins aminoàcids del domini E interaccionen amb la DHT. La seqüència del domini va ser desxifrada i així es va veure que la cavitat d'interacció estava formada majoritàriament per aminoàcids lipofílics com pot ser la metionina, la leucina o la fenilalanina, i per dos aminoàcids que interaccionen amb cadascun dels punts característics de la DHT. Així, l'arginina interacciona directament amb el grup cetònic 3, i la treonina amb el grup hidroxil 17. La resta d'aminoàcids fan de la cavitat una zona lipofílica per una millor interacció amb l'esteroide.

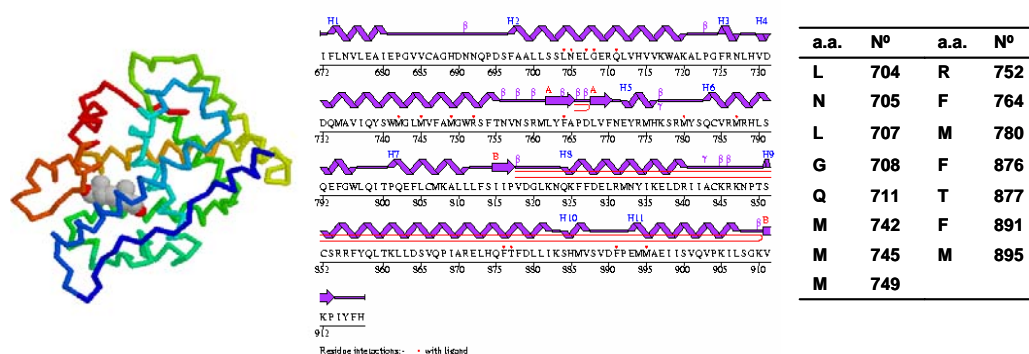


Figura 1.7 A l'esquerra figura esquematitzada del domini E del RA amb la DHT (extreta del PDB, [codi 1i37](#)). Al centre, seqüència del domini E amb els aminoàcids que intervenen en el reconeixement de la DHT (extreta de [University Collage of London, Dep. of biochemistry](#)). A la dreta, taula d'aminoàcids que fan la cavitat d'interacció amb la DHT

1.1.3.3 Mecanisme d'acció

Un cop alliberada la testosterona al corrent sanguini arriba a les cèl·lules diana que la necessiten. La testosterona, donada la seva naturalesa lipòfila, passa la barrera citoplasmàtica sense cap tipus de problema. Els mecanismes d'acció de les hormones androgèniques és molt similar al d'altres esteroides com els estrògens, progestàgens o corticoides.

Un cop la testosterona està al citosol és reduïda per una 5 α -reductasa per obtenir la DHT. Aquest enzim redueix el doble enllaç de la testosterona $\Delta^{4,5}$ per obtenir l'isòmer 5 α . Dependent del tipus d'acció que es vulgui veure, actuarà la T o la DHT. En tot cas, la DHT té una millor afinitat pel receptor proteic.

Tal i com es pot visualitzar a la **Figura 1.8**, la testosterona o la DHT s'uneixen a la proteïna receptora intracel·lular. Aquesta proteïna realment és un conjunt de proteïnes (Hsp90x2, Hsp70 i Hsp59) que permeten que la testosterona s'uneixi al domini E del receptor nuclear androgènic (AR, *androgen receptor*) i que es produeixi un dimer (AR-T) \times 2. Aquest dimer serà el que passi la membrana nuclear i interacció amb el DNA. El dímer s'uneix al DNA mitjançant el domini C del AR i comença la transcripció del mRNA per la producció de proteïnes específiques.

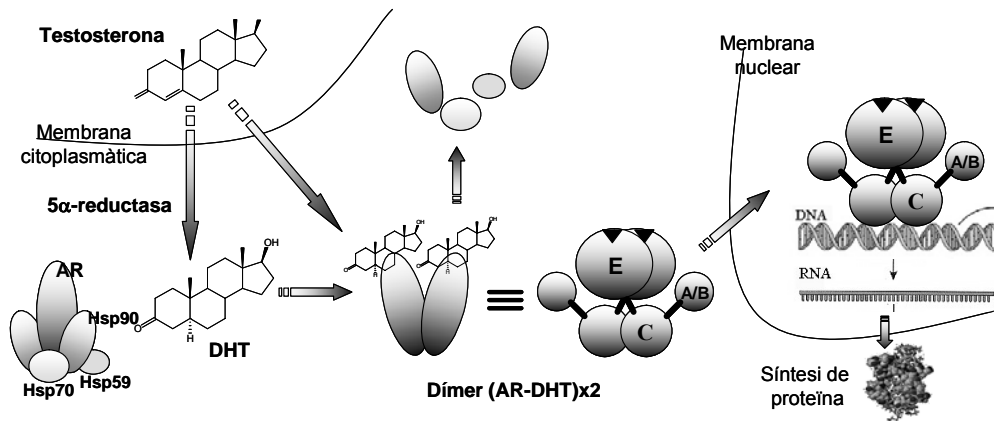


Figura 1.8 Mecanisme s'acció de la testosterona intracel·lular.

Els anabolitzants esteroidals actuen de la mateixa manera que la testosterona ja que es poden unir al receptor androgènic actuant com agonistes.

1.1.4 Efecte anabolitzant i androgènic

Els esteroides derivats de la testosterona produeixen dos tipus d'efectes: androgènics i anabolitzants. L'efecte androgènic és el responsable de les modificacions dels caràcters sexuals masculins, tant primaris com secundaris. Aquest tipus d'efecte es pot observar en els primers mesos de vida del fetus, on es produeix la diferenciació sexual. Si en aquest estadi hi ha una deficiència de testosterona o una error enzimàtic de la 5α-reductasa, pot donar lloc a un pseudohermafroditisme. A la pubertat, la funció de la testosterona es maximitza en el desenvolupament tant dels caràcters sexuals primaris (creixement de l'òrgan sexual masculí, estímul de l'espermatogènesi, augment de la libido) com secundaris (virilització externa). L'efecte anabòlic és el corresponent a l'increment de la massa muscular, principalment al múscles esquelètics, influenciant en la mida del múscle, la força, el metabolisme de les proteïnes (actina i miosina), el metabolisme dels ossos i la síntesi de col·làgens¹⁹.

En el desenvolupament dels anabolitzants sintètics s'ha buscat de minimitzar l'efecte androgènic i maximitzar l'efecte anabolitzant, disminuir el metabolisme dels AAS per mantenir un nivell constant en la sang i per fer arribar l'anabolitzant als teixits l'interès sense passar per la ruta catabòlica. D'aquí que s'hagin sintetitzat un gran nombre

d'anabolitzants esteroidals com ara la trenbolona, la nandrolona, l'estanozolol, la boldenona i molts més en la que s'ha buscat millorar l'efecte anabòlic. Per tal de mesurar l'efecte anabòlic vs. l'androgènic s'han desenvolupat una sèrie d'assaigs. L'efecte anabòlic es mesura valorant el creixement dels músculs esquelètics, mentre que per l'efecte androgènic es mesura la pròstata, sempre en animals castrats. Així, s'ha establert que la testosterona té una relació anabòlica/androgènica de 1. La resta de compostos estan a la **Taula 1.3**. Cal destacar el cas de l'estanozolol on la relació és de 30. Tot i que la diferència entre androgènic/anabòlic és gran, l'ús continuat d'aquest compostos pot revelar els efectes androgènics.

Taula 1.3 Relació anabòlica:androgènica per determinats AAS seleccionats (taula extreta de Kuhn et al.²⁰)

AAS	Relació anabòlica/androgènica
Testosterona	1
Metiltestosterona	1
Metilboldenona	2-5
Oximetolona	9
Oxandrolona	10
Nandrolona	10
Estanozolol	30

1.1.5 Formes d'administració

Existeixen al mercat nombroses formulacions per l'administració d'AAS als humans i als animals. A la **Taula 1.4**, es mostren algunes d'elles amb el principi actiu, nom comercial i forma d'administració. Per tal de millorar l'efectivitat dels AAS s'ha modificat l'estructura base de la testosterona: 1) esterificant el grup hidroxil 17 β , per tal de millorar la solubilitat dels AAS, 2) modificant químicament la posició 17 α i 3) introduint diverses modificacions als carbonis 1, 2, 9 i 11.

Taula 1.4 Principi actiu i nom comercial dels anabolitzants més emprats i forma d'administració.

Principi actiu	Nom comercial	Administració
Testosterona	Delatestryl, Everone, Tesamone, Testro, Virilon	Intramuscular
Testosterona	Androderm, Androgel, Testim, Testoderm	Transdermal
Enantat de testosterona	Andro LA, Androtardyl, Testo-Enant	Intramuscular
Isobutirat de testosterona	Perandren M.	Intramuscular
Propionat de testosterona	Alertan, Testex, Testoviron, Viormone	Intramuscular
Undecanoat de testosterona	Andriol, Pantestone	Intramuscular
Metiltestosterona	Android, Testred, Virilon	Oral
Fluoximesterona	Halostestin, Ultandren, Android-F	Oral
Oxandrolona	Anavar, Oxandril	Oral
Fenilpropionat de nandrolona	Nandrolin, Durabolin	Intramuscular
Decanoat de nandrolona	Deca-Durabolin, Anabol	Intramuscular
Estanozolol	Winstrol	Oral
Undecanoat de boldenona	Parenabol, Equipoise	Intramuscular
Metilboldenona	Danabol, Dianabol	Oral
Acetat de trenbolona	Parabolan	Intramuscular

1.1.6 Efectes adversos

Els efectes adversos que poden derivar-se de la utilització continuada d'aquests tipus de substàncies estan recopilats a la **Taula 1.5**. Poden afectar tant el sistema cardiovascular, com l'hepàtic, produir desordres hormonals o, inclòs, del comportament. Respecte a l'efecte cardiovascular, cal ressaltar l'augment de la pressió sanguínia o la hipertrofia del miocardi del cor. Com que els AAS augmenten de volum els músculs, no distingeix qui és qui, per tant, pot crear una atrofia en el cor i així produir un atac de cor.

Taula 1.5 Efectes adversos dels AAS.

Cardiovascular		Hepàtic	Dermatològic	Comportament
Augment de la pressió sanguïnia		Hepatotoxicitat	Acné	Canvis d'humor
Disminució de HDL (<i>High-density lipoprotein</i>)		Neoplasia	Alopecia	Agressivitat
Eritrocitosis		Icterícia	Creixement anormal dels pits	Manies
Hipertrofia miocàrdica			Estríes	Depressió
Arritmia				Dependència
Trombosi				Síndrome d'abstinència
Desordres hormonals	General	Masculí	Femení	Nens
	Canvis a la libido Subfertilitat Disminució de LH i FSH	Atrofia testicular Deteriorament de la espermatogènesis Impotència Hipertrofia de la pròstata	Hirsutisme/ masculinització Deteriorament de la veu Irregularitats menstruals Allargament del clítoris Reducció de pits	Tancament prematur de la epífisis Pubertat precoç

1.1.7 Metabolisme i excreció dels AAS

1.1.7.1 Metabolisme en Fase I

El metabolisme que es produeix en fase I és el corresponent a les reaccions catalítiques enzimàtiques que pateixen els AAS. Generalment consisteixen en oxidacions, reduccions, epimeritzacions o hidroxilacions de l'estructura esteroïdal per fer-les més polars i així inactivar l'esteroides o facilitar la seva eliminació del cos. Així, doncs, els tipus de modificacions més comuns que es produeixen, estan localitzades als anells A i D, i minoritàriament als anells B i C ²¹. A la **Taula 1.6** es mostren les estructures químiques dels AAS més destacats i dels seus metabòlits majoritaris depenent de l'animal tractat. A continuació s'enumeren algunes d'aquestes reaccions metabòliques.

Reducció 5 α - i 5 β -. Es produeix generalment la reducció del doble enllaç $\Delta^{4,5}$. La reducció a 5 α o a 5 β és independent degut a que intervenen dos enzims diferents, les 5 α i

Introducció

5 β -reductases, la primera localitzada al reticle endoplasmàtic i l'altre al citoplasma²². Aquests enzims estan localitzats al fetge.

3 α - i 3 β -hidroxi reducció. Generalment quan hi ha una reducció dels doble enllaç $\Delta^{4,5}$ es produeix també una reducció de la cetona 3 per obtenir l'epímer 3 α -hidroxi-esteroide. La formació de l'epímer 3 β -hidroxi no ha estat descrita.

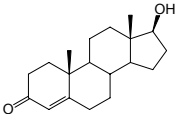
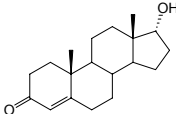
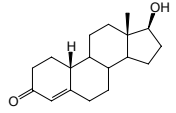
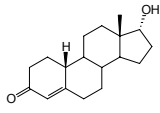
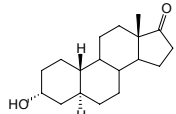
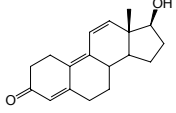
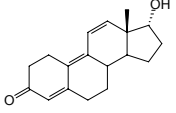
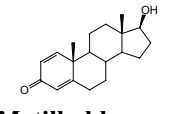
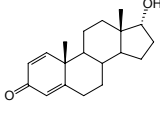
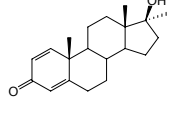
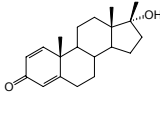
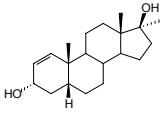
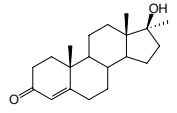
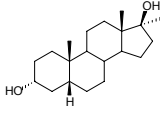
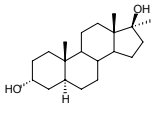
4 β - i 6 β -hidroxilació. Aquest tipus de metabolisme que es dona en esteroides saturats a $\Delta^{4,5}$, no és gaire comú.

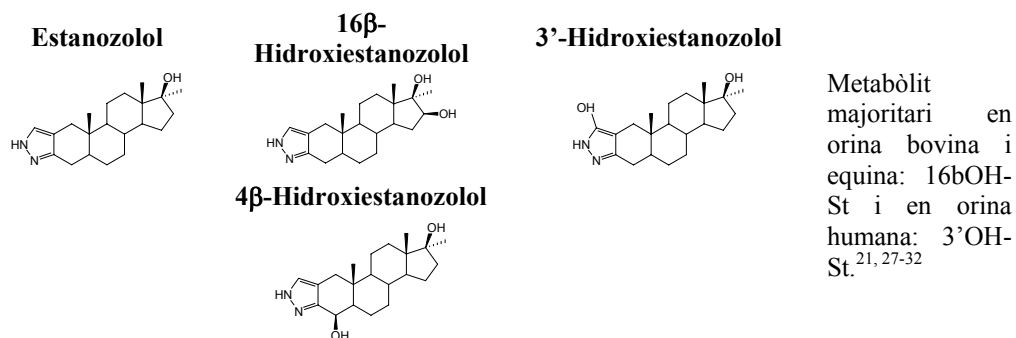
17-oxidació de 17 β -OH. Una de les rutes metabòliques més ben conegudes és a través de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa per formar els 17-*keto* esteroides.

Epimerització de 17 β -OH. Es produeix via un intermedi cetònic que pot produir tant a l'epímer α com al β . L'epimerització en compostos 17 β -hidroxi-17 α -metil es produeix un cop s'han conjugat en fase II (vegeu **apartat 1.1.7.2**) en forma de sulfats, on es forma un intermedi carbocatiònic per eliminació del conjugat sulfat.

16 α i 16 β hidroxilació. Aquest tipus de metabolisme es produeix generalment en compostos esteroidals estrogènics, però, també s'han trobat metabòlits d'AAS on es produeix una hidroxilació en posició 16. Majoritàriament s'ha trobat l'epímer β , però, no hi ha cap regla específica que ho expliqui.

Taula 1.6 Estructures químiques dels AAS més representatius i els seus metabòlits majoritaris.

Compost	Metabòlits	Informació
Testosterona, T 	Epitestosterona, ET 	Metabòlits majoritaris tant en orina bovina com humana ^{23, 24}
Nandrolona, NT 	Epinandrolona, ENT 	
	Norandrosterona, NA 	Humans: NE i NA Cavalls, ENT i altres Boví, ENT i altres ^{25, 26}
Trenbolona 	17α-Trenbolona 	
Boldenona 	α-Boldenona 	Orina bovina, s'excreta el metabòlit majoritari en α . ^{26, 27} Metabòlit majoritari la α -B. ^{27, 28}
Metilboldenona, MB 	epiMB 	
	Metandiòl 	Trobats tant en orina humana com bovina. Majoritari el metandiòl. ²⁸⁻³⁰
Metiltestosterona 	17α-Metil-5β-androstan-3α-17β-diòl 	
	17α-Metil-5α-androstan-3α-17β-diòl 	28-30



1.1.7.2 Metabolisme en Fase II

Aquests tipus de reaccions solen ser conjugacions, on els AAS o els seus metabòlits es converteixen en productes més polars en forma de glucorònids i/o sulfats. Aquests tipus de conjugacions ajuden a eliminar els compostos més fàcilment. Es poden produir de forma parcial o total, per tant, l'excreció dels AAS i els metabòlits poden estar en forma lliure o en forma de conjugats. La conjugació es produeix per via enzimàtica a través de substrats com l'àcid UDP-glucorònic i la 3'-fosfoadenosin 5'-fosfo sulfatasa. Les proporcions no segueixen un patró establert, però s'ha trobat que el conjugat majoritari en plasma és en forma de glucorònid²¹.

Generalment es conjuguen pels grups hidroxils o grups amino. Per exemple la testosterona es conjuga pel grup hidroxil 17 β . En el cas de l'estanozolol es conjuga pel nitrogen de l'anell de pirazole (vegeu **Figura 1.9**). Els compostos amb l'agrupació 17 β -hidroxi-17 α -metil, el grau de conjugació és molt menor donat l'impediment estèric existent.

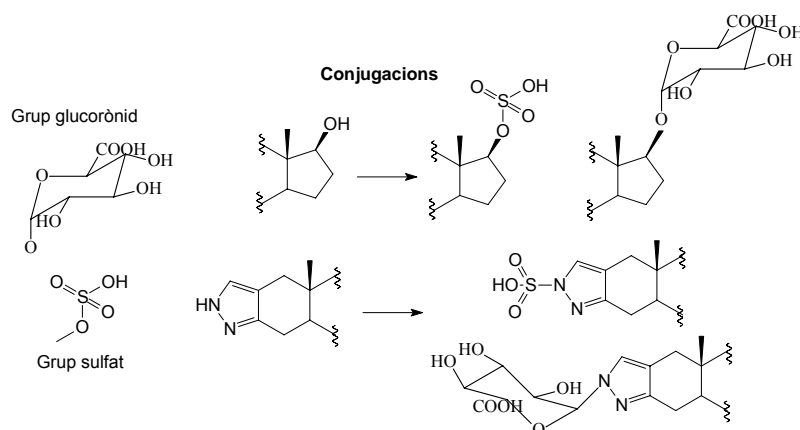


Figura 1.9 Exemples de conjugacions a grup glucorònid i sulfat sobre l'anell D (a dalt) i sobre l'anell de pirazole A' (a baix)

1.1.8 Aplicacions dels AAS

1.1.8.1 Utilització terapèutica

Generalment els AAS s'administren a pacients amb una deficiència de testosterona en sang. A més s'utilitza l'efecte anabòlic de determinats AAS per tal d'augmentar la massa muscular. A continuació es descriuen diferents malalties o disfuncions en les quals el tractament incorpora AAS, tot i que la prescripció està sota rigorós control degut als seus efectes adversos^{19, 33}.

- **Hipogonadisme**, els AAS s'utilitzen per restaurar els nivells hormonals en homes amb un trastorn en la producció de testosterona.
- **Climateri masculí**, el tractament amb AAS produeix un augment de la libido masculina en pacients que a partir de 50-60 anys presenten una deficiència de secreció de testosterona.
- **Osteoporosis**: prescrita per dones post-menopàusiques, els AAS provoquen l'augment de la incorporació de nitrogen als teixits i la retenció de fòsfor i calci, per la formació del ossos.

- **Estats catabòlics**, cas de desnutrició crònica, pèrdua de proteïnes, balanç de nitrogen negatiu.: Els AAS també estimulen el creixement prepubertal en joves amb baixa estatura. En cas d'infecció per SIDA, per provocar l'augment de la massa corporal.
- **Anèmia**: els AAS estimulen la producció d'eritropoietina, és a dir, un augment d'hemoglobina en sang, però actualment aquests tractaments estan en desús.
- **Canvi de sexe**, els AAS s'administren per contrarestar l'efecte dels estrògens endògens.

1.1.8.2 Utilització inadequada dels AAS en la ramaderia: problemàtica i legislació

Donats els seus efectes anabolitzants, els AAS s'han emprat per l'augment de producció de carn d'animals per al consum humà. L'efecte més notable que es pot observar és l'augment de la massa muscular, concretament dels músculs esquelètics. En general, els anabolitzants augmenten la síntesis de proteïnes i distribueixen les reserves de greix produint l'engreixament³⁴.

Dintre de la ramaderia no només s'empren anabolitzants, també s'utilitzen altres tipus de compostos esteroidals, com ara els estrògens i els progestàgens. Aquest compostos també tenen un cert efecte anabolitzant però s'utilitzen majoritàriament pel control del cicle reproductiu.

Els mètodes per l'administració d'anabolitzants al ramat són diversos. El més comú és la injecció parenteral que es realitza a l'orella de l'animal. S'administra en forma d'oli, ja que, d'aquesta manera l'anabolitzant es va alliberant poc a poc. Altres mètodes més sofisticats s'han desenvolupat per una millor eficàcia, com ara, la inserció de [implants](#) que alliberen l'anabolitzant d'una manera constant i en un període de temps llarg (des de 75 dies a 200, depenent del fabricant)³⁵.

Aquest tipus de pràctiques estan totalment prohibides a la CE, però, en contra de la legislació vigent, encara es segueixen utilitzant. La normativa que estableix aquesta

prohibició es veurà en l'apartat 1.1.8.2.2. Per exemple, segons dades de la UE a l'any 2004 hi va haver un total de 61623 mostres recopilades i analitzades sobre ramat boví de les quals 75 van ser positius³⁶. Això representa un 0.12% de positius per hormones del total de les mostres analitzades. Val a dir que, com es discutirà més endavant, el nombre de mostres controlades, és molt inferior al que seria desitjable per tal de protegir la salut pública. Els anabolitzants més freqüents que s'han trobat són la testosterona, la nandrolona, la metiltestosterona i la boldenona. Els positius per estanozolol havien estat superiors en anys anteriors.

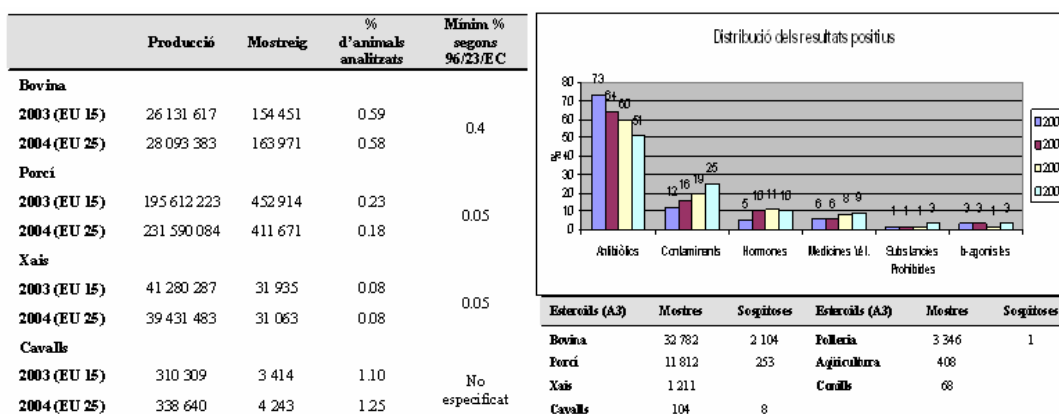


Figura 1.10 Taula esquerra: Nombre de anàlisis realitzats a la UE i producció de la ramaderia. A baix a la dreta: Nombre de mostres sospitoses per esteroides. A dalt a la dreta: Distribució dels resultats positius segons el tipus de substància trobada. Dades extretes dels [reports anuals de la UE 2004](#).

De totes maneres, tal i com es pot deduir de la taula inserida a la **Figura 1.10**, el nombre de anàlisis realitzats, tot i que està dintre del que demana la legislació europea, és insuficient. En aquesta figura també es pot veure el nombre de mostres sospitoses per esteroides que hi ha per exemple al ramat boví. És remarcable, que el nombre de positius per hormones ha estat constant al llarg dels anys. Tot i que hi ha una legislació, encara se segueixen trobant resultats positius per hormones clàssiques com la testosterona, la nandrolona o l'estanozolol.

Als Estats Units, aquestes pràctiques estan autoritzades amb restriccions (vegeu **apartat 1.1.8.2.2**). Segons dades publicades per Janet Raloff als EEUU existeixen 36 milions de caps de ramat boví, dels quals se sap que dues tercers parts del total estan tractades amb

hormones³⁷. Tot i que existeixen unes bones pràctiques d'administració dels esteroides autoritzats, la gran majoria és administrat d'una manera il·legal.

1.1.8.2.1 Problemàtica mediambiental i de salut pública

Degut a la gran quantitat d'animals de granja que es produeixen pel consum humà, l'acumulació d'aquesta producció en determinades regions pot constituir un perill per la salut pública. Aquest fet empitjora si es té en compte la baixa biodegradabilitat d'aquests compostos i l'alta adsorció dels esteroides als sediments dels rius. Estudis realitzats per Lange et al. estimen que a la CE i als EEUU s'excreten un total de 7.1 i 4.4 tones per any, respectivament, d'andrògens endògens en el total de la ramaderia³⁸. Aquestes dades no tenen en compte la possibilitat de que gran part d'aquests animals hagin estat tractats amb anabolitzants sintètics, fet que faria que aquest valor augmentés considerablement. Dades sobre la biodegradabilitat i els nivells mediambientals d'andrògens estan recopilades per Estevez et al.³⁹, on es menciona que s'han arribat a trobar concentracions de testosterona entre 16 a 700 ng·L⁻¹ en plantes de tractament de residus³⁸.

Tant a nivell mediambiental com a través de la cadena alimentària aquest anabolitzants poden arribar afectar els humans. La contínua exposició dels mamífers als anabolitzants pot produir desordres hormonals que es poden traduir, per exemple, en una reducció de l'espermatogènesis (vegeu **Taula 1.5**). D'acord amb el comitè científic per les mesures veterinàries relacionades amb la salut pública de la CE (*Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health, SCVPH*) "Els potencials efectes adversos sobre la salut pública provinents dels residus de la carn bovina i productes relacionats inclouen efectes endocrins, neurobiològics, immunològics així com efectes carcinogènics, genetòxics i immunotoxicològics"⁴⁰.

D'acord amb la legislació actual, aquest tipus de pràctiques estan prohibides dintre de la CE. Per tant, les diferents agències de salut pública de cada estat membre es responsabilitzen de les anàlisis realitzades a cada país. Si es troba una evidència d'utilització d'aquest anabolitzants es procedeix a una investigació policial, ja que són els responsables de trobar i sancionar possibles males pràctiques. Al llarg d'aquest últims

anys s'han produït diferents decomisos d'anabolitzants que anaven destinats a la ramaderia. Aquest tipus d'activitats policials han tingut un gran ressò a nivell mediàtic. Un exemple es pot trobar en un decomís produït per la DGP (direcció general de la policia) el [07/07/04](#) a Reus on es va trobar un petit laboratori clandestí. A part de material per la preparació d'anabolitzants i altres esteroides com corticosteroids, es va trobar una important quantitat de metiltestosterona. Al [vídeo adjunt](#), cedit per la DGP, es pot veure com es realitza la recollida de mostra d'orina de les vaques decomissades, ja que podrien estar tractades amb anabolitzants. Aquestes mostres es portarien a un laboratori de referència i constaria com a prova de l'ús il·legal d'aquests anabolitzants. Prèviament, la premsa no va trigar a fer-se'n ressò (notícia publicada al [El Periódico el 120704](#)) d'una acció policial similar entre la DGP i els Mossos d'Esquadra.



Figura 1.11 Foto realitzada per la DGP en el decomís realitzat el 07/04/04. Foto agafada de El Periódico de Catalunya el 12/07/04

1.1.8.2.2 Legislació dels AAS a la ramaderia

Arran del risc per la salut pública produït pels efectes secundaris que poden produir els AAS, diferents organitzacions governamentals han regulat la seva utilització. Des de la permissivitat dels EEUU per determinats anabolitzants, fins la CE on s'ha prohibit qualsevol mena d'anabolitzant pel engreixament del ramat.

Als **Estats Units**, la FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) va aprovar la utilització de sis compostos per l'engreixament dels animals. Aquest són l'estradiol, la progesterona, la testosterona, l'acetat de trenbolona, l'acetat de melengestrol i zeranol. Segons la [FDA](#) aquest tipus de substàncies són segures en el nivells que ells han estipulat. A la **Taula 1.7** es mostren els nivells permesos per aquestes substàncies en diferents matrius ([CFR, Code of federal regulations](#))⁴¹.

Taula 1.7 Nivells de tolerància dels esteroides autoritzats en teixit boví per la FDA als USA (CFR 21 Part 556)⁴¹

Compost/ $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$	Múscul	Fetge	Ronyó	Adipós
Testosterona	0.64	1.3	1.9	2.6
Acetat de trenbolona	50	100	150	200
Acetat de melengestrol	-	-	-	25
Estradiol	0.12	0.24	0.36	0.48
Progesterona	3	6	9	12
Zeranol	150	300	450	600

Amb aquests valors, si considerem per exemple la testosterona, en cas que es consumissin 500g/dia de vedella, s'exposarien aproximadament a una quantitat de 0.6 μg /persona/dia, i això representa un 1-2% de la producció de testosterona en noies prepubertals que està estimada en 32 μg /dia⁴⁰.

A la **Unió Europea**, en contraposició dels USA, s'ha prohibit la utilització d'AAS pel engreixament del ramat. La prohibició reflecteix el fet que la UE escull un nivell de risc sobre la sanitat pública de zero per residus com les hormones anabolitzants quan s'utilitzen per l'engreixament massiu dels animals. A través de la directiva 88/146/EEC i més tard reemplaçada per la directiva [96/22/EC](#)⁴², la UE prohibeix l'administració als animals de granja de qualsevol tipus de substància tirostàtica, estrogènica, androgènica o progestàgena que tenen per propòsit l'engreixament. Els esteroides anabolitzants s'engloben dintre del grup de substàncies A3, que són substàncies amb efecte anabolitzant. A l'any 2003, la directiva anterior va ser ratificada per la directiva [2003/74/EC](#)⁴³ arran de la denúncia per part de EEUU i Canadà a la Organització Mundial del Comerç (WTO, *World Trade Organization*). Com a conseqüència d'aquesta denúncia es van realitzar uns estudis que van concloure que fins a aquest punt no hi ha la informació necessària per autoritzar l'ús de determinades substàncies.

Taula 1.8 MRPL assignats als diferents esteroides segons la matriu i la tècnica d'anàlisi utilitzada. Taula reproduïda de la pàgina web del grup de [van Poucke](#).

Matriu (tècnica)	Analit	MRPL o LOQ (ppb)	Matriu (tècnica)	Analit	MRPL o LOQ (ppb)
Carn (GC-MS)	Dietilstilbestrol	2	Orina (GC-MS i LC-MS/MS)	Progesterone	2
	Hexestrol	2		17a-estradiol	2
	Metilboldenona	5		Acetat de megestrol	5
	Boldenona	2		Acetat de medroxiprogesterona	5
	Metiltestosterona	2		Acetat de clormadinona	5
	17a-estradiol	2		Noretisterona	2
	17b-estradiol	2		Acetat de delmadinona	5
	Nandrolona	2		17a-acetoxiprogesterona	5
	17a-testoterona	5		16bOH-estanozolol	1
	17b-testoterona	5		Dienestrol	2
	Progesterona	2		Dietilstilbestrol	2
	Acetat de megestrol	2		Etinilestradiol	2
	Acetat de medroxiprogesterona	2		Metiltestosterona	2
	Acetat de clormadinona	10		Noretandrolona	2
	17a-acetoxiprogesterona	5		Norgestrel	2
	Noretandrolona	2		17a-nandrolona	2
	Dienestrol	2		Nandrolona	2
	Norgestrel	10		a-zeranol	2
	Fluoximesterona	2		b-zeranol	2
	Etinilestradiol	2		Etilestrandiol	2
		a-trenbolona	2		
		Metilboldenona	3		
		cloroandrostandiona	5		
		Hexestrol	5		
		Metilandrostendiol	5		
		Metandiol	5		
		a-boldenona	5		
		b-boldenona	5		
		Fluoximesterona	5		

Per aquest tipus de substàncies, com que estan totalment prohibides, s'ha establert un valor mínim que la tècnica analítica emprada ha de ser capaç d'arribar a mesurar. Aquest valor se'l denomina límit mínim de funcionament exigit o MRPL (*Minimum required performance limit*) el qual s'assigna a cadascun dels analits d'interès segons el límit de detecció de la tècnica analítica que s'utilitza. Les condicions a les quals s'han d'ajustar aquestes tècniques estan descrites a la directiva [2002/657/EC](#)⁴⁴. Els valors que s'han assignat estan recopilats a la **Taula 1.8**. Voldriem destacar que el MRPL del 16 β -hidroxiestanzolol, metabòlit majoritari de l'estanozolol en orina bovina, és de 1 ppb, o que per la boldenona en carn és de 2 ppb. Aquests valors s'han obtingut a partir dels estudis realitzats pel grup de van Poucke i van Peteghem a la Universitat de Ghent.

1.1.8.3 Utilització inadequada dels AAS en l'àmbit esportiu: regulacions

1.1.8.3.1 Història dels anabolitzants en el camp dels esports

Els AAS s'han emprat en gran varietat d'esports al llarg del temps, com ara l'atletisme, el futbol, el ciclisme, el beisbol, l'halterofília, la natació i un llarg etcètera. El motiu d'aquesta utilització ha estat l'augment del rendiment atlètic. Però aquest tipus de pràctiques no són noves. Ja en la Grècia antiga els atletes que participaven en els jocs olímpics feien servir dietes i infusions per tal de millorar el seu rendiment, com ara una mescla de pa, herbes i opi. Una altre tipus de pràctica que es realitzava era la de menjar testicles de xai, pel seu contingut de testosterona. Ja, llavors, aquests tipus de pràctiques eren il·legals.

Les primeres investigacions a Alemanya als anys 30 que desenvolupaven compostos anabolitzants, tenien només un interès científic. Al 1938 es va trobar el primer positiu per propionat de testosterona en halterofília. Però no va ser fins als Jocs Olímpics de Montreal 76, que es van trobar els primers positius per AAS. Des de llavors a totes les competicions internacionals, excepte el cas excepcional dels JJOO de Moscou'80, s'han trobat esportistes que utilitzaven AAS per tal d'augmentar el seu rendiment físic donant resultats positius en els controls antidopatge, per substàncies com la testosterona, la

nandrolona, la metilboldenona (metandienona), l'estanozolol o la tetrahidrogestrinona. Aquestes dades estan disponibles mencionant els esportistes que han donat positiu en [competicions internacionals](#) i als [jocs olímpics](#), especificant el tipus de compost utilitzat. Alguns d'aquest casos han estat el centre d'escàndols com a conseqüència del gran ressò mediàtic que han provocat. Recentment, un dels escàndols que ha sacsejat el Tour de França 2006, ha estat el positiu per **testosterona** que va donar Floyd **Landis**. Els resultats de les anàlisis realitzades va donar que la relació de testosterona:epitestosterona era de 11:1, quan la relació que s'estableix com a límit és de 4:1. Posteriors anàlisis per espectrometria de masses de relació isotòpica van concloure que la testosterona era d'origen exògen, per tant el positiu es va confirmar (notícia publicada al [Mundo Deportivo el 28/07/06](#)). Un altre tipus d'escàndol relacionat amb el ciclisme va ser la “[Operació Puerto](#)”, on es van incautar EPO, hormona de creixement i anabolitzants, entre els quals es va trobar testosterona. A més, aquesta xarxa il·legal gestionava costosos tractaments que consistien en autotransfusions. L'origen d'aquests compostos era de Xina, i utilitzava Internet com a via de distribució. La **nandrolona** també ha estat un dels AAS clàssics que ha tingut més ressò a nivell esportiu. Jugadors de futbol com **Guardiola** (AS Roma), **Gurpegui** (Athletic de Bilbao) o **Dauids** (Juventus de Turín) han donat positiu per aquest esteroide. Aquest tipus d'anabolitzant va ser també utilitzat per atletes de fama internacional com Linford **Christie**, esprinter anglès sancionat al 1999; Merlene **Ottey**, carismàtica atleta jamaicana sancionada al 1999 i Jason **Giambi**, famós jugador de beisbol als USA.



Figura 1.12 Imatge de Ben Johnson a la final dels 100m dels JJOO Seül 88

Sens dubte un dels casos més famosos per positiu per hormones anabolitzants, va ser el comès per [Ben Johnson](#) per **estanozolol** a les olimpíades de Seül 88 a la final dels 100 metres lliures, on va guanyar a Carl Lewis amb record del món inclòs. No obstant, tot i el ressò que va tenir aquest positiu, es va seguir utilitzant i es van continuar trobant més atletes que es dopaven amb aquesta substància, com ara Barry **Bonds** jugador de beisbol americà; Natalia **Shekhodanova**, atleta russa als JJOO de Atlanta 96.

En els últims anys s'ha produït un nou escàndol relacionat amb els AAS, en sintetitzar-se un nou anabolitzant amb l'objectiu que no fos detectat. Aquest nou esteroide és la **tetrahidrogestrinona** (THG), també denominat “el net” (“*the clear*”, vegeu **Figura 1.13**). L'origen del descobriment d'aquest anabolitzant va ser l'enviament als laboratoris antidopatge dels EEUU, localitzat a la

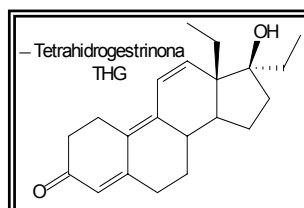


Figura 1.13 Estructura química de la THG (tetrahidrogestrinona)

Universitat de Califòrnia Los Angeles (UCLA), d'una xeringa que contenia aquest anabolitzant. L'equip dirigit pel Dr. [Don Catlin](#) va aconseguir dilucidar l'estructura d'aquest anabolitzant de disseny⁴⁵ en base a dades d'espectrometria de masses i RMN, i va establir la metodologia analítica per detectar aquest esteroide¹⁶. Amb la mostra que va arribar amb la xeringa que contenia THG hi havia una carta que assenyalava, com a responsable de la síntesi i distribució d'aquest esteroide, l'empresa BALCO. Conseqüentment, la USADA (Agència Antidopatge dels Estats Units, *United States Anti-Doping Agency*) va obrir una investigació sobre la distribució de la THG a esportistes d'alt nivell. Sobre aquest afer van quedar esquitxats esportistes de molt alt nivell com [Marion Jones](#), [Tim Montgomery](#), Justin Gatlin, [Dwain Chambers](#), [Kelli White](#) o Chryste Gaines.

Aquest últim escàndol, ha fet que les autoritats estiguin alerta per l'aparició de nous compostos esteroidals amb efectes anabolitzants que siguin preparats per tal de no ser detectats. Així doncs, s'han trobat altres esteroides de disseny per augmentar el rendiment físic dels esportistes d'elit com ara la desoximetiltestosterona (DMT) i la norboletona (NB)⁴⁶. Segons es pot veure a la **Figura 1.14**, la particularitat d'aquests compostos són les petites variacions estructurals respecte a anabolitzants coneguts. La dificultat alhora de detectar-los és que, com que són nous, no es pot saber el seu comportament cromatogràfic ni d'espectrometria de masses.

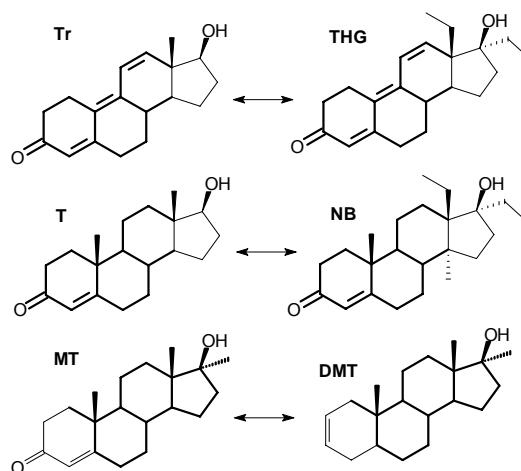


Figura 1.14 Estructures químiques dels nous AAS de disseny Tetrahydrogestrinona (THG), Norboletona (NB) i Desoximetiltestosterona (DMT). Es mostra l'àrea comuna amb altres anabolitzants relacionats estructuralment ja coneguts com la Trenbolona (Tr), Testosterona (T) i metiltestosterona (MT).

1.1.8.3.2 Control antidopatge

La utilització dels AAS en el camp dels esports està totalment prohibida. El organismes que decideixen quins compostos són els prohibits són principalment l'Agència Mundial de control antidopatge o [WADA](#) (*World Anti-Doping Agency*) i el comitè olímpic internacional [COI](#). Després, la resta de federacions internacionals i nacionals de cadascun dels esports inclouen aquest compostos en la seva normativa. La WADA treu cada any una llista de [compostos prohibits](#)⁴⁷. En aquesta llista també indica els esteroides endògens i metabòlits que estan sota sospita. Així, per exemple, informa que la relació de testosterona:epitestosterona no ha de superar el 4:1. Per sobre d'aquesta relació, hi pot haver una sospita fonamentada de dopatge.

Als passats JJOO d'Atenes 04 es va establir una sèrie de mesures o [codi ètic del COI](#) per tal de fer front al dopatge esportiu, en el qual s'estableixen el tipus de compostos que s'han de buscar, la metodologia de recollida de mostra i d'anàlisi⁴⁸, les desqualificacions i les sancions als responsables del positiu. Les sancions poden arribar fins als 2 anys d'inhabilitació per realitzar competicions esportives.

1.1.8.4 Utilització dels AAS per esportistes no professionals

Tot i que aquests tipus de substàncies estan totalment prohibides al camp dels esports professionals i amateurs i regulades pels diferents organismes esportius, els AAS també són consumits per la població general que vol millorar el seu rendiment i aspecte físic als gimnasos, inclosos adolescents. Aquest tipus de població no considera els AAS com un perill per la seva salut i són administrats indiscriminadament, per personal no qualificat.

La moda del culte al cos fa que es caigui en aquest tipus de pràctiques sense tenir en compte el risc per la salut que puguin ocasionar. Als EEUU s'ha estimat que s'han estat utilitzats per nens prepuberals i pubertats, de entre 11-16 any i que el 1-2% del total han pres algun cop AAS⁴⁹. Últimament, la distribució d'aquest tipus de substàncies té lloc a través d'Internet. Existeixen multitud de pàgines web on donen informació de les dosis, modes d'administració i molta informació sobre els tipus de compostos assequibles (www.steroid.com, www.bodybuilding.com, www.anabolandia.com, www.mesomorphosis.com, ...).

Degut al perill per la salut pública els diferents estaments dels estats actuen amb incautacions de les xarxes que distribueixen i subministren aquest tipus de AAS. Diverses redades s'han realitzat pels diferents cossos de seguretat de l'estat en la que s'han incautat nombrosos AAS pel consum en gimnasos, com ara testosterona, en les seves diferents formes d'administració, nandrolona, estanozolol, metilboldenona i altres més, en les seves formulacions comercials. A continuació es mostren un recull de decomisos per les diferents policies:

- “[Operació Cachas](#)” es van descobrir 100000 dosis d'estanozolol (28/09/02).
- “[Operació Dinamita](#)” es van trobar estanozolol, testosterona, nandrolona i un llarg etcètera (03/04/03).
- Una xarxa espanyola que traficava amb estupefaents i hormones anabolitzants va ser detinguda per la [DGP 30/06/04](#), segons es pot visualitzar al [vídeo](#) es pot veure

les formulacions dels anabolitzants més comuns com Winstrol (estanozolol), decanoat de nandrolona entre d'altres.

- Cauen 126 persones per vendre anabolitzants en gimnasos, desarticulada per la [DGP 16/07/04](#).
- “[Operació Mamut](#)” 70 persones detingudes per produir i traficant amb substàncies anabolitzants (01/06/05).
- “[Operació Ginva](#)” s’intervenen milers de substàncies dopants preparades per distribuir a gimnasos (10/07/06).

1.1.8.5 Utilització i regulació dels AAS en cavalls de competició

El dopatge de cavalls pels seus preparadors també el realitzen amb AAS. D’aquesta manera busquen un augment del rendiment del cavall, ja sigui per prestigi internacional, per diners o per guanyar curses. L’organisme que vetlla per un control dels animals és la FEI (Federation for Equestrian Sports) prohibeix la utilització d’aquest compostos a la seva [llista de substàncies prohibides](#)⁵⁰. Segons aquesta organització a l’any 2000 un 13% dels positius de dopatge en cavalls eren corresponents a AAS, tal i com es pot observar a la **Figura 1.15**.

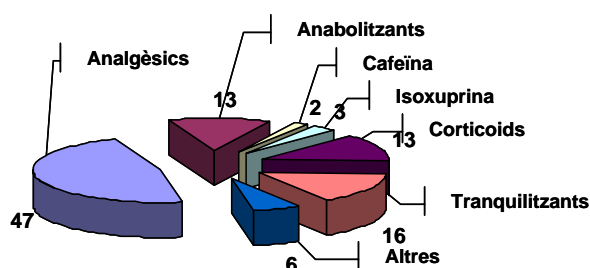


Figura 1.15 Grup de substàncies dopants trobades per la FEI a l’any 2000.

Els compostos que s’han trobat amb més assiduïtat han estat la nandrolona, la metilboldenona i l’estanozolol⁵¹.

1.1.9 Tècniques analítiques emprades per la detecció d'AAS

Les metodologies més emprades per la detecció d'AAS es basen en tècniques cromatogràfiques. Degut a les exigències de les diferents institucions competents, ja sigui en el camp de l'esport o del veterinari, es demana que la tècnica sigui la més robusta i sensible possible. Per tant, en aquests temps, les tècniques cromatogràfiques basades en la detecció per espectrometria de masses estan considerades com a mètodes de referència per la realització del control analític de mostres biològiques.

1.1.9.1 Matrius

De les matrius analitzades per la detecció d'AAS, la més freqüent és l'orina. El perquè d'aquesta matriu s'ha de buscar en la seva fàcil recopilació, i el que és més important, com els AAS s'excreten majoritàriament per aquesta via, la quantitat que es pot trobar és més important. Una matriu que s'està implantant és el pèl, ja que és una matriu senzilla tant a l'hora de recollir-la com pel tipus tractament necessari abans de l'anàlisi. S'ha de mencionar que aquests tipus de compostos també s'analitzen, sobretot en animals, en altres òrgans com ara el fetge, músculs, ronyons o teixit adipós.

1.1.9.2 Tractament de mostra

El tractament de mostra és un dels colls d'ampolla de l'anàlisi. Les tècniques emprades requereixen una neteja de mostra. Es solen emprar etapes prèvies de purificació per fase reversa, intercanvi iònic, extraccions amb dissolvent orgànic, fins que s'obté l'extracte suficientment pur per ser analitzat. Un exemple de protocol d'anàlisi per GC-MS de AAS es mostra a la **Figura 1.16**⁵².

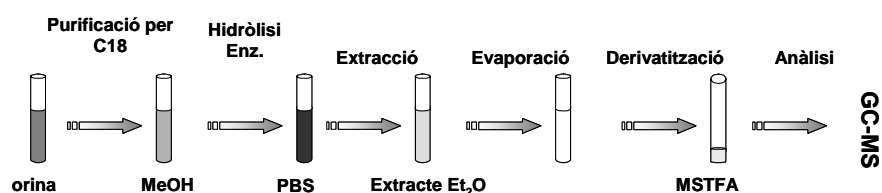


Figura 1.16 Representació esquemàtica d'un protocol de neteja de mostra per l'anàlisi de AAS per GC-MS.

A més, en molts casos és necessari un pas previ de hidròlisi dels conjugats glucorònid/sulfat, majoritàriament en mostres d'orina. Tal i com es va explicar a l'**apartat 1.1.7.2**, els AAS experimenten un metabolisme en fase II que consisteix en la formació dels conjugats a glucorònid i/o sulfat. Per tal d'obtenir el compost lliure s'aplica una hidròlisi química o enzimàtica. En aquest últim cas es fa mitjançant una β -glucoronidasa que hidrolitza tant glucorònids com sulfats.

1.1.9.3 Mètodes d'anàlisi

A la **Taula 1.9** estan recopilades les tècniques cromatogràfiques que s'han desenvolupat per la detecció de AAS en matrius biològiques. Tal i com es pot observar, els LOD que s'han obtingut s'ajusten a la normativa europea on les MRPLs per aquests compostos i estan al voltant de les 1-5 ppb, depenent de l'analit a detectar. Com que el sistema de detecció és per MS per cadascun dels compostos a determinar s'han hagut de trobar els ions majoritaris i secundaris per tal de monitoritzar el compost. En el cas de GC, aquests compostos s'han hagut de derivatitzar per tal de que cromatografiïn correctament per la fase. Els agents que s'utilitzen per derivatitzar solen ser agents sililants tipus MSTFA o BSTFA, dels quals existeixen comercialment mesclades d'aquests agents per un millor rendiment de sililació. Aquest tipus de metodologia permet una monitorització d'una gran quantitat de AAS amb bons límits de detecció^{27-29, 53-55}. Altres metodologies que s'han desenvolupat han estat per determinar el perfil d'excreció i metabolisme de determinats anabolitzants^{23, 25, 32, 56, 57}. Alguns AAS han estat causa de controvèrsia, ja sigui pel seu caràcter endogen i la seva concentració basal, com ara la T, o perquè hi ha dubtes respecte d'una possible biosíntesi endògena, com la NT i la α -B. En el cas de la T, s'han realitzats diferents estudis per distingir el caràcter exogen/endogen de la T. Un dels criteris ha estat l'establiment d'una relació de testosterona:epitestosterona. S'ha demostrat que el perfil d'excreció de la T endògena conté una relació no superior a 1:4, mentre que si és exògena està per sobre d'aquest valor⁵². Una altra tècnica és mirar la relació de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de la testosterona. Això es fa mesurant el ^{13}C de la testosterona i dels metabòlits que s'excreten (epiT i etiolanolona) i comparant-lo amb el de la DHEA (precursor de la

Introducció

T endògena, que no apareix quan s'administra). Si la diferència és aproximadament 0, és endògena, però si la diferència és superior al 1% de variabilitat isotòpica, és positiu²⁴.

Taula 1.9 Tècniques cromatogràfiques desenvolupades per la detecció de AAS.

Matriu	Tècnica	Analits	LOD	Ref
Orina bovina	GC-MS	NT, T, B, MT, Tr	0.5 ng·mL ⁻¹	53
	GC-C-IRMS	T (¹³ C/ ¹² C)		24
	LC-MS-MS	CLAD, 16bOH-St, Tr(a), B(a,b)	1 ng·mL ⁻¹	27
	LC-MS	B i metabòlits		56
	GC-MS	MT, Noretandrolone, MB		58
Orina equina	LC-MS	St i metabòlits	0.1 ng·mL ⁻¹	32
	LC-MS/MS	T, NT, B, THG, Tr i St, altres	25 pg·mL ⁻¹	54
Orina humana	HPLC-MS-MS	T/ET i gluc./sulf.		23
	HPLC-MS-MS	T/ET i gluc./sulf.	0.1 ng·mL ⁻¹	59
	GC-MS	NT i metabòlits	0.6 ng·mL ⁻¹	25
	GC-HRMS/TOF	Metabòlits de MB, MT, St i NT	2 µg·L ⁻¹	29
	LC-MS-MS	17α-alkilsteroids com MB, St,....	0.1-2 ng·mL ⁻¹	30
	GC-HRMS	MB, St i metabòlits		60
	GC-MS-MS	B, MB, MT, NT, St, oxandrolona, furazabol	Aprox. ng·mL ⁻¹	28
	HPLC-MS	B, T/DHEA, MT	0.012-0.107 µg·mL ⁻¹ *	61
Fems	GC-MS	B i metabòlits		62
Sèrum boví	GC-SIM-MS	NT	40 ng·mL ⁻¹	63
	LC-APCI-MS-MS	NT (α, β), T (α, β)	0.1 ng·mL ⁻¹	64
Teixits	LC-MS	St	0.2 µg·Kg ⁻¹	65
	GC-IT-MS		0.1-0.4 µg·Kg ⁻¹	66
	GC-MS	23 esteroides	5-100 ng·Kg ⁻¹	67
Pèl	LC-MS-MS	T, B	2-5 ng·g ⁻¹	57
	GC-MS	MB	2 pg·mg ⁻¹	68
	GC-MS-MS	NT (α, β), B (α, β), T (α, β), MT	1-10 ng·g ⁻¹	55
	GC-MS	NT, B, MT, MB, T i esters	0.08-4.80 pg·mg ⁻¹	69

Un altre anabolitzant que ha creat controvèrsia ha estat la nandrolona. Un treball realitzat per Le Bizec et al. va demostrar que la concentració d'un dels metabòlits de la nandrolona, la 19-norandrosterona, incrementava el seu valor de 2 a 4 en atletes que es sotmeten a un esforç intens. Els nivells de concentració endògena estan entre 0.06 i 0.47 ng·mL⁻¹ en orina. En tot cas estarien per sota dels nivells establerts per la WADA, que pel cas de la [19-norandrosterona](#) es de 2 ng·mL⁻¹ (vegeu **apartat 1.1.8.3.2**).

Un altre font de controvèrsia, és el possible caràcter endògen de la boldenona en ramat boví, porcí o equí. En aquest cas estan intentant saber la procedència o si realment es capaç de biosintetitzar-se⁷⁰. S'ha demostrat que s'han trobat restes d'aquest anabolitzant o del seu metabòlit en animals no tractats amb aquesta hormona. Les concentracions que s'han trobat són de l'ordre de els 0.05-2µg·L⁻¹, depenent de l'edat o de la matriu que s'ha agafat per l'anàlisi. No se sap ben bé quin és l'origen d'aquest anabolitzant, però, s'ha relacionat amb la dieta que s'administra als animals, molt rica en fitoesterols, els quals podrien ser els productes de partida per les biosíntesis de α o β boldenona⁷¹.

Altres tipus de metodologies emprades per la detecció de AAS són els mètodes basats en receptors moleculars selectius com els assaigs immunoquímics. Existeixen assaigs tipus ELISA per la detecció de diferents AAS i també s'han començat a descriure biosensors basats en anticossos per la detecció de diferents compostos esteroidals. Aquest tipus de metodologies s'explicaran a continuació.

1.2 Tècniques basades en la utilització de receptors específics

Les tècniques basades en la utilització de receptors específics es basen en mecanismes de reconeixement molecular. Aquests juguen un paper fonamental en la majoria de processos biològics, com és el cas de la unió enzim-substrat, anticòs-antigen (Ac-Ag) o fins i tot, com s'ha explicat anteriorment, hormona-receptor nuclear. Tots ells estan basats en el model del pany i la clau, en la que el receptor és específic pel seu substrat a través de geometries estructurals complementàries i d'interaccions específiques en zones concretes de la zona d'interacció. Les interaccions que s'estableixen són de tipus no covalent, és a dir, electrostàtiques, ponts d'hidrogen, forces de Van der Waals o per interaccions de sistemes electrònics deslocalitzats. L'especificitat d'aquest fenomen de reconeixement molecular selectiu de les biomolècules s'ha explotat per detectar i quantificar diferents tipus d'analits, com marcadors de determinades malalties, metabòlits, drogues, biomolècules, etc. Aquest tipus d'anàlisi pot detectar productes a nivell de traces, amb una excel·lent especificitat i amb senzills procediments per preparar la mostra⁷². Majoritàriament han estat basats en el reconeixement per part d'anticòsos, que són els que han donat millors resultats, produint tècniques immunoquímiques, que tenen un ampli ventall d'aplicacions, no només a nivell clínic sinó també en àrees mediambientals i agroalimentàries, per la detecció de contaminants i residus^{39, 73}. Existeixen altres tipus de metodologies associades a la utilització de receptors específics per la determinació de petites molècules ja sigui en alimentació, mediambient o clínica, com poden ser les basades en la utilització d'enzims, receptors de membrana, receptors nuclears o DNA⁷⁴.

Un altre tipus de receptors que s'han començat a desenvolupar en la passada dècada són els receptors moleculars d'origen sintètic. Aquests intenten mimetitzar el fenomen de reconeixement com a la natura però evitant les limitacions i inconvenients de l'ús de biomolècules. Els avantatges potencials d'aquest tipus de receptors són l'estabilitat en segons quins medis, el procés d'obtenció, que a vegades pot ser car, llarg i tediós en el cas de les biomolècules. Un altre avantatge és la llibertat d'elecció de l'analit d'interès, de manera que és teòricament possible la producció de receptors sintètics específics per

qualsevol tipus d'analit. D'aquesta manera, dins dels receptors sintètics, s'han desenvolupat sistemes en els quals la cavitat de reconeixement que contenen residus amb uns determinats punts d'interacció on aquests són específics per l'analit a determinar. Uns d'aquests sistemes són els Polímers d'Empremta Molecular (*MIP, Molecular Imprinted Polymer*), que recentment han tingut molt ressò per la seva fàcil i econòmica forma de produir-los^{75, 76}. Un altre tipus de receptors sintètics són els aptàmers, els quals a partir d'una quimioteca de cadenes de DNA arriben a una seqüència única de DNA que reconeix selectivament l'analit a determinar.

1.2.1 Receptors d'origen biològic

1.2.1.1 L'anticòs

Els anticòssos són proteïnes de la família de les immunoglobulines. Aquest tipus de proteïna es genera a partir de la resposta immune a un agent extern (antigen) per part de l'organisme hoste. Existeixen diferents famílies d'immunoglobulines: IgA, IgD, IgE, IgG i IgM), que es diferencien per la càrrega, dimensions, morfologia, així com, el nombre i tipus de carbohidrats units. En el sèrum de mamífers, la classe més abundant on, són la de les IgG, representant un 80% del total de Ig's. Les IgGs són les més utilitzades a les tècniques immunoquímiques. El pes molecular de les IgG està al voltant dels 150 KDa i estan estructurades per dues parelles de cadenes polipeptídiques, dues de pesades (cadenes H, *heavy chain*) i dues de lleugeres (cadenes L, *light chains*), tal i com es mostra a la **Figura 1.17**. Els oligosacàrids estan units covalentment a les cadenes H. Les cadenes H estan unides entre sí a través de dos ponts disulfur, i la cadena H i L estan unides per un pont disulfur.

L'estructura global presenta regions constants i variables pel que fa a la seqüència d'aminoàcids. El fragment Fc (fracció cristal·litzable) és la regió constant i està involucrada en la regulació immunològica, mentre que el fragment Fab (*antibody binding fraction*) és la que conté la fracció variable Fv (representat amb color més clar a la figura anterior), que és on s'estableixen els punts de reconeixement.

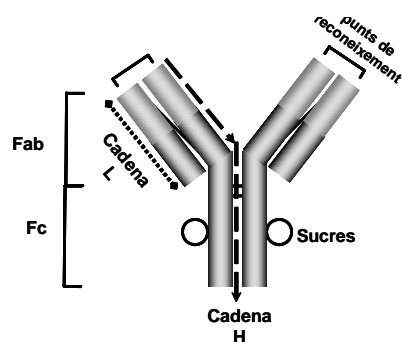


Figura 1.17 Estructura esquemàtica de les IgG.

Els anticossos s'han utilitzat com a instruments de recerca mitjançant diferents tipus de tècniques com la citometria de flux, el *Western blot* o els immunoassaigs (IAs). La citometria de flux es fa servir per la separació de les proteïnes d'altres molècules que provenen de cèl·lules. El *Western blot* s'utilitza per la identificació de proteïnes combinant la separació mitjançant electroforesis, la transferència a una membrana i posterior identificació de les proteïnes d'interès amb un anticòs específic. Finalment, els immunoassaigs són mètodes analítics que permeten la identificació i quantificació de diferents analits tant molècules discretes com proteïnes.

El primer immunoassaig va ser desenvolupat per Yalow et al.^{77, 78} per la determinació d'insulina en sèrum. El tipus d'immunoassaig desenvolupat va ser radioimmunoassaig (RIA) emprant anticossos específics per insulina i fent servir un marcador radioactiu d'insulina. Des d'aquest moment s'han desenvolupat diferents immunoassaigs per la determinació de molècules petites i proteïnes no tan sols a l'àmbit de la clínica, sinó per la determinació de contaminants tant mediambientals com al camp de l'agroalimentària. Actualment, existeixen diferents metodologies per la producció de diferents tipus d'anticossos com ara són els anticossos policlonals (PAC), els anticossos monoclonals (MAC) i els anticossos recombinants (RAC).

A priori, es podria produir un anticòs (Ac) per qualsevol tipus d'analit, però, existeix la limitació que compostos amb un pes molecular inferior 1000Da no donen resposta immune per sí sols. Per tant, per compostos de baix pes molecular s'hauria de sintetitzar un anàleg a l'analit que mimetitzi les seves propietats físico-químiques (haptè) i unit a una proteïna transportadora⁷⁹. El conjugat generat serà capaç de produir resposta immune.

Els **anticossos policlonals** s'obtenen a partir del sèrum obtingut d'animals immunitzats. D'aquesta manera s'obté un conjunt d'IgGs que contenen els diferents clons que reconeixen diferents parts de l'immunogen. Dintre del conjunt hi hauran fraccions d'IgG que tindran més afinitat per determinats epítops o determinants antigènics de la molècula. Els animals hostes que es solen utilitzar per l'obtenció de PAc són mamífers, i dintre dels mamífers, els més comuns són els conills, però s'han obtingut també a partir de cabres, porcs, ovelles, cavalls o camells. En tot cas, el procés de producció dels PAc, si ja es disposa de l'haptè d'immunització, és senzill (vegeu **Figura 1.18**). El major inconvenient de l'ús de PAc és la reproduïbilitat que pot haver entre animal a animal.

Els **anticossos monoclonals** s'obtenen a partir de la fusió de les cèl·lules B de la melsa d'animals que han estat exposats a l'antigen, amb cèl·lules tumorals de mieloma múltiple (vegeu **Figura 1.18**). Aquesta fusió origina els híbridomes que poden multiplicar-se amb molta facilitat i indefinidament, i, a més, poden produir gran quantitat d'anticossos. Les diferents colònies d'híbridoma es poden aïllar fàcilment i avaluar l'especificitat contra l'antigen immunitzat, mitjançant tècniques tipus ELISA⁸⁰. Això permet fer una selecció dels clons i els que interessen s'aïllen i es tornen a multiplicar. Aquest procés es va repetint fins trobar un únic clon específic contra l'antigen. Aquest tipus d'estratègia és molt més cara i tediosa en comparació per obtenir PAc. Com avantatge, aquesta metodologia proporciona una font inesgotable d'anticossos. Com a contrapartida pot existir el perill que durant el cribatge dels diferents clons es puguin perdre aquells clons que tenen una més gran afinitat.

Els **anticossos recombinants** és un tipus de producció d'anticossos en absència de immunització animal⁸¹. A partir d'una llibreria de gens d'anticossos i mitjançant PCR es realitza un cribatge després d'exposar aquestes llibreries a determinats microorganismes. Un cop que aquests microorganismes, generalment bacteris, contenen el plàsmid amb l'ADN que codifica els anticossos, aquest anticossos s'expressen units a membrana del bacteri (vegeu **Figura 1.18**). Mitjançant tècniques tipus ELISA es realitza el cribatge per trobar els clons de bacteris que produeixen l'anticòs.

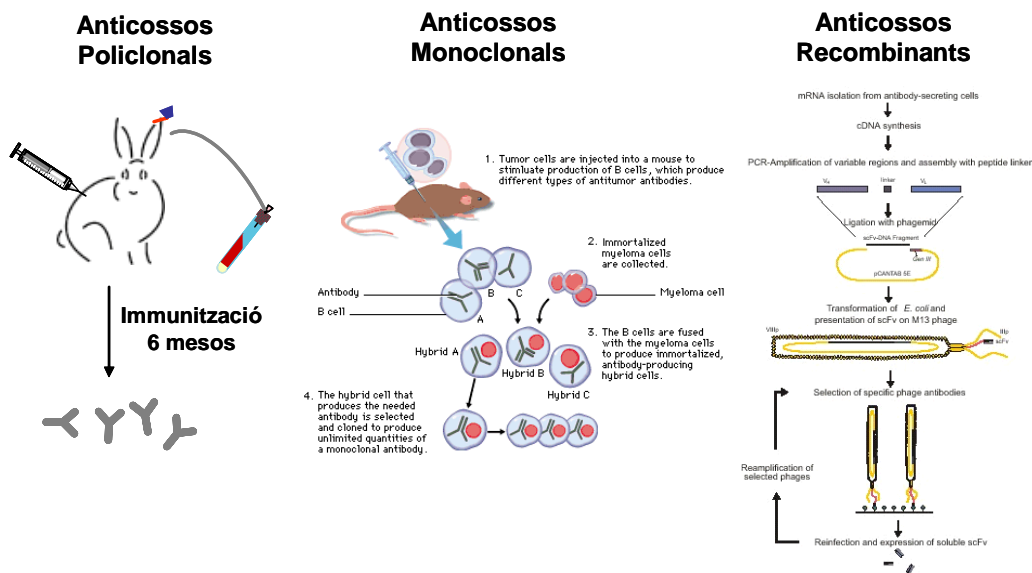


Figura 1.18 Esquemes de producció d'anticossos policlons, monoclonals (figura extreta de "Monoclonal antibody," Microsoft® Encarta® Online Encyclopedia 2006) i recombinants (figura extreta de Kramer et al.⁸²).

1.2.1.2 Tècniques immunoquímiques

L'element clau de les tècniques immunoquímiques és l'anticòs, i es basen en la reacció de reconeixement de l'anticòs per l'antigen, on s'estableix un equilibri definit per una constant d'afinitat (K_a):



L'ordre de magnitud que aquesta constant pot arribar a assolir és de l'ordre de $10^{10} M^{-1}$. Aquest elevat grau d'afinitat s'ha emprat per al desenvolupament de tècniques per la detecció tant de compostos proteics o molècules petites, com de contaminants o de fàrmacs a nivell de traces. També s'han desenvolupat mètodes de tractament de mostra per aïllar el compost d'interès d'una matriu complexa.

Dintre de les tècniques immunoquímiques, els immunoassaigs són els més utilitzats. Quan aquest tipus d'assaigs s'apliquen a la detecció d'antígens de baix pes molecular, el complex As-Ag es quantifica mitjançant marcadors i, normalment, sota condicions de

competència. El procediment general és posar en contacte l'analit, el derivat anàleg marcat adientment (a una concentració fixa) i l'anticòs (també a una concentració fixa). La resposta vindrà quantificada per la quantitat d'antigen marcat unit a l'anticòs en presència de diferents concentracions d'analit. Els marcadors més utilitzats fins ara són els de tipus enzimàtic, que normalment són HRP (*Horseradish peroxidase*), AP (*Alkaline Phosphatase*) o GOx (*Glucose oxidase*), són coneguts com immunoassaigs enzimàtics (EIA, *Enzyme ImmunoAssay*), però, anteriorment, es van desenvolupar altres tipus d'immunoassaig on es feien servir marcadors radioactius, RIA (*Radio ImmunoAssay*), però, aquest tipus de marcadors s'han substituït per altres menys perjudicials i fàcils de manipular. Uns altres tipus de marcadors són basats en marcadors fluorescents (FIA, *fluoroimmunoassay*) o bioluminiscent (CLIA, *chemiluminiscent immunoassay*).

Els immunoassaigs es poden realitzar en solució (format homogeni) o sobre un suport sòlid (format heterogeni). El suport poden ser tubs de plàstic, microesferes, plaques de poliestirè. El format més comú és sobre un suport de microplaques de poliestirè en format de 96 o 384 pouets. D'aquesta manera es poden processar una gran quantitat de mostres simultàniament utilitzant un volum petit de mostra.

1.2.1.2.1 ELISA

L'ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) han estat un dels formats heterogenis més emprats. Existeixen diferents configuracions, tal i com es mostra al **Figura 1.19**. Els formats directes i indirectes són els més utilitzats per la determinació i quantificació de molècules de baix pes molecular. Per altra banda el format tipus sandvitx es realitza per a determinar proteïnes o pèptids, amb un pes molecular superior a 1000Da.

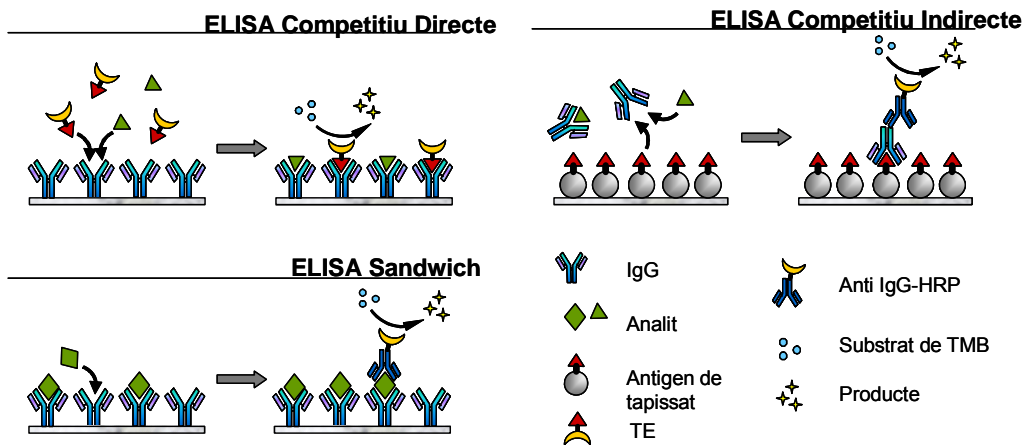


Figura 1.19 Formats ELISA més utilitzats

ELISA competitiu directe. En aquest format, l'anticòs s'immobilitza sobre la placa, i després d'una etapa d'incubació i rentat, s'addiciona l'haptè unit al marcador enzimàtic i l'analit. D'aquesta manera s'obté una resposta inversament proporcional a la quantitat d'analit.

ELISA competitiu indirecte. En aquest cas, l'antigen de tapissat (haptè unit a proteïna transportadora com la BSA) s'immobilitza a la placa. Un cop incubat i rentat, s'afegeix l'anticòs i l'analit. Després d'una altra etapa de rentat, s'afegeix el marcador enzimàtic que ens donarà la resposta, aquest consisteix en una Anti-rabbit IgG-HRP (AntiIgG). Com anteriorment, la quantitat de mostra serà inversament proporcional al senyal obtingut.

ELISA Sandwich. En aquest format, s'immobilitza l'anticòs i després s'afegeix l'analit. En una tercera etapa s'addiciona un altre cop l'anticòs específic. En aquest cas, el senyal serà directament proporcional a la quantitat d'analit. S'ha de tenir en compte que, per aquest tipus de format, l'analit ha de tenir més d'un determinant antigènic disponible per interaccionar simultàniament amb dos anticossos, com ara les proteïnes.

1.2.1.2.2 Cromatografia d'immunoafinitat

La cromatografia d'immunoafinitat (IAC) consisteix en un suport polimèric on s'han acoblat covalentment els anticossos específics de l'analit a determinar. Aquest tipus de

metodologia s'aplica a l'anàlisi traces com etapa prèvia i com a fase d'extracció selectiva, el que permet una purificació i preconcentració de la mostra⁸³. Els anticossos que estan immobilitzats al suport polimèric tenen la capacitat de retenir selectivament l'analit o compostos estructuralment relacionats. El procediment general consisteix en una etapa de càrrega de mostra, rentat, elució de l'analit i condicionament de la columna. El tipus d'interacció entre l'analit i l'anticòs està regit per forces no covalents, per tant es poden desorbir variant la força iònica del medi, el pH o utilitzant dissolvents orgànics. La cromatografia d'immunoafinitat es pot aplicar tant *off-line* com *on-line*⁸⁴ de manera que es poden acoblar a sistemes analítics com les tècniques cromatogràfiques.

1.2.1.2.3 Immunosensors

S'entén com a biosensor aquell dispositiu on l'element de reconeixement d'origen biològic (anticossos, enzims, receptors de membrana, receptors nuclears...) està íntimament unit a un transductor. L'element de reconeixement, en el cas dels immunosensors, és l'anticòs que reconeix selectivament l'analit a determinar. El transductor és l'element de converteix el bioreconeixement en un senyal mesurable. Existeixen diferents tipus de transductor com l'òptic, electroquímic, piezoelèctric o tèrmic.^{74, 85, 86}

1.2.1.3 Avantatges i limitacions de les tècniques immunoquímiques

Generalment les tècniques immunoquímiques es caracteritzen per la seva simplicitat i rapidesa alhora de realitzar l'anàlisi de mostres, així com el gran nombre de mostres que poden ser realitzades en una mateixa anàlisi. Un dels avantatges que poden associar-se a les tècniques immunoquímiques és l'abaratiment que representa l'anàlisi de mostra respecte altres tècniques. Un altre avantatge és l'aplicació que es pot donar a aquest tipus de tècniques en anàlisi de camp, ja que es poden desenvolupar dispositius de fàcil ús, amb una resposta ràpida per la realització d'anàlisi en la zona de recollida de mostra. Per tant, aquest tipus de tècniques són ideals per la realització i control de un gran nombre de mostres. Però, les tècniques immunoquímiques també tenen una sèrie de limitacions i inconvenients. Per exemple, l'anàlisi de mostres reals requereix un estudi de les

interferències que provenen de la matriu a analitzar i que poden donar un error a la mesura, com ara una sobreestimació o falsos positius. Aquest tipus d'interferències poden provenir del reconeixement, per part dels anticossos, de compostos estructuralment relacionats (fenomen de reactivitat creuada). Aquest reconeixement pot ser un inconvenient si els compostos relacionats no tenen cap tipus de relació amb l'analit a determinar, però, pot ser un avantatge si estan relacionats amb l'analit i així permetria una determinació simultània. Un altre tipus d'interferències són les de tipus no específic (efecte matriu) que pot provenir dels canvis en el medi (com pH, conductivitat, etc) o de la interacció no específica dels immunoreactius amb altres components de la matriu (com ara greix, proteïnes, etc). Aquest tipus d'interferències es poden minimitzar per tal d'obtenir una mesura fiable. A les tècniques immunoquímiques l'aparició de falsos negatius és mínima, de manera que aquest tipus de tècniques són ideals com a eines de cribatge massiu de mostres, complementant-se amb les tècniques de rutina, com poden ser els mètodes cromatogràfics.

1.2.1.4 Tècniques immunoquímiques utilitzades per AAS

Donada l'activitat hormonal d'aquest compostos, van ser dels primers analits determinats mitjançant tècniques immunoquímiques com a eines per l'anàlisi clínica. Les primeres tècniques immunoquímiques que es van desenvolupar per la detecció d'AAS van ser els RIA. Un dels primers treballs que es van publicar va ser al 1971, on es descriu l'obtenció d'anticossos específics contra la T⁸⁷. A partir d'aquest moment es van desenvolupar diferents tipus d'assaigs sintetitzant diferents tipus d'haptens on es canviava la posició o el tipus de braç espaiador⁸⁸⁻⁹¹. Els RIA van agafar molta popularitat com a eina de cribatge fins a arribar el punt de que es va implementar als laboratoris de control dels JJOO de Montreal 1976⁹². Posteriorment es van desenvolupar RIAs per metabòlits de la NT i la T⁹³. Altres tipus d'immunoassaigs que es van desenvolupar incorporaven la detecció quemilumiscents tan per T⁹⁴ com per MT^{95, 96} o NT⁹⁷. També, es van desenvolupar assaigs immunoenzimàtics en fase sòlida, precursor dels ELISAs⁸⁹.

Els ELISAs que s'han desenvolupat i que s'han publicat per la detecció d'AAS es troben a la **Taula 1.10**. La detectabilitat de tots aquest immunoassaigs està de l'ordre de les ppb en matrius biològiques.

Taula 1.10 Immunoassaigs enzimàtics per la detecció de AAS aplicats a matrius biològiques

Assaig	Analit	LOD	Matriu	Ref
ELISA	Testosterona	10 pg·well ⁻¹	Sèrum humà	98
	Testosterona	74		
ELISA	Nortestosterona	131 pg·mL ⁻¹	Orina bovina	99
	Metiltestosterona	266		
ELISA	Boldenona	26 pg·well ⁻¹	Orina	100
ELISA	Estanozolol	-	Tampó	101
ELISA	Estanozolol	0.6 ng·mL ⁻¹	Orina	102
ELISA	17a-alquil anabolitzants	aprox. ppb	Orina equina	31
ELISA	Trenbolona	0.1 ppb	Carn	103
		0.1 ng·mL ⁻¹	Orina	
ELISA	Trenbolona	0.02 ng·g ⁻¹	Teixit muscular	104
ELISA	Nandrolona	1 ng·mL ⁻¹	Orina equina	105
EIA	Nandrolona	0.98 pg·well ⁻¹	Orina bovina	106
ELISA	Nandrolona	2 ng·mL ⁻¹	Bilis bovina	107

Un format en el que els anticossos per AAS han tingut una gran aplicació han estat els immunosorbents (IS) per les etapes de purificació de mostra abans de l'anàlisi per tècniques cromatogràfiques. Aquest tipus de tècnica, denominada cromatografia d'immunoafinitat (IAC), ha permès minimitzar l'efecte matriu i millorar la relació senyal-soroll. Per exemple els immunosorbents s'han emprat per detectar trenbolona en orina bovina¹⁰⁸. S'han fet servir per la purificació simultània d'estanozolol i metilboldenona d'orina humana i posterior anàlisi per GC-HRMS⁶⁰, coneguda com cromatografia de multi-immunoafinitat (MIAC, *Multi-Immunoaffinity chromatography*). Aquest tipus de tècnica s'utilitza diferents anticossos amb diferent especificitats ancorats sobre la mateixa sefàrosa i s'ha emprat amb èxit per la detecció de NT i MT¹⁰⁹. Dubois et al.¹¹⁰ va utilitzar una MIAC per l'aïllament de dotze compostos anabolitzants (metiltestosterona, nortestosterona, fluoximesterona, zeranol, clostebol, etinilestradiol, dietilstilbestrol, i trenbolona) en orina i fems d'origen boví abans de l'anàlisi per GC-MS. Per trenbolona i

nortestosterona es va desenvolupar un sistema de detecció basat en anticossos on es va acoblar l'IAC amb l'ELISA assolint un LOD de 0.1 ppb per trenbolona en carn¹⁰³. Machnik et al. va fer servir l'IAC per la purificació de diversos 17a-metil-17b-hidroxisteroides (metabòlits de St i MT) a partir d'uns anticossos produïts per MT¹¹¹.

Tant en el camp dels assaigs immunoenzimàtics com dels immunosorbents existeixen kits comercials per la determinació d'AAS en matrius biològiques, majoritàriament en orina, tant d'origen boví, equí o humà. Companyies com [Abcam](#), [Randox Laboratories](#), [Neogen Corporation](#), [Tecna](#) o [Oxfor Biochemical Research](#), tenen una àmplia gamma d'anticossos, antigens o inclòs kits comercials per l'anàlisi de AAS.

Respecte al desenvolupament d'immunosensors per la detecció d'AAS, darrerament han aparegut diversos dispositius on s'ha aconseguit amb èxit aplicar l'immunosensor per la mesura en matrius biològiques. Arran de la nostra participació en el projecte RaDAR que consistia en el desenvolupament d'un biosensor per la determinació d'AAS, va acabar amb un prototip basat en la detecció electroquímica de boldenona i metilboldenona amb un LOD de 30 pg·mL⁻¹ i 120.3 pg·mL⁻¹ en mostres d'orina bovina, respectivament¹¹². Darrerament es va desenvolupar un nou biosensor basat en la detecció òptica mitjançant la ressonància de plasmò per la detecció d'estanozolol¹¹³ amb LOD de l'ordre nM en tampó. Aquest nou biosensor va tenir un ressò mediàtic on es va poder veure a les notícies de TV3 (vegeu [vídeo](#)). Una forma de visualització d'aquest biosensor és a través d'aquests vídeos, on el [vídeo 1](#) representa el comportament del biosensor en absència d'estanozolol, i el [vídeo 2-3](#) es representa quan hi ha estanozolol. Aquest sensors han fet servir els anticossos i/o conjugats proteics desenvolupats en aquesta tesi doctoral.

1.2.2 Receptors de tipus sintètic

1.2.2.1 Polímers d'empremta molecular

Els polímers d'empremta molecular (*MIP*, *Molecular Imprinted Polymers*) són polímers tridimensionals altament entrecreuats i porosos que han estat preparats en presència d'una molècula motlle i en presència d'un dissolvent (porogen), de manera que un cop eliminada la molècula motlle del polímer, ens queda un polímer que conté cavitats

específiques produïdes a través de la interacció entre la molècula motlle i els monòmers escollits. En aquestes cavitats s'estableix una interacció de reconeixement de tipus específic per la molècula motlle. A la **Figura 1.20** es mostren les diferents etapes en el procés d'empremta molecular de manera esquematitzada.

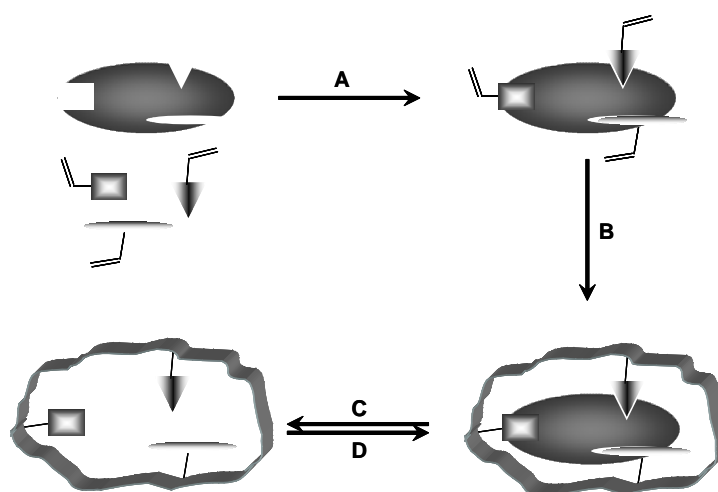


Figura 1.20 Procés d'empremta molecular. A) ordenació dels monòmers amb la molècula motlle, B) copolimerització dels monòmers, l'agent reticulant i el motlle, C) eliminació del motlle i obtenció del MIP, D) captació del motlle pel MIP.

Per tal d'obtenir un MIP s'han de tenir en compte quatre components principals: la molècula motlle, el monòmer, l'agent reticulant i el dissolvent. La molècula motlle és l'analit que volem determinar (o un anàleg estructuralment relacionat) i s'han de localitzar els possibles punts d'interacció amb els components del polímer. Els grups funcionals representatius de la molècula motlle hauran d'interaccionar amb els monòmers. És aquí on rau la clau que ens permetrà obtenir una especificitat respecte altres analits, el tipus d'interacció entre monòmer:motlle. Un factor clau és l'elecció d'aquest monòmer buscant una millor interacció amb els grups funcionals representatius del motlle. Per tal de "congelar" el clúster molecular format entre els monòmers i el motlle s'addiciona l'agent reticulant, que li donarà rigidesa i formarà la xarxa polimèrica. Finalment, el dissolvent (o porògen) és el medi a través del qual tindrà lloc la polimerització, i un factor important, afavorirà o empitjorarà la interacció que es pugui establir entre monòmer:motlle (en el cas de polimeritzacions no covalents). A més, serà el

responsable de la porositat del polímer i de la formació de canals perquè la cavitat d'interacció sigui accessible.

Existeixen dos estratègies de polimerització per la producció de MIPs: covalent i no covalent. L'estratègia covalent va ser introduïda pel Wulff *et al.*¹¹⁴ i consisteix en la formació d'enllaços covalents reversibles (formació d'imines, acetals, esters fosfònics o boronats) entre el monòmer i la molècula motlle, seguit de la polimerització. La posterior eliminació del motlle es realitza, generalment, mitjançant una hidròlisi. Un cop la cavitat queda lliure la subseqüent unió de l'analít requerirà de la formació dels mateixos enllaços covalents.

Respecte a l'aproximació no covalent, és aquella en la que s'estableixen una sèrie d'interaccions no covalents entre el monòmer i la molècula motlle. Aquests tipus d'interaccions poden ser de tipus electrostàtic, ponts d'hidrogen, forces de Van der Waals o per compostos de coordinació. Aquesta estratègia va ser desenvolupada per Mosbach *et al.*¹¹⁵. L'estratègia no covalent no comporta la formació d'enllaços covalents la qual cosa suposa un gran avantatge donat que gairebé tots els compostos poden ser susceptibles de produir MIPs, només caldrà buscar una complementarietat entre monòmer i molècula motlle. Per altra banda, els clústers moleculars tindran una estabilitat menor i estaran en constant intercanvi amb altres components del medi.

1.2.2.2 Aplicacions dels MIPs

Les aplicacions d'aquest tipus de receptors són nombroses, així com la preparació de MIPs per una gran varietat de molècules. Darrerament, la producció de treballs relacionats amb la preparació i aplicació dels MIPs ha crescut exponencialment¹¹⁶. A continuació s'exposaran els àmbits en els quals els MIPs han tingut més rellevància més important¹¹⁷.

Mètodes de separació. Aquest tipus de tècnica és la més senzilla i s'empra tant com a fase estacionària per cromatografia líquida (CL)^{118, 119} com en cromatografia de capa fina (CCF). Pel que fa als MIPs com a fase estacionària per CL s'han aplicat amb èxit per la separació de mesclures racèmiques, sobre tot pel cas de fàrmacs^{120, 121}.

Pretractament de mostra. Aquesta tècnica s'ha denominat MISPE (*Molecular Imprinted Solid Phase Extraction*)^{122, 123}. Junt amb l'anterior és l'aplicació més important dels MIPs. Consisteix a eliminar les possibles interferències de matrius complexes que puguin interferir en la mesura final de l'analít d'interès, així com, reduir el soroll químic per millorar la relació senyal-soroll de la tècnica utilitzada. També és pot utilitzar com a fase per la preconcentració de mostra. Aquest tipus de sistema es presenta en forma de cartutxos com a fase d'extracció selectiva similar als cartutxos existents de C18. Aquest tipus de format té gran interès en la indústria farmacèutica, i en els camps ambiental i agroalimentari.

Assaigs d'empremta molecular (MIA, *Molecular imprinted assay*). Aquest tipus d'assaig és molt similar al assaig immunoenzimàtic en format competitiu tant en condicions homogènies o heterogènies. S'estableix una competició de l'analít i un anàleg marcat, normalment marcadors radioactius^{124, 125}, per unir-se amb el receptor selectiu. S'ha trobat que poden arribar a mesurar concentracions d'analít directament en plasma¹²⁶. Aquest tipus d'assaig pot esdevenir una bona alternativa als immunoassaigs donada la seva millor estabilitat, ja que es podria treballar en dissolvents orgànics o en condicions extremes on els anticossos no podrien donar resposta.

Sensors químics. Com a elements de reconeixements vàlids que són els MIPs es poden acoblar a un transductor per així desenvolupar sensors per la determinació de compostos orgànics¹²⁷⁻¹²⁹. Consisteix a preparar una capa polimèrica per sobre del transductor deixant exposades les cavitats específiques per la captació de l'analít. El tipus de sensor més investigat en el cas de MIPs com elements de reconeixement són els piezoelèctrics basats en microbalances de quars¹³⁰.

1.2.2.3 Utilització dels MIPs per la detecció de AAS

Com compostos amb una activitat biològica important, els esteroides han estat un dels analítis d'interès per produir MIPs¹³¹. El fet que els esteroides tinguin una rigidesa inherent molt forta i amb grups funcionals ben definits fa que siguin uns motlles interessants per preparar MIPs. S'han preparat MIPs per colesterol¹³²⁻¹³⁷, corticoides^{138, 139}

i per compostos estrogènics¹⁴⁰⁻¹⁴². Referent als compostos anabolitzant s'han desenvolupat diferents estratègies per la detecció de testosterona¹⁴³⁻¹⁴⁵. La polimerització d'aquest tipus de MIPs utilitza àcid metacrílic com a monòmer de reconeixement i el etilenglicoldimetacrilat com agent reticulant, tot i que s'han emprat alguns monòmers diferents com el metacrilat de 2-hidroxietil. Amb aquests MIPs s'ha demostrat l'aplicació potencial com a fases d'extracció selectiva de T en mostres.

1.3 Projecte RaDAR

Aquesta tesi doctoral s'ha englobat dintre d'un projecte finançat per la Comunitat Europea al final del 4rt Programa Marc¹⁴⁶. El projecte té per títol Desenvolupament d'un sensor d'afinitat unianalit i multianalit per la detecció ràpida de residus androgènics en animals a la granja i a l'escorxador (*Development of single and multi-analyte affinity sensors for Rapid Detection of Androgen Residues in live and post-mortem animals, RaDAR, QLRT-2000-01670*). L'objectiu d'aquest projecte ha estat el desenvolupament d'un prototip de biosensor portàtil per la determinació de AAS al lloc de recollida de mostra. Com a compostos d'interès es van seleccionar la testosterona, la metiltestosterona, la nandrolona, l'estanozolol i la trenbolona. Posteriorment es va incloure la boldenona i la metilboldenona. La matriu a mesurar seria orina bovina, ja que aquest biosensor es va pensar pel control agroalimentari de la producció de carn bovina.

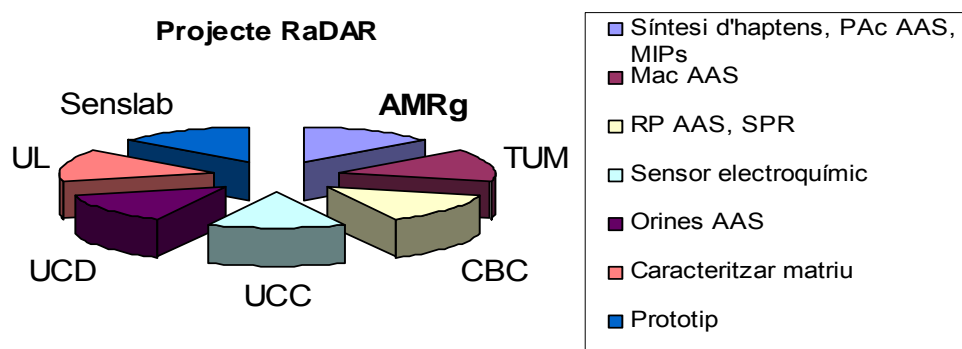


Figura 1.21 Estructura de participants i tasques de cadascun dels grups al projecte RaDAR. AMRg (Applied Molecular Receptors grup; TUM (Technische Universität München); CBC (Cranfield University); UCC (University College Cork); UCD (University College Dublin); UL (University of Limerick).

Les tasques principals del nostre grup ha estat l'aprovisionament d'haptens, conjugats a proteïna (antígens de tapissat, traçadors enzimàtics) i de PAc contra AAS. Així com, la preparació de MIPs per AAS, a més de l'establiment de les condicions d'ús d'aquest immunoreactius mitjançant el desenvolupament de protocol immunoquímics per l'anàlisi d'anabolitzants en orina bovina.

1.4 Objectius

Considerant que aquesta tesi doctoral està englobada dintre del projecte RaDAR es van proposar els següents objectius:

1. Preparació d'immunoreactius per la determinació d'estanozolol, boldenona, metilboldenona. Durant la realització d'aquesta tesi doctoral va sorgir a la llum l'escàndol de la producció i distribució entre els atletes d'un nou esteroide anabolitzant de disseny, la tetrahidrogestrinona. L'interés d'aquest nou compost ens va empènyer a abordar també la producció d'immunoreactius per a aquesta nova substància.
2. Investigació de les condicions d'ús d'aquests reactius i establiment de protocols immunoquímics d'anàlisi per la determinació d'aquests esteroides en orina d'acord amb la regulació vigent.
3. Investigar la preparació de polímers d'empremta molecular per la determinació de AAS.

2 Disseny i síntesi d'haptens per hormones anabolitzants

2.1 Disseny d'haptens d'immunització

L'elecció d'un haptè d'immunització és el pas clau per tal d'obtenir anticossos específics i per al desenvolupament de qualsevol tècnica immunoquímica. Sempre que sigui possible, la introducció del braç espaciador hauria de mantenir intactes les zones més característiques de la molècula, així com conservar les propietats físico-químiques de l'analit. Per altra banda, el braç espaciador hauria de tenir la llargària suficient, un cop unit covalentment a una proteïna transportadora, com per deixar el màxim de l'estructura de la molècula exposada al sistema immune⁷⁹.

L'estructura dels anabolitzants esteroidals té dues zones clarament diferenciades, una és l'anell A que està funcionalitzat freqüentment a la posició 3 per un grup cetònic α,β insaturat en $\Delta^{4,5}$ (com és el cas de la testosterona o la nandrolona). Alguns anabolitzants

presenten altres modificacions funcionals en l'anell A com per exemple una insaturació addicional en $\Delta^{1,2}$ (boldenona i metilboldenona) o un anell aromàtic addicional a l'estructura esteroidal, com és el cas de l'estanozolol al qual se li afegeix un anell de pirazole en posició 2 i 3 (anell A'). Per altra banda, l'altre zona característica de l'estructura anabolitzant està a l'anell D, habitualment funcionalitzat amb un grup hidroxil en posició 17 β (el cas de la boldenona, testosterona i nandrolona), o amb un metil addicional en posició 17 α (metilboldenona i estanozolol). Altres modificacions funcionals característiques consisteixen en insaturacions dintre de l'estructura esteroidal en les posicions $\Delta^{4,5}$, $\Delta^{9,10}$ i $\Delta^{11,12}$, tal és el cas de la trenbolona i la tetrahidrogestrinona. En aquest últim cas també és característica la substitució del grup metil 18 per un grup etil i l'addició d'un grup etil en posició 17 α .

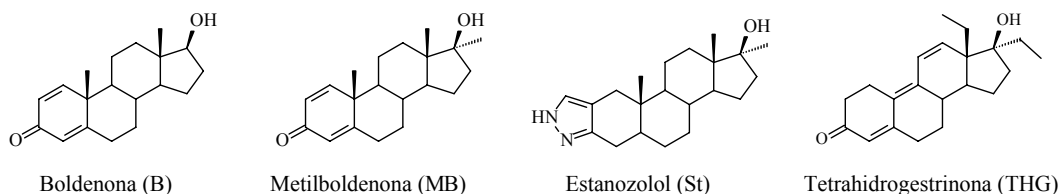


Figura 2.1 Estructures químiques dels analits d'interès.

A l'hora de dissenyar haptens per la producció d'anticossos específics per la boldenona, la metilboldenona, l'estanozolol i la tetrahidrogestrinona (vegeu **Figura 2.1**), es va pensar que en la introducció del braç espaiador s'havia de tenir en compte els metabòlits que es produeixen i s'excreten per l'orina.

Es van realitzar estudis de modelatge molecular per tal d'avaluar l'impacte de la introducció del braç espaiador en propietats físico-químiques com ara la geometria o les propietats electròniques. Per avaluar les propietats geomètriques es va calcular el valor RMSE (*root mean square error*, error quadràtic mig) a partir de la superposició de la estructura dels haptens amb els corresponents analits prenent com a referència les conformacions en l'estat de mínima energia. Respecte de les propietats electròniques, es van mesurar les càrregues puntuals involucrades a l'enllaç per on es va unir el braç espaiador i també les càrregues dels àtoms de la part de la molècula que l'haptè deixarà exposada al sistema immune.

Per la producció d'anticossos específics per les hormones anabolitzants d'interès es van proposar dos tipus d'haptens: A i B. Els haptens de tipus A tenen el braç espaciador a l'anell D, deixant exposat al sistema immune, un cop units a la proteïna transportadora, els anells A, B i C. Per altra banda els haptens de tipus B estan derivatitzats per l'anell A (o A' en el cas de l'estanozolol) i es deixa exposat al sistema immune els anells B, C i D.

2.1.1 Disseny d'haptens per boldenona i metilboldenona.

Considerant les similituds estructurals de la boldenona (B) i la metilboldenona (MB), a més de la rellevància d'alguns dels seus metabòlits (vegeu **apartat 1.1.7.1** de la introducció), com ara la α -boldenona (α -B) es va proposar la preparació d'un haptè de tipus A de boldenona i un haptè de tipus B de metilboldenona (vegeu **Figura 2.2**). Amb això es pensava que l'haptè de tipus A de B, es reconeixerien ambdós analits, mentre que amb el de tipus B de MB els anticossos generats podrien ser més específics per MB.

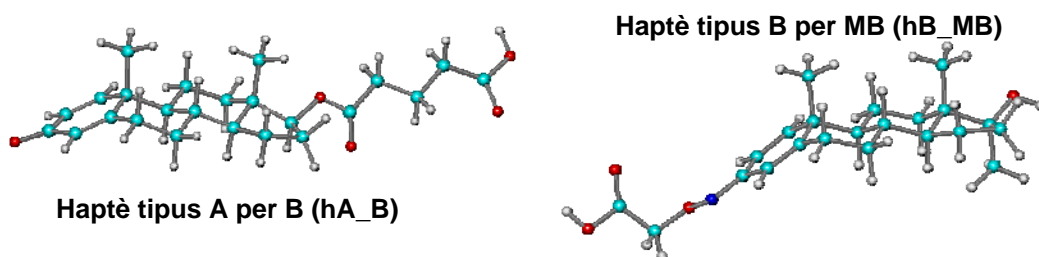


Figura 2.2 Estructura química dels haptens tipus A per B (esquerra) i tipus B per MB (dreta) en la conformació de més baixa energia.

Per tal de saber si aquest haptè mimetitzava els tres compostos d'interès es varen calcular els RMSE i les càrregues puntuals de les àrees més rellevants de les molècules. Així, el RMSE calculat per la boldenona respecte de l'haptè de tipus A va ser de 0.058 Å, evidenciant que la geometria no es veu afectada per la introducció del braç espaciador en l'hidroxil 17. Respecte a la α -B i la MB, es va calcular el RMSE amb uns valors de 0.075 i 0.071 respectivament. Aquest valors ens van donar a entendre que aquest haptè podria produir anticossos que reconeguessin no tan sols la B, sinó també la α -B i la MB. Respecte a les càrregues puntuals, segons es pot veure a la **Figura 2.3**, la introducció del braç espaciador no afecta a la zona que l'haptè deixa exposada al sistema immune (C2, C3,

C4 i O3). Per altra banda, la formació de l'enllaç ester amb l'hidroxil 17 de la B no afecta substancialment a les càrregues de l'anell D (C16, C17, O17, C13 i C20).

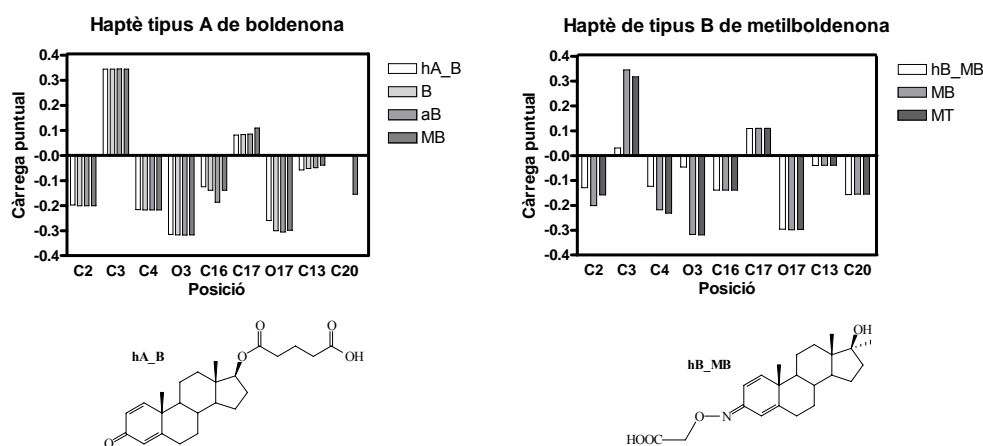


Figura 2.3 Càrregues puntuals de l'haptè de tipus A de boldenona i de l'haptè de tipus B de MB, i dels compostos relacionats. Estructura dels haptens proposada per la B i la MB.

L'haptè B de MB, es va dissenyar de tal manera que l'àrea exposada al sistema immune fos la característica de la MB. Per tant es va proposar un haptè de tipus B amb un enllaç oxima. Es van realitzar els càlculs per determinar el RMSE de l'hB_MB amb la MB i es va obtenir un valor de 0.060 Å, demostrant que existia una bona homologia entre l'estructura de l'haptè proposat i la MB. Ja que l'àrea exposada per l'haptè és molt similar a un altre anabolitzant d'interès com la metiltestosterona, es va calcular també el RMSE amb l'hB_MB, obtenint-se un valor de 0.233 Å. La qual cosa fa pensar, que tot i la similaritat estructural a l'anell D entre la MB i la MT, els anticossos generats contra l'haptè B de MB podrien no reconèixer suficientment la MT. Aquest augment de l'error és probablement degut a la insaturació addicional de la MB en $\Delta^{1,2}$ el que fa que l'anell A tingui una desviació respecte el pla de la molècula (vegeu **Figura 2.2**). Respecte a les càrregues puntuals, es pot observar a la **Figura 2.3** que els àtoms que queden exposats al sistema immune són molt similars i que l'haptè mimetitzava perfectament les propietats electròniques en aquesta part de la molècula. En canvi, la introducció de l'enllaç oxima per obtenir l'haptè va afectar els àtoms involucrats en la introducció del braç espaiador. Però, es va considerar que la zona afectada quedaria molt lluny de la zona exposada al sistema immune i que en tenir el braç espaiador molt curt, l'anell A quedaria embolcallat

l'anell D afecta a la resta de la molècula (vegeu **Figura 2.5**, part esquerra de la gràfica). Tal i com es pot observar no hi ha gaire diferència entre hA_St, St i 16 β OH-St.

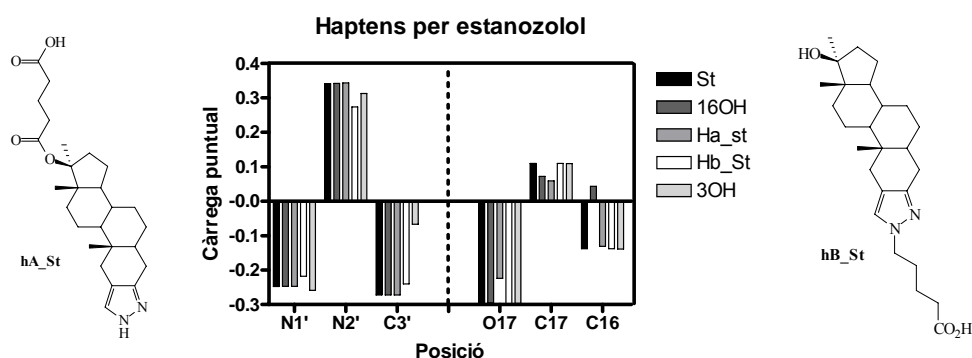


Figura 2.5 Càrregues puntuals del hA_St, hB_St, St i els seus metabòlits majoritaris 16 β OH-St i 3'OH-St. Estructura proposada dels haptens per St.

Per altra banda, es va proposar l'haptè tipus B per estanozolol per a la producció d'anticossos que poguessin detectar St i l'altre metabòlit majoritari que és el 3'-hidroxi-estanozolol. En aquest cas es va realitzar també el càlcul de RMSE per St i 3'OH-St, amb un resultat de 0.013 i 0.024 Å. Uns resultats que indiquen que des del punt de vista geomètric i conformacional la introducció del braç espaiador per l'anell de pirazole no produeix canvis substancials. I respecte de la mesura de les càrregues puntuals, la zona exposada al sistema immune tampoc no es veu afectada per la introducció del braç espaiador. Tot i que en el cas del 3'OH-St hi ha un canvi important en la distribució electrònica de l'anell de pirazole, respecte el St i hB_St, aquesta zona seria la menys exposada al sistema immune degut a l'efecte apantallant de la proteïna.

2.1.3 Disseny de l'haptè de la tetrahydrogestrinona.

Per obtenir anticossos específics per aquesta nova hormona anabolitzant de disseny, es va proposar d'enllaçar covalentment el braç espaiador deixant exposada l'àrea on roman la singularitat d'aquest anabolitzant. Per tant es va pensar en un braç espaiador similar al de l'hB_MB, on l'enllaç oxima a la posició 3 deixa al descobert els anells B, C i D. Per tant, com s'ha explicat en anteriors apartats es van realitzar diferents estudis per veure l'impacte del braç espaiador sobre la THG. El RMSE que es va obtenir de la THG

respecte la hTHG va ser de 0.053, valor molt similar als anteriors, el qual ens va dir que l'enllaç oxima no afectava gaire la geometria de la THG. Des del punt de vista de les càrregues puntuals no es va apreciar un canvi a l'anell D (vegeu **Figura 2.6**), però a l'igual que amb hB_MB, es va observar una variació a l'anell A. També es van mesurar les càrregues puntuals d'un compost relacionat, com és la trenbolona, que té una estructura triénica similar a la THG. En aquest cas, es van observar petits canvis als àtoms de l'anell D, degut a les principals diferències amb la THG que conté els grups etil en posició 13 i 17 α .

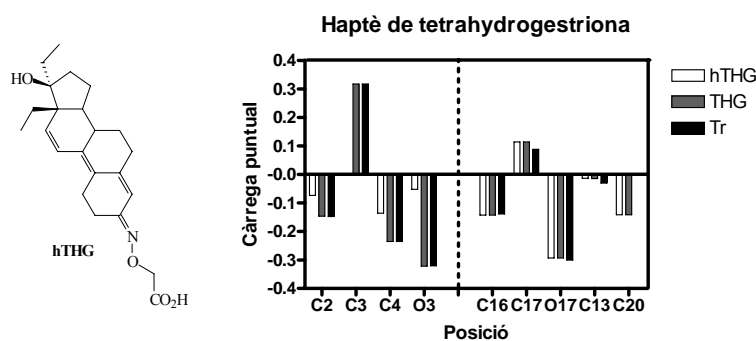


Figura 2.6 Càrregues puntuals corresponents a la tetrahydrogestriona (THG), l'haptè de THG i Trenbolona (Tr). Estructura proposada de l'haptè de THG

2.2 Síntesi dels haptens per hormones anabolitzants

Es van proposar una sèrie de rutes retrosintètiques per cadascun dels haptens proposats (vegeu **Figura 2.7**).

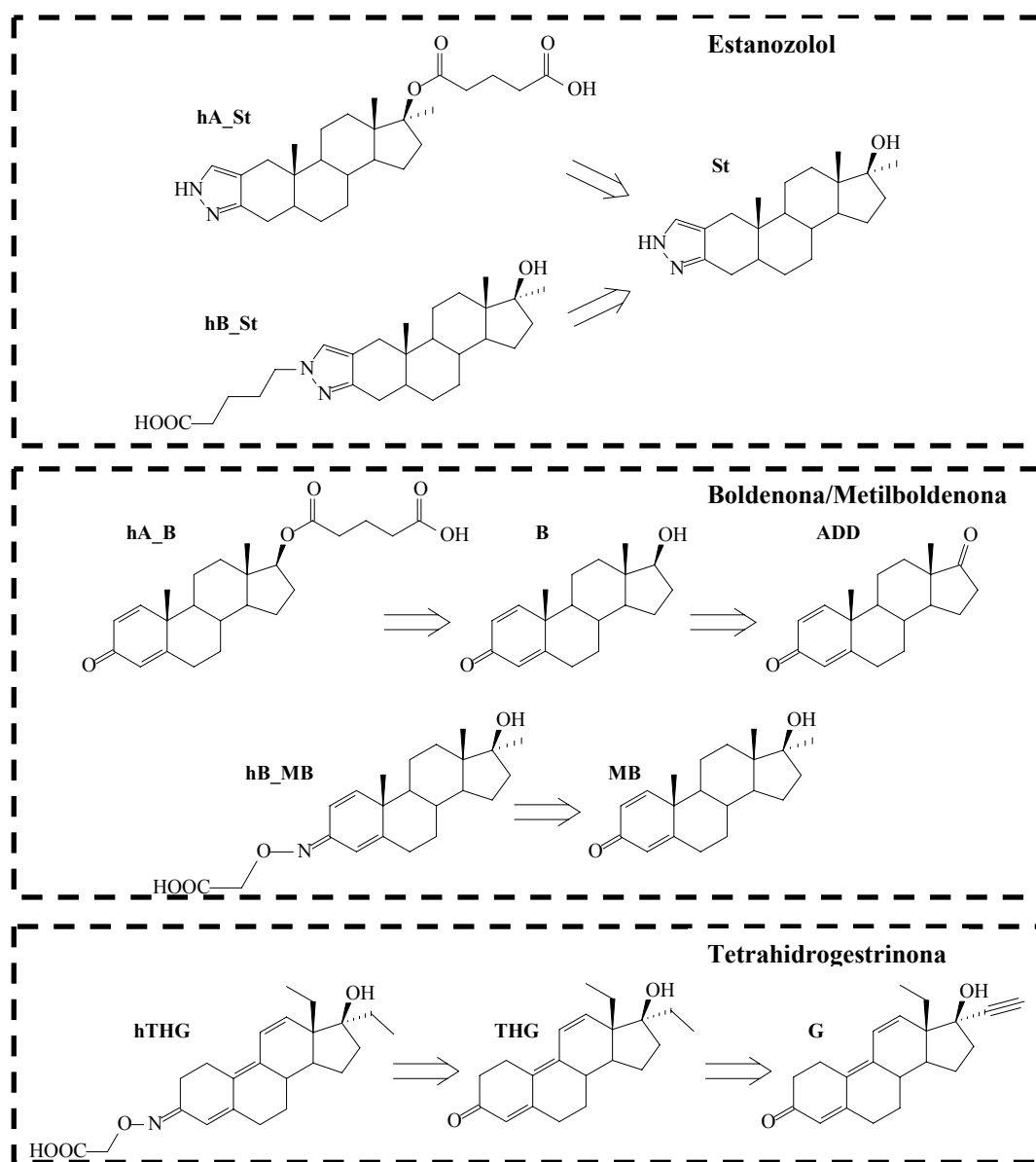


Figura 2.7 Anàlisi retrosintètic dels haptens proposats.

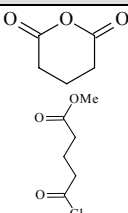
2.2.1 Haptens d'immunització per estanozolol

2.2.1.1 Síntesi de l'haptè tipus A d'estanozolol: Estratègia 1

Davant de la previsible reactivitat del nitrogen de pirazole de l'estanozolol, es va decidir bloquejar-lo amb un grup protector. Es va optar pel grup tritil que s'ha emprat per la protecció de grups amino d'aminoàcids, penicil·lines i cefalosporines¹⁴⁷. La reacció de protecció es va dur a terme fent reaccionar el St amb el clorur de tritil, en presència de Et₃N com a base i emprant el dioxà com a dissolvent. La reacció es va mantenir en condicions anhidres i la temperatura de reflux del dioxà. Segons el control per CCF, la reacció es va parar al cap de 12h quan la reacció no va avançar més. Un cop tractat el cru de reacció es va poder comprovar per RMN que el H3' de l'estanozolol havia canviat de desplaçament químic de δ 7.31 a δ 7.03 ppm. D'aquesta manera es va obtenir l'estanozolol protegit amb el grup tritil (Tr-St, **2**)

A continuació, es va procedir a la introducció del braç espaiador per esterificació del hidroxil 17 amb anhídrid glutàric. La reacció es va dur a terme en dioxà, emprant com a base piridina i com a agent activant la DMAP. La reacció es va portar fins a reflux de dioxà i es va seguir per CCF. Durant els controls de reacció no es va observar cap avenç en la formació del producte desitjat, per la qual cosa es va decidir variar les condicions, tal i com estan visualitzades a la **Taula 2.1**.

Taula 2.1 Condicions de la reacció d'esterificació amb l'estanozolol

Reactiu	Base	Activador	Dissolvent	Temperatura	Resultat
	Pyr	DMAP	Dioxà	Reflux	×
	Et ₃ N	DMAP	Dioxà	Reflux	×
	Et ₃ N	-	Dioxà	Reflux	×
	BuLi	-	THF	Reflux	×

En cap cas no es va observar la formació del producte desitjat. Una possible explicació de la poca reactivitat de l'hidroxil 17, podia ser l'impediment estèric produït pels grups

Me20 i Me18. Això conferiria una pobre reactivitat al grup hidroxil. Per tant es va haver de proposar una nova estratègia.

2.2.1.2 Síntesi de l'haptè tipus A d'estanozolol: Estratègia 2

Per tal d'evitar l'efecte dels grups metils sobre la reactivitat del grup hidroxil a la posició 17, varem proposar la utilització de 17-Norestanozolol (NorSt) com a producte de partida, en lloc de l'estanozolol (vegeu **Figura 2.8**).

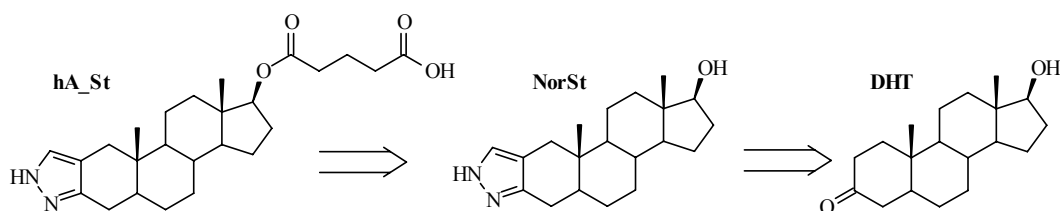


Figura 2.8 Nova ruta retrosintètica proposada per la síntesi de l'hA_St.

La manca de disponibilitat de NorSt de fonts comercials ens va obligar a preparar aquest producte de partida a partir de la dihidrotestosterona (DHT).

2.2.1.2.1 Síntesi del 17-NorSt.

D'acord amb els treballs publicats per Clinton *et al.*¹⁴ al voltant de la preparació de compostos esteroidals amb anells de pirazole, per la síntesi del NorSt varem partir de la DHT (vegeu **Figura 2.9**). Així la DHT es va fer reaccionar amb formiat d'etil en piridina i amb metòxid de sodi per tal de formar la 2-hidroximetilen-dihidrotestosterona (2-HM-DHT), intermedi clau per a la formació de l'anell de pirazole. La reacció es va seguir per GC-FID. La formació d'aquest intermedi es va veure confirmada per RMN, ja que es van observar els senyals corresponents a l'hidrogen al·lílic de la 2-HM-DHT ($\delta = 8.62$ ppm). Es va concloure que el tautòmer que es formava mitjançant aquesta reacció va ser el 2-hidroximetilen-DHT i no el 2α -formol-DHT, ja que no es veien els senyals corresponents a l'hidrogen α al carbonil, ni a l'hidrogen de l'aldehid. La explicació de que es formi l'isòmer de l'hidroximetilen-DHT està en la formació d'un pont d'hidrogen intramolecular entre l'OH i el $O=C_3$.

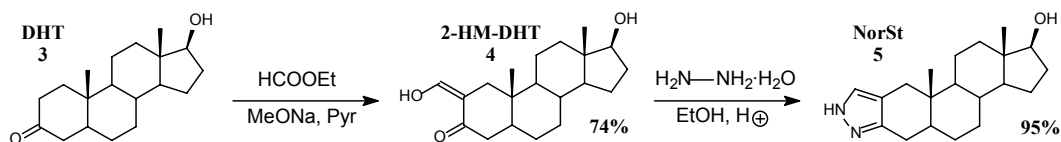


Figura 2.9 Síntesi del NorSt

Per la formació de l'anell de pirazole es va seguir el treball de Clinton *et al.*¹⁴ Fent reaccionar l'intermedi 2-HM-DHT amb hidrazona hidratada en medi etanòlic i amb catàlisi d'àcid acètic a reflux. La reacció es va controlar per CCF. Al cap de 2 hores es va donar per finalitzada la reacció. El cru de reacció es va rotavaporar fins a sequedat i es va eliminar l'excés d'hidrazona amb H₂O. El rendiment d'aquesta reacció va ser gairebé quantitatiu. Es va poder observar per RMN la formació del NorSt, veient el H3' que en aquest cas sortia a un $\delta=7.28$ ppm.

2.2.1.2.2 Preparació de l'haptè A d'estanozolol a partir de NorSt

Tal i com s'ha explicat a l'apartat 2.2.1.1, el nitrogen de pirazole es va haver de protegir tal com s'ha descrit anteriorment amb bon rendiment igualment (vegeu Figura 2.10). Un cop es va tenir el NorSt protegit es va procedir a la introducció del braç espaciador mitjançant un enllaç ester. Es va dissoldre el NorSt protegit en THF i se l'hi va afegir l'anhidrid glutàric, la Pyr com a base i la DMAP com agent activant, en mitjà anhidre i a reflux durant 12h. El tractament del cru de reacció va permetre aïllar el producte desitjat Tr-hA_St amb un rendiment del 22%.

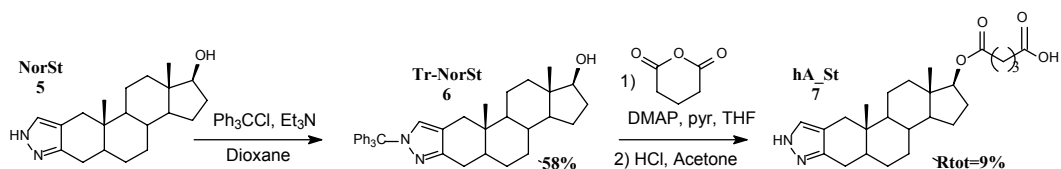


Figura 2.10 Síntesi de l'hA_St

La formació de l'enllaç ester es va poder comprovar per RMN pel desplaçament del triplet corresponent al H17 de 3.86 ppm a 4.64 ppm. A més mitjançant RMN de ¹³C es va observar la presència del grup carbonil ester i el del àcid (178.3 i 173.2 ppm, respectivament). L'eliminació del grup protector es va realitzar dissolent l'haptè protegit

en un medi de HCl/Acetona (1ml/8ml, HCl 1.5 M en acetona)¹⁴⁷ i agitant durant 3 hores a la temperatura de reflux. Un cop finalitzada la reacció es va aïllar l'haptè A d'estanozolol desitjat amb un rendiment quantitatiu. La síntesi de l'haptè A de St es va aconseguir amb un rendiment total del 9%.

2.2.1.3 Haptè de tipus B d'estanozolol

Donada l'alta reactivitat del nitrogen de pirazole de l'estanozolol es va decidir introduir el braç espaciador en aquesta posició.

2.2.1.3.1 Alquilació de N2' de l'estanozolol.

La reacció d'alquilació de l'estanozolol es va realitzar amb iodovalerat de metil (prèviament sintetitzat) en dioxà, i Et₃N com a base. La reacció es va portar a reflux i es va controlar per CCF. El mecanisme de reacció va ser de tipus S_N2, on el nitrogen de pirazole ataca la posició electròfila del carboni unit al iode. Durant el control, la reacció anava avançant, però en comptes d'una taca nova s'observaren dues taques amb un R_f molt similar. Després de tractar el cru de reacció, la RMN de ¹H, va mostrar que a la zona de H3' hi havia dos productes que corresponien a dos productes d'alquilació. Aquest dos productes venen de l'alquilació dels dos nitrogens de l'anell de pirazole, ja que l'estanozolol té dues formes tautomèriques amb similar reactivitat (vegeu **Figura 2.11**).

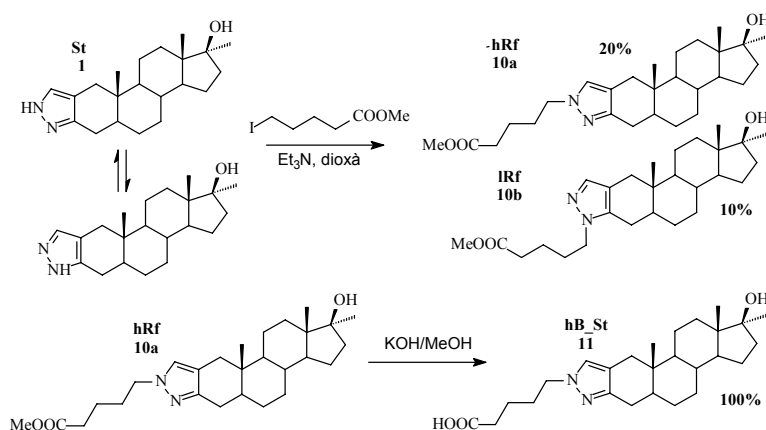


Figura 2.11 Síntesi de l'haptè tipus B de St

Per tal de verificar aquest comportament es van aïllar els dos productes d'alquilació (**10a**, hRf, *highest Rf* i **10b**, IRf, *lowest Rf*) i es van fer una sèrie d'experiments nOe per tal de saber quin isomer és el que està alquilat per la posició N2' o N1'. Es van irradiar el H3', el CH₂ (varelat de metil) unit a nitrogen, i els hidrògens del carboni 2. Tal i com es pot observar a la **Figura 2.12**, l'espectre de hRf, on s'ha irradiat el H3', es va observar senyal nOe al CH₂ del braç espaciador ($\delta=4.02$ ppm) i al CH₂ de posició 2 ($\delta=2.6$ ppm), per tant aquest correspon al producte d'alquilació a N2'. Per altra banda, l'espectre IRf només té senyal nOe amb el CH₂ de la posició 2, per tant aquest correspon a isomer N1'.

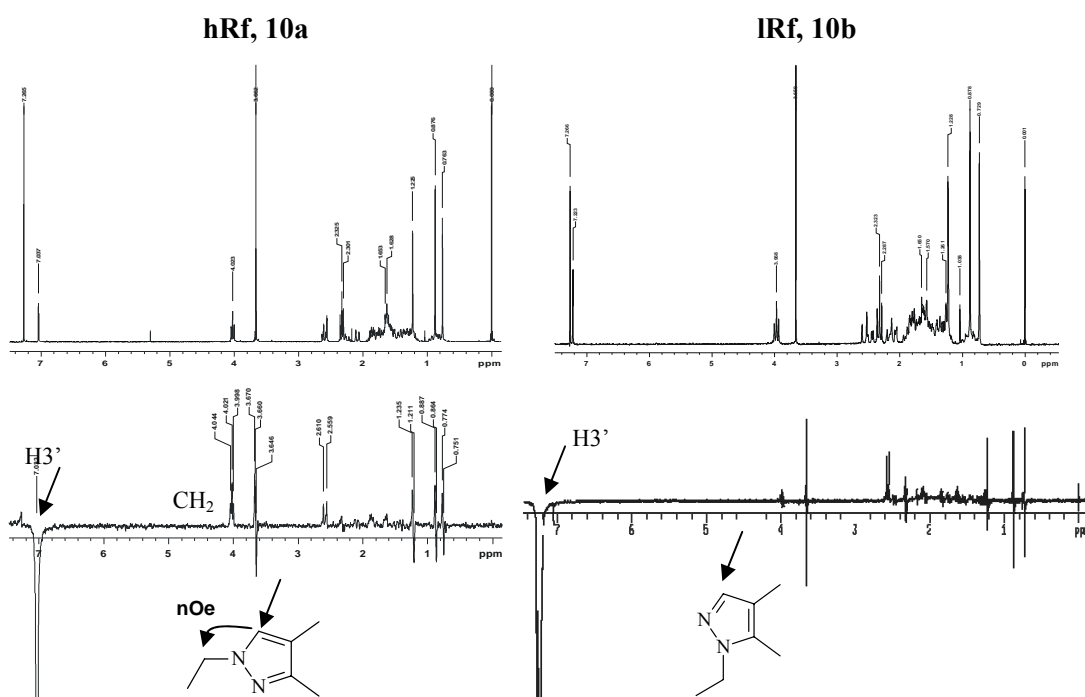


Figura 2.12 Espectres de RMN de 1H dels productes d'alquilació de l'estanozolol (hRf, IRf) i corresponents espectre nOe irradiats a H3'.

Es va escollir com haptè d'immunització el producte d'alquilació per N2', ja que com és una estructura més lineal, deixarà exposat al sistema immune l'àrea que ens interessa (anells B, C i D). Un cop purificat i caracteritzat, es va hidrolitzar l'èster metílic amb KOH en metanol per tal d'obtenir el desitjat haptè B per estanozolol.

2.2.2 Haptens d'immunització per Boldenona i Metilboldenona

2.2.2.1 Haptè de tipus A per Boldenona.

En primer lloc es va preparar la boldenona per una reducció de la cetona 17 de la androstandiendiona (ADD) amb NaBH₄. La reducció va tenir lloc selectivament enfront la cetona 3 deguda a la major reactivitat del grup cetònic 17 *versus* el grup cetònic 3 α,β -insaturat, tal com va demostrar l'aparició d'un triplet a 3.59 ppm corresponent al H17. A més la reducció va donar com compost únic l'epímer β . Aquest comportament va ser degut a l'impediment estèric produït pel Me18 que impedeix l'apropament de l'hidrur per la cara β deixant com a única opció entrar per la cara α , donant lloc a l'epímer 17 β -boldenona.

A continuació es va fer reaccionar la boldenona amb l'anhídrid glutàric en presència de Pyr i DMAP en THF i a reflux (vegeu a la **Figura 2.13**). Un cop finalitzada la reacció es va tractar el cru i es va purificar per columna de sílica. L'espectre RMN de ¹H va posar en evidència la formació de l'enllaç ester per desplaçament químic de H17 que va canviar de δ 3.59 ppm a δ 4.60 ppm.

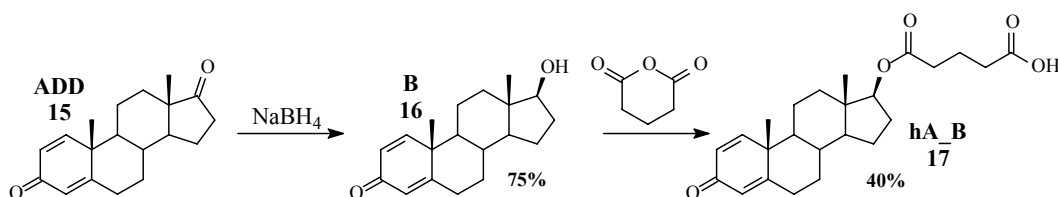


Figura 2.13 Síntesi de l'haptè A de Boldenona

2.2.2.2 Haptè B de Metilboldenona

La síntesi de l'haptè tipus B de metilboldenona està basada en una síntesi descrita la qual feia servir la carboximetilenoamina com a reactiu per introduir el braç espaiador a C3 de la testosterona¹⁴⁸. De la mateixa manera es va realitzar la síntesi de l'hB_MB (vegeu **Figura 2.14**). La síntesi es va dur a terme dissolent la metilboldenona i l'hidroclorur de carboximetoxilamina en una solució de NaOH/EtOH 0.1M en condicions anhidres. La reacció es va fer a temperatura de reflux i es va controlar per CCF. Després de que hagués

finalitzat la reacció, es va tractar el cru de reacció i es va purificar per cromatografia de sílica.

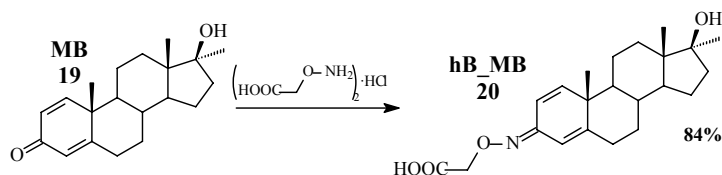


Figura 2.14 Síntesi de l'haptè B de metilboldenona

Per tal de comprovar que el producte format va ser el producte desitjat es va realitzar una RMN de ^1H . Es va poder comprovar que els hidrògens corresponents a l'anell A havien canviat de desplaçament químic. Però, es va obtenir una mescla d'isòmers on es podien apreciar dos conjunts de senyals corresponents a H1, H2 i H4 (vegeu **Figura 2.15**). Aquests hidrògens sortien desdoblats amb integrals iguals, però la suma d'aquests integrava igual que per exemple el H17. Considerant que el nou enllaç oxima té una llibertat de gir al voltant de l'enllaç N-O, el que observarem eren els isòmers Z/E de l'enllaç C(3)=N. Aquest isòmers els podem observar per RMN perquè la interconversió entre les dues espècies és més lenta que l'observació a la freqüència de ^1H . La formació de l'haptè desitjat també va quedar evidenciada per l'aparició d'un nou senyal a $\delta=4.64$ ppm corresponent al CH_2 del braç espaiador.

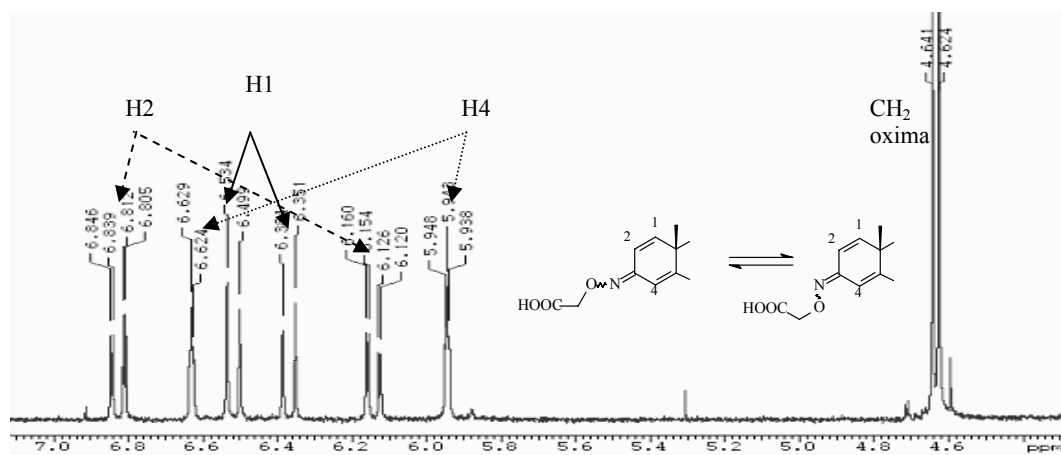


Figura 2.15 Ampliació de l'espectre de RMN de ^1H de l'haptè B de MB

2.2.3 Haptens d'immunització per la Tetrahidrogestrinona

2.2.3.1 Síntesi de la Tetrahidrogestrinona

Donat que no va ser possible l'adquisició comercial de THG es va procedir en primera instància a preparar aquest producte. En el moment d'abordar aquest objectiu no hi havia disponible a la literatura cap procediment de síntesi d'aquest compost, per la qual cosa, considerant les similituds estructurals varem decidir preparar-la a partir de la gestrinona (G). La síntesi plantejava la hidrogenació del triple enllaç C20-C21 de la gestrinona. Però, donada la possible hidrogenació seqüencial dels dobles enllaços del sistema trienic de la gestrinona, es va haver d'escollir un catalitzador de la hidrogenació que fos selectiu a triples enllaços i que tingués una cinètica de reacció prou lenta per poder controlar la reacció. En el treball de Kamata *et al.* utilitzaven un catalitzador de Pd sobre BaSO₄ al 5% ¹⁴⁹ per la hidrogenació selectiva de triples enllaços en posició C17 i enfront un doble enllaç a $\Delta^{11,12}$ de derivats d'antagonistes de l'aldosterona. Aixó, doncs, la reacció es va dur a terme d'una manera similar, en dioxà i utilitzant com a catalitzador Pd/BaSO₄. L'addició del H₂ va estar controlada mitjançant un muntatge de pressió compensada on en cada moment es va saber la quantitat de H₂ que entrava al baló de reacció. El control de la reacció es va fer per HPLC-UV detector de díodes. En una primera instància es van identificar els productes d'hidrogenació per la seva λ_{\max} , però posteriorment, també es van identificar mitjançant la seva massa (HPLC-MS) i per RMN de ¹H. A la **Figura 2.16** es mostra la seqüència d'hidrogenació proposada, d'acord amb aquestes dades.

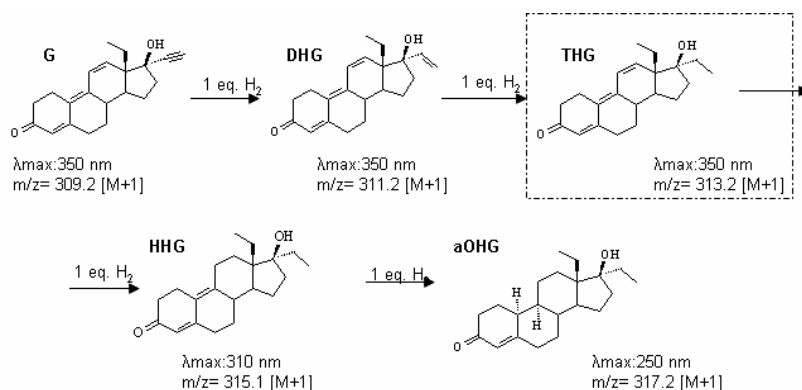


Figura 2.16 Productes de hidrogenació de la gestrinone. S'indica la seva λ_{\max} i el [M+1].

D'acord amb les integrals dels diferents productes d'hidrogenació de la gestrinona es va poder establir una cinètica de reacció. D'aquesta manera es va poder avaluar quin és el moment òptim per parar la reacció. Segons es pot observar a la part esquerra de la **Figura 2.17**, a mesura que avança la reacció la quantitat de gestrinona va disminuint. El primer intermedi de reacció que apareix és la dihidrogestrinona (DHG), que correspon a la primera hidrogenació del triple enllaç. Aquest pic presenta una banda de absorció que encara té el cromòfor del grup triènic ($\lambda_{\max}=350\text{nm}$) i la seva massa correspon a l'addició de dos hidrògens. A més, quan un control de reacció es va realitzar per RMN de ^1H , es va poder observar que el H21 del grup etinil de la gestrinona ($\delta=2.53\text{ ppm}$), anava desapareixent al mateix temps que es formava un sistema al·lilàtic propi d'un enllaç doble terminal (6.04 ppm, dd, $J=17.39\text{Hz}$, 10.92Hz ; 5.25 ppm, d, $J=17.15\text{Hz}$; 5.11 ppm, dd, $J=10.89\text{Hz}$.) A continuació, es va observar l'aparició d'un tercer pic corresponent a la THG. A l'igual que en el cas anterior, aquest nou pic manté la $\lambda_{\max}=350\text{nm}$, i la seva massa indica la següent addició de dos hidrògens més.

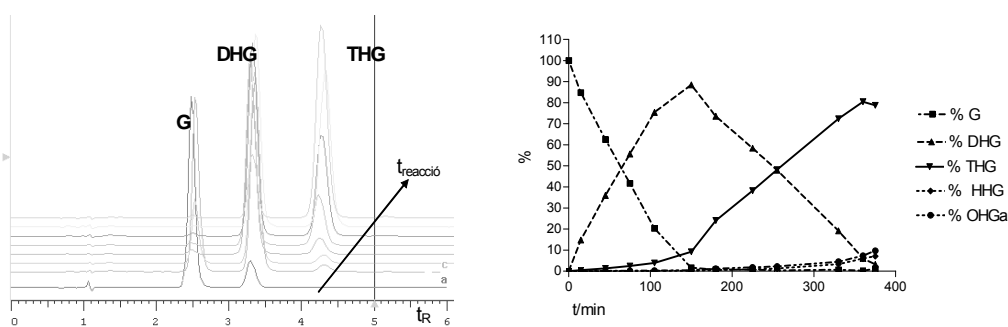


Figura 2.17 Superposició de cromatogramas (HPLC-UV) a diferents temps de reacció. A la dreta, cinètica de reacció establerta per la hidrogenació de la gestrinona.

De la cinètica de reacció es desprèn que la primera addició d'hidrogen sobre el triple enllaç de la gestrinona va ser ràpida. Quan la formació de la DHT va arribar al seu màxim, va començar a obtenir-se la THG. Aquesta segona hidrogenació va transcórrer més lentament. Però, a mesura que la formació de THG arribava al seu màxim, començava la hidrogenació dels altres dobles enllaços. És per això, que es va arribar a un compromís de parar la reacció quan la formació de la THG arribava al 80% aproximadament. També es va tenir en compte al parar la reacció en aquest punt que la

subseqüent hidrogenació dels altres dobles enllaços seria més ràpida, donat que aquests són més reactius que el triple enllaç.

Un cop tractada la reacció, el cru de reacció es va intentar de purificar per cromatografia de sílica, però sense gaire èxit donat que tots aquests compostos tenien el mateix comportament cromatogràfic sobre sílica. És per això que es va optar per una purificació en fase reversa. D'aquesta manera es va purificar el cru de reacció, separant la THG dels altres productes d'hidrogenació.

2.2.3.2 Síntesi de l'haptè de tetrahydrogestrinona

Tal i com s'ha comentat a l'**apartat 2.1.3**, es va optar per introduir el braç espaciador a C3 ja que deixa exposat al sistema immune l'àrea més característica d'aquest nou anabolitzant de disseny. Es va fer servir la mateixa estratègia que amb la metilboldenona (vegeu **apartat 2.2.2.2**), introduint un braç espaciador de tipus carboximetoxima (vegeu **Figura 2.3**). Les condicions de reacció van ser similars a les utilitzades per la MB, i el resultat va ser igualment exitós (vegeu **Figura 2.18**). La formació de l'enllaç oxima va quedar evidenciat quan es va estudiar el seu espectre de RMN de ^1H . Es va observar el mateix comportament que al hB_MB, desdoblament de senyals a l'anell A corresponents als isòmers Z/E de l'enllaç oxima que rota lliurement. A més, és remarcable que el desdoblament de senyals afecta inclòs els hidrògens del anell C (H11 i H12), segurament degut al fet que el sistema triènic conjugat maximitza aquest efecte.

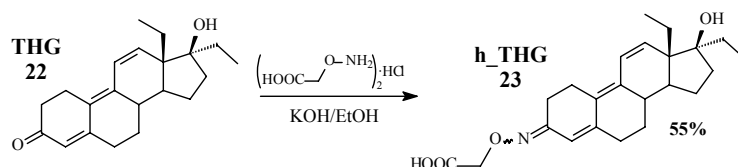


Figura 2.18 Síntesi de l'haptè de tetrahydrogestrinona

2.3 Disseny i síntesi de competidors

Com ja s'ha comentat anteriorment a la introducció, els assajos immunoenzimàtics per la detecció de molècules de baix pes molecular operen sota règim de competència, de manera que l'analit i un compost anàleg marcat s'estableixen una competència per unir-se a l'anticòs específic. En el disseny de competidors, la similitud tant química com geomètrica, com electrònica respecte l'analit no és tan determinant com per l'haptè d'immunització. Si més no, ha de guardar una certa similitud estructural amb l'analit de manera que es pugui reconèixer per l'anticòs específic. Per tant, la introducció de certes diferències estructurals en els competidors respecte l'haptè d'immunització resulta convenient degut a l'anomenat principi d'heterologia⁷⁹ (vegeu **Figura 2.19**). En els sistemes que operen en condicions heteròlogues, l'afinitat de l'anticòs pel competidor és menor de manera que en condicions de competència, l'analit és capaç de desplaçar l'equilibri de formació del complex IgG-competidor cap a la formació del complex IgG-analit. En aquest context, es poden trobar diversos exemples a la literatura relacionats amb la millora de la detectabilitat en condicions heteròlogues¹⁵⁰⁻¹⁵². A més, el fet que l'afinitat del competidor sigui més baixa, fa que compostos relacionats amb l'analit, com ara els metabòlits, puguin desplaçar l'equilibri cap al complex IgG-metabòlit.

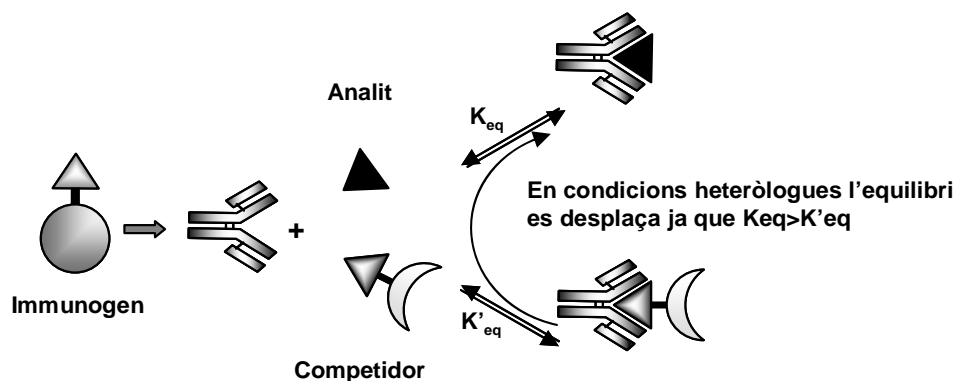


Figura 2.19 Esquema representatiu del principi d'heterologia.

L'heterologia pot introduir-se de diverses maneres, ja sigui emprant un braç espaiador diferent a l'emprat en la preparació de l'haptè d'immunització (pel que fa a la llargada, mida, o estructura química), ubicant-lo en una posició diferent de la molècula, canviant

l'estructura química de l'haptè, o emprant únicament algun fragment característic de la estructura. En aquest apartat es mostraran els competidors proposats per cadascun dels haptens d'immunització.

2.3.1 Competidors dels haptens d'estanozolol

El fet que els haptens d'estanozolol tinguin una relació estructural tan semblant, fa que els haptens preparats per cadascuna de les seves corresponents immunitzacions, siguin ideals com a competidors dels antisèrums contraris. Per exemple, el hA_St es pot fer servir com a competidor dels antisèrums produïts contra l'hB_St. De la mateixa manera l'hB_St serviria com a competidors pels antisèrums obtinguts de la immunització de hA_St. Per tant, es van considerar suficients els competidors pels antisèrums d'estanozolol.

2.3.2 Competidors dels haptens de boldenona i metilboldenona

A l'igual que anteriorment, es va aprofitar un canvi en la posició del braç espaciador. Per exemple, es pot fer servir l'hA_B per l'antisèrum que es va obtenir amb l'hB_MB. També, a l'inrevés, on l'hB_MB es pot utilitzar com a competidor dels antisèrums produïts amb hA_B. De totes maneres es va decidir sintetitzar addicionalment un haptè de tipus B per la boldenona i un altre de tipus A però amb un grau d'heterologia superior, en ser de testosterona (vegeu **Figura 2.20**).

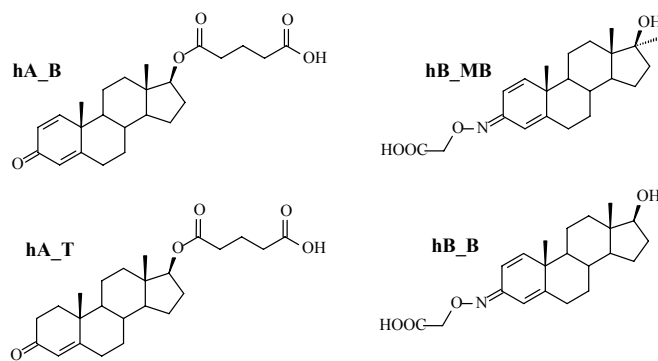


Figura 2.20 Estructura química dels haptens de competició

2.3.2.1 Síntesi de l'haptè A de testosterona

Donada la similitud estructural de la testosterona es va decidir introduir el braç espaciador per l'hidroxil 17. L'estratègia que es va emprar va ser la mateixa que en el cas d'obtenir l'hA_B, fent servir l'anhidrid glutàric (vegeu **Figura 2.21**). Es van utilitzar les mateixes condicions descrites en l'apartat 2.2.2.1 i l'haptè es va obtenir amb similar rendiment. De la mateixa manera la formació de l'enllaç ester va quedar palesa per RMN de ^1H pel desplaçament del senyal del H17 de δ 3.57 ppm a δ 4.60 ppm degut a la formació de l'enllaç ester.

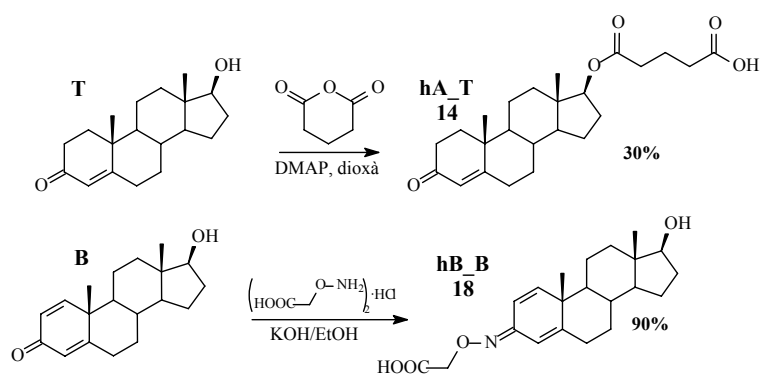


Figura 2.21 Síntesi de l'haptè A de testosterona i de l'haptè B de boldenona

2.3.2.2 Síntesi de l'haptè B de Boldenona

Aquest tipus d'haptè també conserva gran part de la seva similitud estructural tant amb la B com amb la MB. Per tal de sintetitzar l'haptè de tipus B de boldenona es va utilitzar la mateixa estratègia que en l'apartat 2.2.2.2, utilitzant la carboximetoxilamina (vegeu **Figura 2.21**). La reacció es va desenvolupar de la mateixa manera amb un rendiment molt similar al de la síntesi de hB_MB i h_THG.

2.3.3 Competidor per la tetrahidrogestrinona

2.3.3.1 Síntesi de l'haptè de gestrinona

Es va emprar com a compost relacionat la gestrinona (G) per tal d'obtenir un haptè de competició per l'assaig de la THG. En aquest cas també es va emprar la

carboximetoxilamina com a braç espaciador per derivatitzar la G per C3 (vegeu **Figura 2.22**). Es van emprar les mateixes condicions que per la THG, MB i B, amb similars resultats. Com a la resta d'haptens tipus B, en els espectres de ^1H RMN, es va apreciar un desdoblament dels senyals corresponents als hidrògens dels dobles enllaços. Aquesta prova confirma que l'haptè de competició de la gestrinona es va sintetitzar amb èxit.

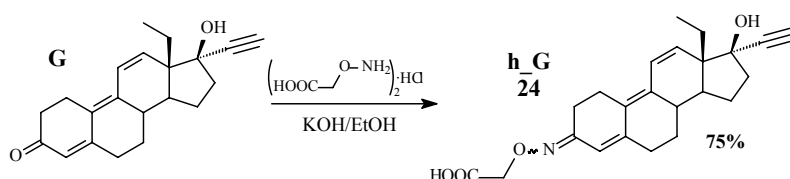


Figura 2.22 Síntesi de l'haptè de competició de gestrinona.

2.4 Síntesi de la α -boldenona

Durant el projecte, es va considerar interessant sintetitzar la α -boldenona, un dels metabòlits de la boldenona, ja que comercialment no estava disponible i així poder realitzar estudis, a nivell del seu comportament cromatogràfic i també poder determinar la reactivitat creuada d'aquest metabòlit en les diferents tècniques que s'estaven desenvolupant en aquell moment. La síntesi de la α -boldenona va esdevenir crucial, ja que darrerament s'està discutint el caràcter endogen d'aquest compost, tal i com es va explicar a l'**apartat 1.1.9.3**, i l'aprovisionament d'aquest compost serviria per aclarir les hipòtesis que s'estan discutint.

La síntesi es va plantejar des d'un principi per inversió de configuració de la 17β -boldenona. L'epimerització d'aquest centre quiral es pot realitzar mitjançant la reacció de Mitsunobu.

2.4.1 Inversió de configuració de C17 de la boldenona

La inversió de configuració de C17 de la boldenona es va basar en el treball realitzat per Martin et al., els quals van fer una modificació d'aquesta reacció per augmentar l'eficàcia d'inversions de configuracions sobre carbonis secundaris amb impediment estèric¹⁵³. En aquest treball feien servir com a nucleòfil per la inversió de configuració, l'àcid p-

nitrobenzoic. En el nostre cas, vam fer servir el o-nitrobenzoic, donat que té una reactivitat molt similar al p-nitrobenzoic.

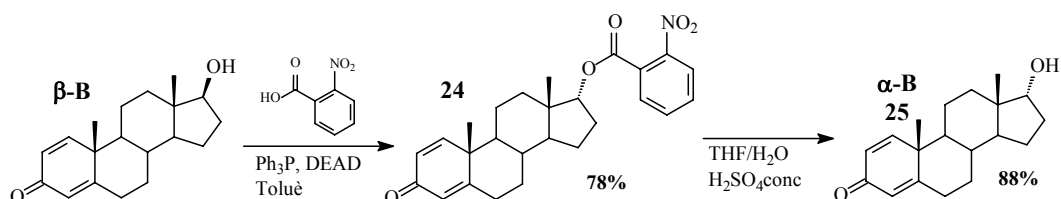


Figura 2.23 Síntesi de la 17α -boldenona, amb inversió de configuració de C17.

Per tant, es va realitzar la reacció de Mitsunobu modificada, dissolent la boldenona en toluè i a continuació afegint els reactius de la Mitsunobu, la trifenilfosfina (Ph_3P), l'azodicarboxilat de dietil (DEAD) i l'àcid o-nitrobenzoic (vegeu **Figura 2.23**). La reacció es va mantenir en condicions anhidres per evitar la interferència del H_2O i es va portar a reflux de toluè. Al cap de 1h la reacció es va donar per finalitzada segons CCF. El cru de reacció es va tractar i es va purificar per cromatografia de sílica. Es va aïllar la fracció que ens interessava i se li va fer un espectre de RMN de ^1H . La formació de l'ester va quedar palesa pel desplaçament del senyal de H17 de la boldenona de δ 3.59 ppm a δ 5.03 ppm, a més de l'aparició dels senyals pròpils de l'anell aromàtic. Es va observar que el senyal de H17 va passar de ser un triplet a δ 3.59 ppm a ser un doblet a δ 5.03 ppm. Donada l'experiència adquirida a la formació d'enllaços esters a OH17, on el senyal de H17 es desplaçava a δ 4.60 ppm però es mantenia el triplet, aquest fet ens va fer pensar que podia haver tingut lloc la inversió de la configuració.

2.4.2 Hidròlisi de l'ester de o-nitrobenzoat de 17α -boldenona

La hidròlisi es va realitzar amb una mescla de THF/ H_2O i unes gotes de $\text{H}_2\text{SO}_4\text{conc}$ (vegeu **Figura 2.23**). La reacció va transcórrer durant tota la nit a T_{amb} . Un cop tractat, al cru de reacció se li va realitzar un espectre de RMN de ^1H . Es va poder comprovar, un altre cop, el canvi de desplaçament químic de δ 5.03 ppm a δ 3.78 ppm per H17, desplaçament molt similar al de la β -boldenona. En canvi, a l'igual que seu precursor **24**, el senyal en comptes de ser un triplet era un doblet.

La raó d'aquest comportament, és que en el cas de la boldenona els angles diedres construïts entre $\Phi(\text{H17}\alpha\text{-H16}\beta)$ i $\Phi(\text{H17}\alpha\text{-H16}\alpha)$ són de 137.6° i 20.7° , respectivament (vegeu **Figura 2.24**). Aproximant l'equació de Karplus per aquest sistema hauríem d'obtenir un acoblament molt similar i per tant veurem un triplet. En canvi, en el cas de la α -boldenona, es van obtenir uns angles diedres per $\Phi(\text{H17}\beta\text{-H16}\beta)$ i $\Phi(\text{H17}\beta\text{-H16}\alpha)$ de 11.5° i -105.2° , respectivament. Fent la mateixa aproximació, en el primer cas s'obtenen uns valors d'acoblament similars als anteriors, però, en el segon cas, l'aproximació de Karplus dona per angles al voltant de 100° , un valor d'acoblament proper a 0 Hz, d'aquí que observem un doblet.

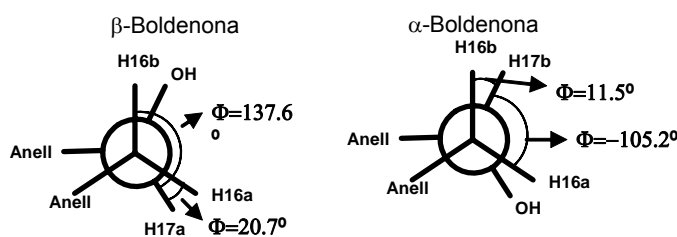


Figura 2.24 Angles diedres formats entre els diferents hidrògens de la β -boldenona i la α -boldenona (angles diedres mesurats amb Hyperchem™ 6.0)

Amb tot i això, per tal de comprovar que realment es va obtenir el producte d'inversió de configuració en C17, es van efectuar una sèrie d'experiments nOe 1D. Tal i com es pot veure a la **Figura 2.25**, quan s'irradia, per tal d'obtenir senyal nOe, el grup Me18 de la 17β -boldenona no s'hauria d'obtenir senyal, com va ser el cas. En canvi, quan es va realitzar el mateix amb la α -boldenona es va observar un senyal nOe corresponent al H17 de la α -boldenona. Per tant la inversió de configuració havia tingut lloc amb èxit.

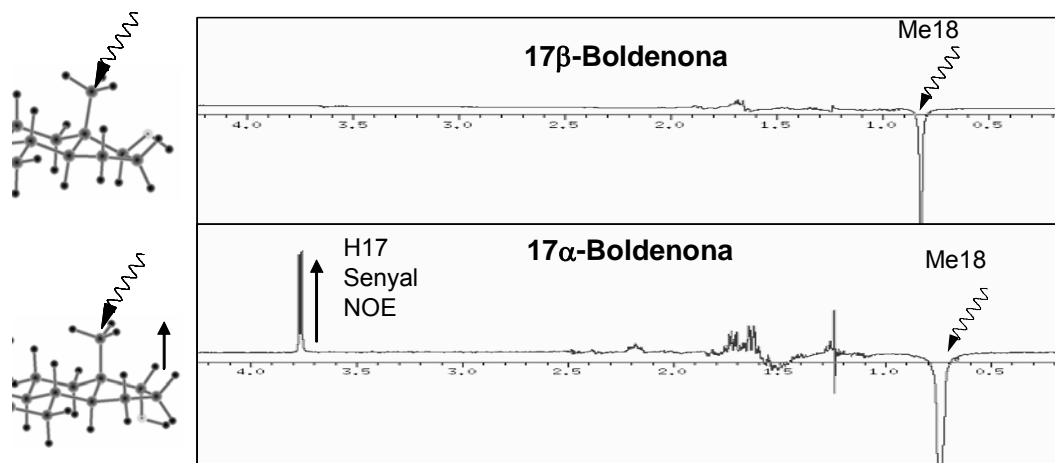


Figura 2.25 Experiments nOe 1D, quan s'irradia els hidrògens del Me18. A dalt es mostra l'espectre de la 17 β -boldenona, i a baix la de la 17 α -boldenona.

Una altra forma de comprobar si hi va haver inversió de configuració va ser mitjançant la mesura del poder rotatori específic del compost sintetitzat ($[\alpha]_D^{25}$). El valor que es va obtenir per la 17 β -boldenona va ser de 19.7° i per la 17 α -boldenona va ser de -7.6°. El canvi de valor del poder rotatori específic ens indica un canvi en la configuració d'algun centre quiral de la molècula. Per tant, ens indica, encara que no d'una forma absoluta, que la boldenona ha epimeritzat en algun dels seus centres quirals.

3 Preparació d'immunoreactius i obtenció d'anticossos policlonals per anabolitzants

3.1 Preparació dels immunògens

Tal i com s'ha mencionat anteriorment, els compostos de baix pes molecular no són capaços per si sols d'estimular el sistema immune dels animals hostes, de manera que és necessari un acoblament covalent del compost que volem determinar a una molècula de pes molecular elevat (generalment proteïnes transportadores). Per tant, en la majoria de casos és necessari la preparació d'un anàleg a l'analit a determinar, amb un braç espaiador on s'incorpori un grup funcional que permeti l'acoblament amb la proteïna. En el cas de les hormones anabolitzants, la funcionalitat introduïda per l'acoblament amb la proteïna, al final del braç espaiador va ser un àcid carboxílic. Aquest grup funcional es pot emprar per la conjugació a proteïnes, ja que els àcids carboxílics poden reaccionar amb les lisines accessibles de la proteïna. A la **Figura 3.1** es pot veure, com a exemple, un esquema de la conjugació de hA_B a una proteïna. Com a proteïna per la immunització es va escollit l'HCH (*horseshoe crab hemocyanin*), una proteïna d'elevat pes molecular (3300 KDa), constituïda per 48 unitats unides en forma de vuit hexàmers.

A més del seu gran pes molecular, aquest tipus de proteïna representa un cos estrany, per tant, augmenta la resposta antigènica dels animals hostes que normalment són mamífers (ratolins, conills o cabres).

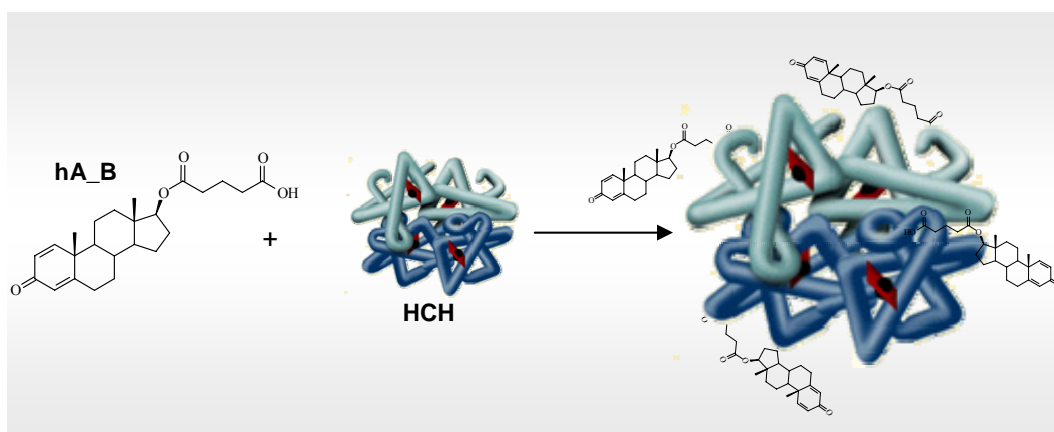


Figura 3.1 Esquema general de la conjugació de l'hA_B a l'HCH.

La conjugació dels haptens d'immunització es va dur a terme mitjançant el mètode de l'anhídrid mixt¹⁵⁴ (vegeu **Figura 3.2**), en el que els grups àcids dels haptens, reaccionen amb els grups amino de les lisines accessibles de la proteïna. La reacció consisteix en una primera activació de l'àcid carboxílic en forma d'anhídrid mixt amb cloroformiat de isobutil, sota condicions anhidres per evitar la hidròlisi del cloroformiat. La reacció es va dur a terme en presència de NBU_3 per neutralitzar el HCl que es produeix durant l'etapa d'activació. El dissolvent emprat va ser la DMF, ja que és un solvent de polaritat elevada i és aconsellable emprar-lo per solubilitzar compostos d'una alta hidrofobicitat. Per altra banda, la DMF és miscible en aigua, condició necessària perquè l'etapa de conjugació amb la proteïna es realitza en un tampó aquós a $\text{pH}=8.6$. Aquests tipus de conjugacions estan ben implantades al laboratori per la preparació d'immunògens i altres bioconjugats¹⁵⁰. Les condicions finals de la reacció d'acoblament han de ser tals que la quantitat de solvent orgànic no excedeixi el 10% del volum total, ja que es corre el perill de que la proteïna es pugui desnaturalitzar. Aquest mètode de conjugació és bastant net pel que fa a la formació de productes secundaris, tot i que s'ha descrit la conjugació de l'isobutilformiat a la proteïna¹⁵⁴.

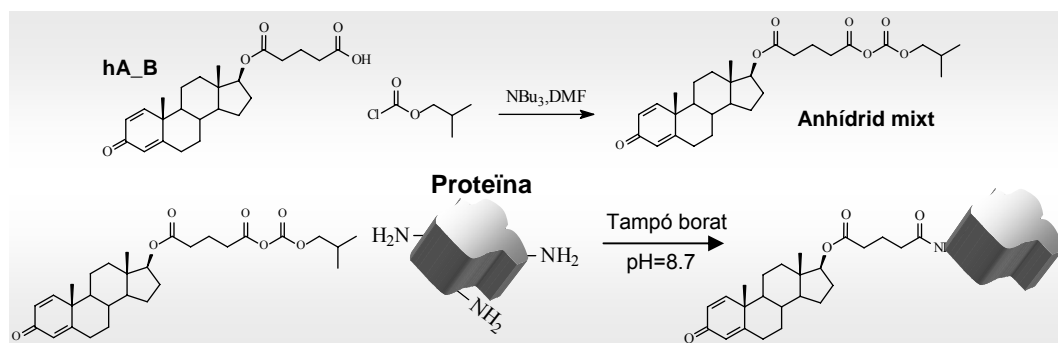


Figura 3.2 Exemple de conjugació de l'haptè hA_B a la proteïna pel mètode de l'anhídrid mixt.

Donat que la HCH és una proteïna extremadament gran i que no se sap el nombre de lisines accessibles que té, és difícil determinar el grau de conjugació assolit. Per aquest motiu, paral·lelament a la conjugació amb l'HCH, es va realitzar l'acoblament a la BSA (*bovine serum albumin*) de més baix pes molecular (66KDa) i de la que se sap que la quantitat de lisines és de 59, de les quals 30-35 són accessibles. Amb aquestes dades es podrà saber el grau de conjugació a BSA i es pot extrapolar el mateix comportament amb l'HCH. Aquest conjugats de BSA es van emprar també en els posteriors assaigs immunoenzimàtics de tipus no competitiu emprats per realitzar els controls d'evolució del títol d'anticòs (vegeu **apartat 3.7**).

3.2 Preparació dels antigens de tapissat a BSA

Tal i com s'ha explicat anteriorment, es van acoblar els haptens sintetitzats a BSA pel mètode de l'anhídrid mixt. Els conjugats que es van obtenir, posteriorment es van emprar com antigens de tapissat pel control del títol d'anticòs durant el procés d'immunització, i per l'optimització dels immunoassaigs per les diferents hormones anabolitzants. La conjugació es va realitzar paral·lelament a l'acoblament a HCH, però a més es van conjuguar els competidors sintetitzats pel desenvolupament dels ELISAs per anabolitzants. La relació molar que es va fer servir per realitzar la conjugació a BSA va ser de 2 equivalents d'haptè per cada lisina accessible de la BSA. La mateixa quantitat d'haptè es va utilitzar per l'HCH. A la **Figura 3.3** es pot veure els haptens que es van conjuguar a la BSA, pel mètode de l'anhídrid mixt.

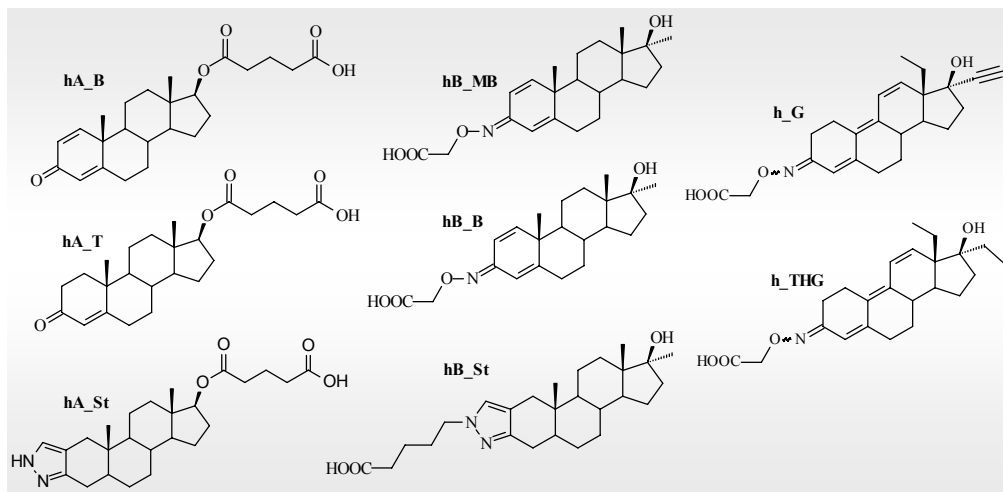


Figura 3.3 Estructura dels haptens emprats com a competidors units covalentment a BSA

Els conjugats, un cop purificats, es van guardar liofilitzats a -40°C fins al seu ús, moment en que es van reconstituir a 1 mg/mL en tampó PBS i es van conservar a 4°C . La caracterització d'aquest conjugats es va realitzar per MALDI-TOF MS.

3.3 Preparació dels traçadors enzimàtics a HRP

Pel desenvolupament d'assajos immunoenzimàtics en format directe, va caldre la conjugació dels competidors (veure **Figura 3.3**) a proteïnes enzimàtiques que es solen utilitzar per aquest propòsit, com ara la HRP (*horseradish peroxidase*) o l'AP (*alkaline phosphatase*). En el nostre cas es va conjuguar a HRP donat que la resposta colorimètrica que dóna és més intensa i la reacció enzimàtica és més ràpida.

La preparació dels conjugats a HRP emprats com a competidors en el desenvolupament dels ELISAs directes es va dur a terme emprant el mètode de l'ester actiu¹⁵⁵. Els mètodes basats en l'ús de carbodiimides és un dels més estesos per acoblar àcids carboxílics a grups amino, i consisteix en una primera etapa d'activació amb dicitclohexilcarbodiimida (DCC) i N-hidroxisuccinimida (NHS), formant-se l'ester actiu, tal i com es pot veure a la **Figura 3.4** i la dicitclohexilurea, insoluble en DMF, i que va ser fàcilment separable per centrifugació. L'addició lenta de la solució de l'ester actiu sobre la proteïna dóna lloc a la conjugació dels grups amino de les lisines accessibles produint enllaços amida. El

mètode de l'ester actiu, a l'igual que l'anhidrid mixt, condueix també a la formació de subproductes indessitjats, en aquest cas degut a les reaccions secundàries entre la DCC i els àcids carboxílics¹⁵⁶.

L'HRP però, al contrari que l'AP que té 50 residus de lisina, presenta només dues lisines accessibles i per tant susceptibles de ser conjugades¹⁵⁷. Per aquest motiu, la conjugació es va dur a terme, seguint metodologies ja establertes al nostre laboratori¹⁵⁵, emprant un excés força elevat d'haptè respecte a lisines de l'HRP (110:1). S'ha de tenir en compte que el rendiment d'acoblament emprant el mètode de l'ester actiu és més elevat que en el cas de l'anhidrid mixt, degut en part, a la menor estabilitat del compost activat.

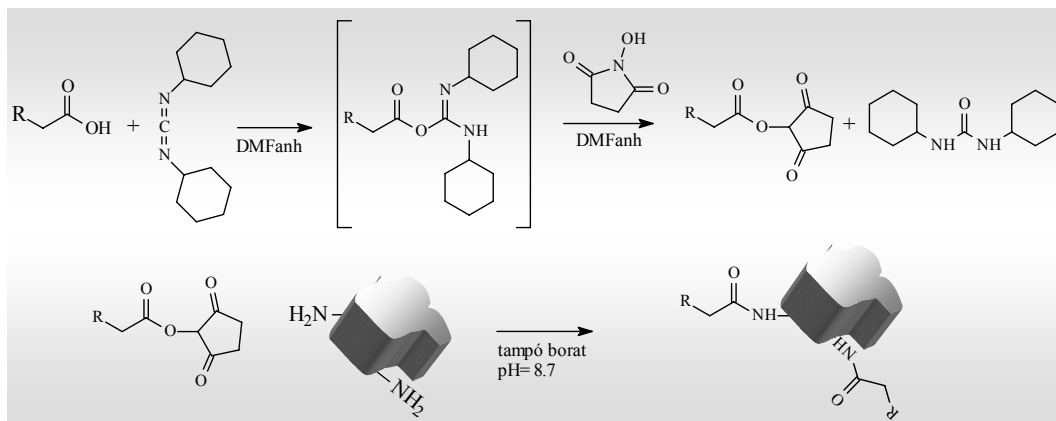


Figura 3.4 Mètode de l'ester actiu emprat per la preparació dels traçadors enzimàtics.

Així, doncs, es van preparar els traçadors enzimàtics amb els competidors i es conservaren liofilitzats a -40°C , fins al seu ús, moment en que es van reconstituir en PBS 10mM a una concentració de 1 mg/mL. La caracterització d'aquest conjugats es va realitzar per MALDI-TOF MS.

3.4 Determinació de la densitat d'haptè dels competidors de BSA i HRP.

L'avaluació del grau de conjugació es pot determinar per diverses tècniques entre les que destaquen aquelles basades en mètodes espectrofotomètrics¹⁵⁸ emprades quan l'haptè conté un grup cromòfor. En aquest cas es mesura l'espectre d'UV de la proteïna conjugada i sense conjugar, i mitjançant una recta de calibratge de l'haptè es pot

determinar el grau de conjugació de la proteïna. Per altra banda, en el cas concret de conjugacions als grups amino de les lisines lliures, també s'utilitza la metodologia basada en la valoració dels grups amino amb l'àcid trinitrobenzensulfònic (TNBS)¹⁵⁹. L'electroforesi en gel (*SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) en la que se separen proteïnes d'acord amb les seves propietats electroforètiques, ha esdevingut útil en el cas de proteïnes amb un pes molecular inferior a 20KDa i haptens amb un pes molecular major de 800 Da¹⁶⁰. En els darrers anys, però, l'ús de tècniques basades en l'espectrometria de masses per la determinació del pes molecular de biomolècules s'ha estès molt, principalment el MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*), ja que permet mesures ràpides i directes així com determinacions quantitatives del pes molecular de les proteïnes, tot i que la limitació de la tècnica rau a que no es poden realitzar mesures a pesos moleculars superiors a 300 KDa.

A partir de la determinació del pes molecular de la proteïna nativa i del seu corresponent conjugat, es pot calcular el nombre d'unitats d'haptè unides a la proteïna (densitat d'haptè, δ) i per tant el grau de conjugació, a partir de la següent expressió:

$$\delta_{\text{haptè}} = \frac{\text{PM}(\text{Conjugat}) - \text{PM}(\text{Proteïna})}{\text{PM}(\text{haptè})}$$

Donat l'elevat pes molecular de l'HCH, no es va poder mesurar per MALDI-TOF MS, d'aquí que es va fer servir com a model de conjugació dels immunògens els conjugats a BSA.

Respecte als conjugats d'HRP, com s'ha comentat anteriorment, l'HRP conté només 2 lisines accessibles susceptibles d'acoblar-se a l'haptè activat, per tant la diferència de massa que s'espera veure per MALDI-TOF MS és molt petita. Per aquest motiu, es va decidir d'incloure un patró intern per tal que la mesura fos el més exacte possible. Es va seleccionar un patró intern que no interferís amb els conjugats i que el seu pes molecular estigués proper al de l'HRP. Per a aquesta finalitat, es va escollir la BSA com a patró intern afegint-lo a la mescla de la mostra amb la matriu. La proporció idònia de

HRP:BSA va ser de 5:1 (w:w), ja que al MALDI-TOF MS va donar una resposta diferent per cadascuna de les proteïnes.

Segons es pot veure a la **Taula 3.1**, gairebé totes de conjugacions es van dur a terme amb èxit. Es va poder comprovar que els conjugats de hA_B, hB_MB, hB_St i hTHG amb BSA van tenir uns valors acceptables de conjugació i per tant podríem extrapolar que la conjugació a HCH també havia estat positiva. Respecte a la resta de competidors, es van obtenir unes densitats de conjugació molt similars als models d'immunògens. Una raó de la similitud de resultats en quan a densitat d'haptens pot ser degut a que són compostos molt similars amb unes característiques de solubilitat i hidrofobicitat que fan que el rendiment de la conjugació sigui molt similar.

Taula 3.1 Densitat d'haptè determinada per MALDI-TOF MS.

	δ							
	hA_B	hB_MB	hA_T	hB_B	hA_St	hB_St	h_THG	h_G
BSA	9.8	6.0	12.0	7.8	0.6	5.1	6.0	6.8
HRP	1.1	1.5	1.4	-	1.8	0.9	-	-

(-) Conjugats no mesurats per MALDI-TOF, o no preparats com en el cas de h_THG i h_G

En quan als conjugats amb HRP dels competidors, tal i com es pot veure a la **Taula 3.1**, totes les conjugacions van donar valors entre 1-2 conjugats d'haptè per HRP. Tot i així, variacions de 300 (una unitat d'haptè unida) i 600 Da (dues unitats d'haptè) poden ser massa baixes considerant l'amplada dels pics. Malgrat aquesta limitació, la conjugació d'aquests enzims es va poder tornar a verificar per estudis d'afinitat amb els antiserums que es van obtenir. Cal però remarcar que en el cas d'una manca de resposta, queda en dubte si la causa va ser una falta de conjugació o una baixa afinitat dels As pel traçador en concret.

Només la formació dels conjugats proteics de hA_St va fallar segons els espectres de MALDI-TOF MS. Contràriament, la conjugació amb HRP, sí que va succeir amb èxit. Cal tenir en compte que la relació molar haptè:Lys és pel cas dels traçadors enzimàtics molt més elevada, i que el mètode emprat és el de l'ester actiu. En relació al mètode de conjugació emprat per formar l'enllaç amida, una possible explicació de la no-conjugació de l'hA_St a BSA pel mètode de l'anhidrid mixte podia ser l'alta reactivitat del nitrogen

de pirazole del hA_St, que podia haver reaccionat amb el cloroformat d'isobutil per tal d'obtenir un carbamat (tal i com es pot veure a la **Figura 3.5**).

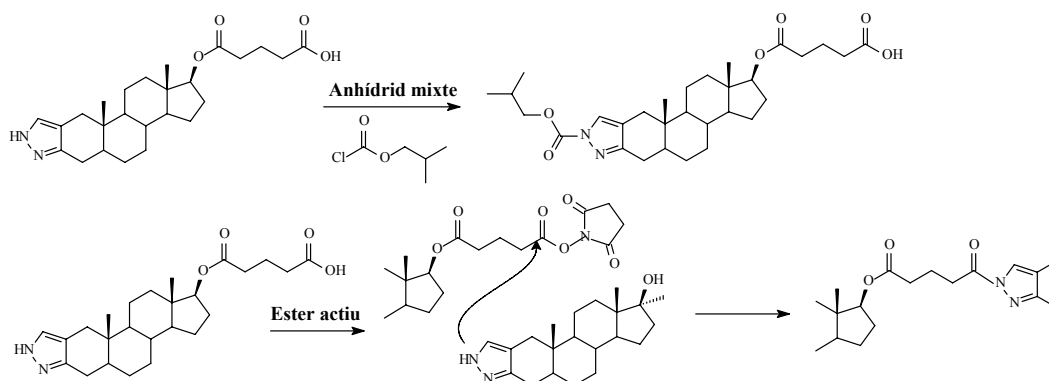


Figura 3.5 Proposta de reacció no desitjada del clorur d'isobutil amb l'hA_St (part superior). Hipòtesi de reactivitat de l'hA_St pel mètode de l'ester actiu (part inferior).

Per tal d'evitar la formació d'aquest producte es va pensar a realitzar la conjugació pel mètode de l'ester actiu. Malgrat això, donada l'elevada reactivitat del nitrogen de pirazole, també podia haver-hi el risc que, un cop activat l'àcid, aquest reaccionés amb una altra molècula de St per formar el dímer (vegeu **Figura 3.5**). Es per això, que es va decidir fer un estudi de la formació d'enllaços amida amb aquest haptè fent servir la metoxitiramina en substitució de les Lys de les proteïnes. D'aquesta manera el producte format es podria aïllar i esbrinar què passa mitjançant la seva caracterització per RMN de ^1H .

3.5 Model de conjugació de hA_St

La reacció model amb metoxitiramina es va realitzar tal i com s'haurien fet les conjugacions a proteïna, però en aquest cas es va fer un seguiment per CCF. La reacció de conjugació amb la metoxitiramina es va deixar tota la nit. Al final es va tractar la reacció i el producte que es va obtenir es va purificar per cromatografia de sílica. Per RMN de ^1H es va poder comprovar que el producte obtingut va ser l'amida **26**. A més, el dqCOSY va deixar constància dels acoblaments establerts en l'enllaç amida produït (vegeu **Figura 3.6**). L'hidrogen característic de l'enllaç amida es pot observar al senyal a δ 5.5 ppm, aquest s'acobla amb el CH_2 veïnal de la metoxitiramina a δ 3.5 ppm. Per altra

banda, els pics corresponents del braç espaiador glutàric també mostren una correlació entre els 2 hidrògens en α a l'èster (δ 2.4 ppm), els hidrògens centrals (δ 1.9 ppm) i els 2 hidrògens en α a l'amida (δ 2.2 ppm). El producte **26** també va ser caracteritzat per MS, el qual va donar una massa de 562.3645 m/z amb un error de 0 ppm respecte la seva massa calculada que és de 562.3642 m/z

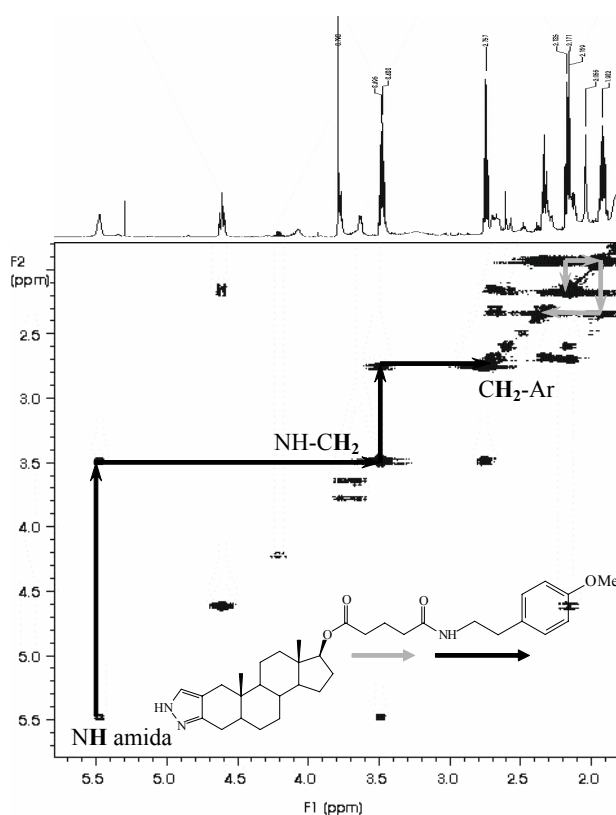


Figura 3.6 Espectro de ^1H i dqCOSY de l'hA_St unit covalentment a la metoxitiramina (amida **26**). Es mostra l'acoblament del braç espaiador (en gris) i de la etilenamina (en negre).

Per tant, es va optar per conjuguar l'hA_St a BSA i HCH pel mètode de l'èster actiu. La caracterització dels conjugat a BSA per MALDI-TOF MS aquest cop sí que va donar positiu amb un valor de 9.8 restes d'hA_St per BSA.

3.6 Protocol d'immunització

3.6.1 Immunització homòloga: producció d'Ac per St, B, MB i THG

Amb els conjugats a HCH dels haptens immunització es van immunitzar 2 conills per hA_B (138, 153), hB_MB (142, 143), hA_St (145, 149) i hB_St (147, 148), i 3 conills pel cas de hTHG (168, 169, 170) seguint el protocol d'immunització descrit a la part experimental. Un cop iniciat el protocol amb els immunògens es van dur a terme els controls regulars per veure l'evolució del títol d'anticòs i en tots ells es va observar una gran resposta des de les dues primeres inoculacions. A cada conill se li van inocular 100 µg d'immunogen barrejats amb l'adjuvant de Freund, substància que s'empra per millorar i estimular la resposta immune així com per facilitar un alliberament lent de l'antigen. Aquest procés es va repetir cada mes durant un total de sis mesos, fins que no s'observà variació en el títol d'anticòs.

3.6.2 Immunització heteròloga: producció d'Ac per MB

Normalment, els haptens d'immunització es dissenyen de manera que, en la mesura del possible, els grups més característics de la molècula quedin exposats al sistema immune. Una altra estratègia es basa en l'ús de més d'un haptè durant el protocol d'immunització on cadascú dels quals maximitza el reconeixement d'un epítop, és el que s'anomena immunització heteròloga.

L'heterologia pot introduir-se de dues maneres, ja sigui inoculant una mescla dels immunògens tant a la injecció inicial com a les de record (immunització pseudoheteròloga), o bé alternant-los com a immunògens únics en les diferents inoculacions del protocol. Aquesta última estratègia va dirigida a obtenir anticossos que siguin capaços de reconèixer ambdós epítops de la molècula, però ha estat emprada en poques ocasions i en la majoria dels casos, únicament amb la intenció de produir anticossos catalítics¹⁶¹⁻¹⁶³; i en cap cas per desenvolupar posteriorment immunoassaigs, de manera que hi ha poca informació relativa a l'especificitat d'anticossos obtinguts seguint

aquest procediment. Respecte a les inoculacions de mescles d'immunògens, treballs previs realitzats al nostre grup d'investigació (tesis doctorals per M.-Carmen Estevez¹⁶⁴ i Roger Galve¹⁶⁵) han mostrat que aquesta estratègia pot conduir a la producció d'anticossos amb un perfil de reconeixement més ampli.

En el nostre cas, el tipus d'immunització que es va escollir per l'obtenció d'anticossos específics va ser el d'inoculacions alternades. Aquest tipus d'estratègia es va emprar amb l'objectiu d'obtenir anticossos el més específics possible per la MB. Per tant, es va començar per la immunització dels haptens de tipus A (hA_B), i després es va anar alternant amb els haptens de tipus B (hB_MB) fins al final del protocol. També en aquest cas es van utilitzar conjugats de HCH. La seqüència d'inoculacions que es va programar va ser A-B-A-B-A-B. Per l'obtenció d'anticossos específics per la MB es van inocular els conills 140 i 141.

3.7 Evolució del títol d'anticòs

Abans d'iniciar el protocol d'immunització es va extreure una petita quantitat de sang (antisèrum preimmune) la qual es va fer servir com a sèrum control no específic donada la teòrica absència d'anticossos específics. Amb aquest antisèrum i amb els que es van anar extraient de manera periòdica cada mes, aproximadament entre 8 i 10 dies posteriors a la inoculació, es van realitzar els controls en els quals es va avaluar la producció d'anticossos específics, mitjançant un ELISA no competitiu en format indirecte (vegeu **Figura 3.7**). En aquests assaigs es va tapissar la placa amb l'antigen corresponent (conjugat a BSA) pel cas de les immunitzacions homòlogues. Pel cas de la immunització heteròloga, el control de la producció d'anticossos es va fer amb plaques tapissades amb els dos antigens corresponents (conjugats de BSA).

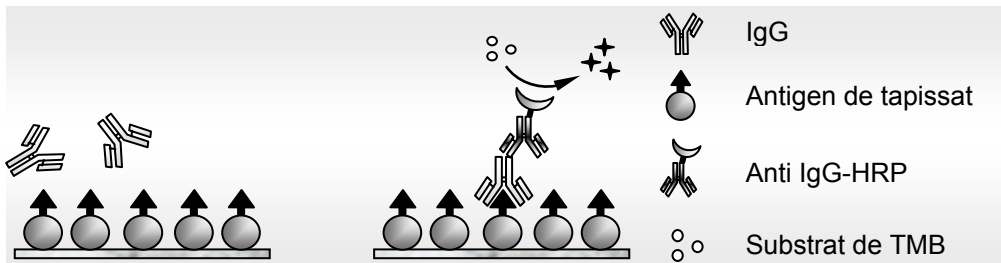


Figura 3.7 Esquema d'un ELISA no competitiu en format indirecte.

Com es pot veure a la **Figura 3.8**, l'increment en la producció d'anticòs contra l'immunogen es va produir entre la primera i la segona inoculació, mantenint-se després la resposta més o menys constant durant les posteriors immunitzacions de record, en les quals es dona el procés de maduració¹⁶⁶. Durant aquest procés no hi ha un augment de la producció d'anticòs sinó que hi ha un enriquiment del sèrum amb aquells clons d'anticòs més específics per la substància inoculada.

Com es pot observar, a les immunitzacions homòlogues, el títol d'anticòs segueix un perfil tal i com s'ha explicat anteriorment. És de remarcar l'alt grau d'afinitat observat pels antiserums envers el seu antigen, fet que dona entendre el potencial antigènic d'aquests anabolitzants. En quan a les immunitzacions heteròlogues (hA_B-HCH i hB_MB-HCH), tal i com s'ha explicat anteriorment, es va controlar el títol d'anticòs amb els dos antigens de BSA. En aquest cas, el títol d'anticòs amb afinitat per hA_B-BSA és uniforme i força elevat des del primer moment. Per contra, quan l'antigen és hB_MB-BSA s'observa que l'afinitat dels antiserums va augmentant lentament fins al final del protocol.

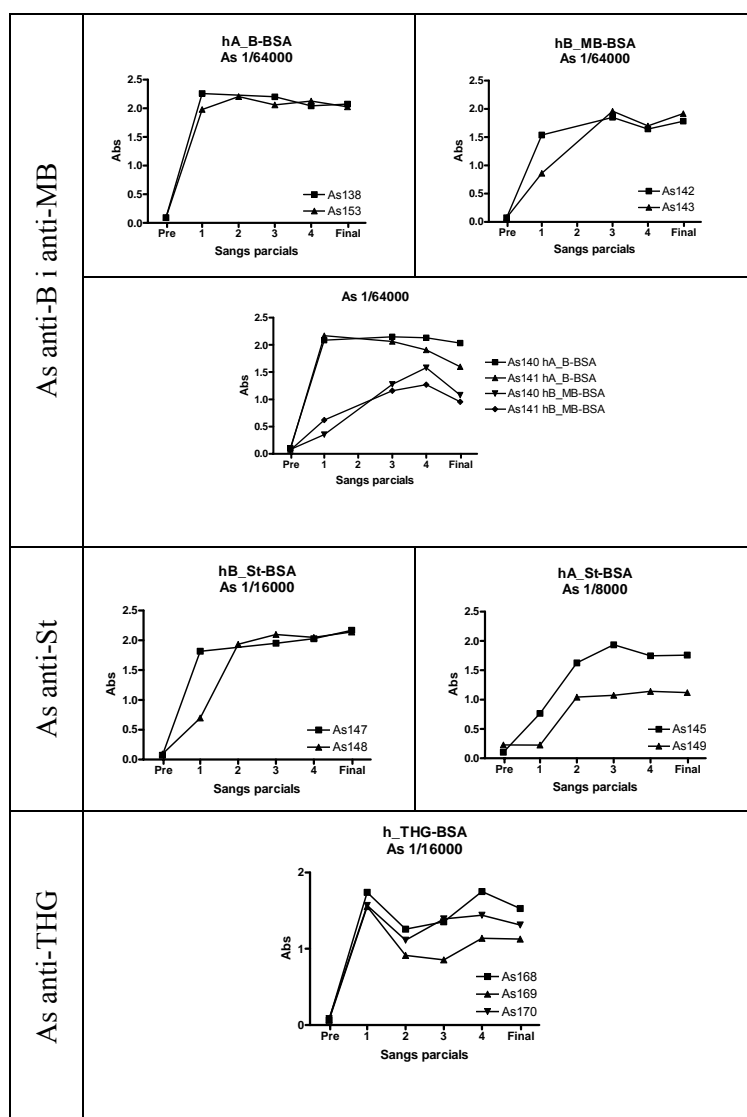


Figura 3.8 Evolució del títol d'anticossos (immunitzats amb els conjugats h_i -HCH). S'indica l'antigen de tapissat (conjugats h_i -BSA, a una concentració de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) i la dilució d'anticòs realitzada.

4 Desenvolupament d'immunoassaigs per a la determinació d'hormones anabolitzants.

Un cop preparats els immunoreactius, es va procedir a l'establiment d'assaigs per la determinació de les hormones anabolitzants. S'han investigat tècniques tipus ELISA en diferents formats, directe i indirecte (vegeu **Figura 4.1**).

Els ELISA directes consten d'una etapa menys en el protocol, de manera que són més ràpids. El format directe consisteix en la immobilització dels anticossos específics sobre la placa, i l'analit competeix amb el traçador enzimàtic (TE). La mesura és directa després d'afegir el substrat. En els ELISA en format indirecte el competidor, conjugat habitualment a una proteïna s'immobilitza directament sobre la placa (antigen de tapissat, AT) mentre que l'analit i l'anticòs es troben en solució. El format indirecte incorpora una etapa més en el protocol ja que la concentració d'analit es mesura indirectament per addició d'un anticòs marcat enzimàticament i que reconeix específicament els anticossos del conill. Presenta certs avantatges respecte el format directe principalment pel que fa a la seva estabilitat davant canvis importants en les condicions del medi. Així, en el format directe, el traçador enzimàtic (TE) està en contacte amb la matriu de manera que

força iònica. Cal tenir en compte que les interaccions són de tipus hidrofòbic, van der Waals, interaccions electrostàtiques i ponts d'hidrogen. La presència de detergents, com ara el Tween 20, ajuda a la solubilització i disminueix les adsorcions inespecífiques. Les condicions utilitzades habitualment al nostre grup per avaluar el títol d'Ac o seleccionar els millors immunoreactius: consisteixen a fer servir temps de competència de 30 min i tampó PBS 10mM a pH=7.5 i un 0.05% Tween 20. Aquest tampó té un contingut de NaCl de 0.8 %, el qual fa que presenti una força iònica de 12 mS/cm.

Abans de començar l'explicació del desenvolupament dels diferents ELISAs s'hauria de clarificar uns conceptes que potser podrien confondre. *Immunització homòloga* és produeix per inoculació només un immunogen durant el protocol d'immunització. Per altra banda, la *immunització heteròloga* es realitza, com en el cas de la producció d'Ac per MB, alternant la inoculació dels diferents immunògens. *Combinació homòloga* és aquella combinació Ag/Ac en la qual l'antigen de competició conté el mateix haptè que l'immunogen pel qual s'han obtingut els Ac que s'avaluaran. En canvi, una *combinació heteròloga* és la que s'avalua un antigen de competició unit a un haptè diferent al qual s'han produït anticossos.

4.1 Desenvolupament d'un ELISA indirecte per la THG

El desenvolupament d'un ELISA en format indirecte per la detecció de la THG es va fer avaluant dos competidors units a BSA, **hTHG-BSA** i **hG-BSA**, i tres antisèrums que van ser produïts contra hTHG-HCH, **As168-As169-As170** (vegeu **Figura 4.2**).

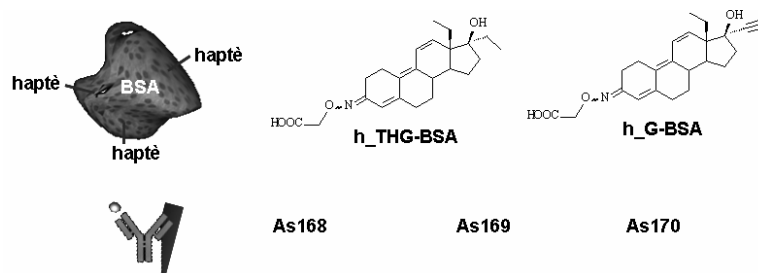


Figura 4.2 Immunoreactius avaluats pel desenvolupament d'un ELISA per THG

4.1.1 Valoració de l'afinitat As168-170 pels AT hTHG-BSA i hG-BSA

En avaluar l'afinitat dels As pels antigens de tapissat mitjançant un ELISA no competitiu 1D (vegeu **apartat 9.2.8.1.2**) en format indirecte es van obtenir bons nivells de resposta per totes sis combinacions As/AT. Factors de dilució d'As entre 1/8000 i 1/16000, a una concentració d'AT de 1µg/mL van donar un senyal de 1.0 U.A. En tots els casos va ser una indicació de l'alta afinitat dels As pels AT, tant en les combinacions homòlogues (que es va fer servir com a AT, hTHG-BSA) com en les heteròlogues (AT, hG-BSA).

Així, totes les combinacions As/AT van ser seleccionades per realitzar ELISAs no competitiu de tipus 2D per tal de seleccionar les concentracions d'immunoreactius més adequats per la competència. Es van seleccionar concentracions que donessin una resposta propera a la saturació (aproximadament del 70%) i amb una absorbància propera a 1.0 U.A. A la **Taula 4.1** es mostren les combinacions triades per a l'avaluació de la capacitat d'aquestes combinacions per reconèixer la THG.

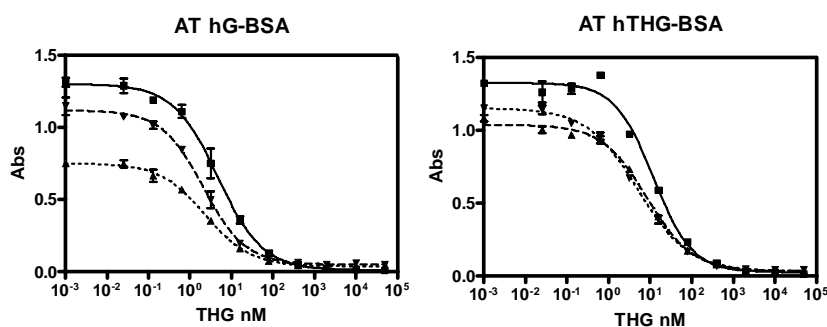
Taula 4.1 Factors de dilució dels As i AT obtinguts a partir dels assaigs 2D.

AT	As	Dilució As	[AT]/ µg/mL	U.A.
	168	1/16000	0.125	1.17
hTHG-BSA	169	1/8000	0.125	0.81
	170	1/16000	0.125	0.88
	168	1/16000	0.125	0.94
hG-BSA	169	1/8000	0.125	0.70
	170	1/16000	0.125	0.82

4.1.2 Assaigs competitiu indirectes per la THG

Com analit es va emprar la THG que s'havia sintetitzat (vegeu **apartat 2.2.3.1**), ja que comercialment no existia cap mostra de referència. Les corbes en condicions estàndard tal com s'ha mencionat anteriorment.

Totes les combinacions As/AT que es van estudiar van donar lloc a assaigs competitiu tal com es mostra a la **Gràfica 4.1**. Segons es pot veure als paràmetres que es van extreure de l'equació d'ajust (vegeu **Taula 4.2**), tots els assaigs són bons respecte l' A_{max} , l' A_{min} , el pendent i l'error associat a la corba. Igualment, pel que fa als valors de les IC_{50} , mostrant la bona detectabilitat aconseguida per la detecció de la THG. En tots els casos, es van aconseguir unes IC_{50} per l'ordre de les **ppb** ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Es va poder observar que les combinacions més sensibles corresponien a les combinacions en les que es feia servir de competidor hG-BSA respecte l'homòleg.



Gràfica 4.1 Assaigs competitiu obtinguts a partir de les combinacions AT-As. As 168 (■), As169 (▲) i As170 (▼).

Taula 4.2 Característiques dels ELISAs indirectes obtinguts per la detecció de THG

AT	As	A_{max}	A_{min}	Pendent	IC_{50} $\mu\text{g}/\text{L}$	R^2
hTHG-BSA	168	1.32	0.02	-0.93	3.74	0.990
	169	1.03	0.03	-0.79	2.65	0.996
	170	1.15	0.03	-0.70	1.59	0.998
hG-BSA	168	1.30	0.01	-0.80	1.46	0.993
	169	0.75	0.03	-0.79	0.72	0.995
	170	1.11	0.05	-0.85	0.47	0.995

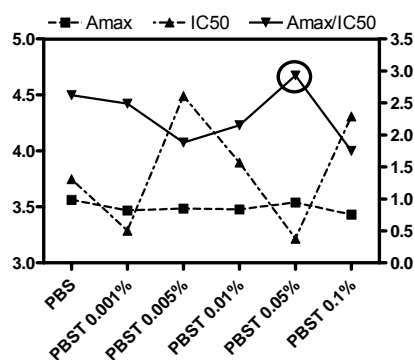
Finalment, es va seleccionar la combinació **As170/hG-BSA** per a dur a terme els posteriors estudis d'optimització i avaluació de l'assaig. Es van estudiar diferents paràmetres físico-químics com ara la força iònica del tampó, pH, efecte de la

concentració del Tween 20 i la utilització de solvents orgànics al medi de competència, entre d'altres.

4.1.3 Optimització i avaluació de l'ELISA As170/hG-BSA per THG

4.1.3.1 Efecte del Tween 20

Un dels paràmetres que es van estudiar en una primera instància va ser la concentració de Tween. S'ha descrit que en ELISAs per compostos hidrofòbics es produeix una millora de la detectabilitat de l'assaig a baixes concentracions de detergent¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Malgrat els precedents, tal i com es pot observar a la **Gràfica 4.2**, en el nostre cas no es va observar una millora substancial. Per tant es va decidir continuar amb les condicions estàndard amb un 0.05% de Tween 20.



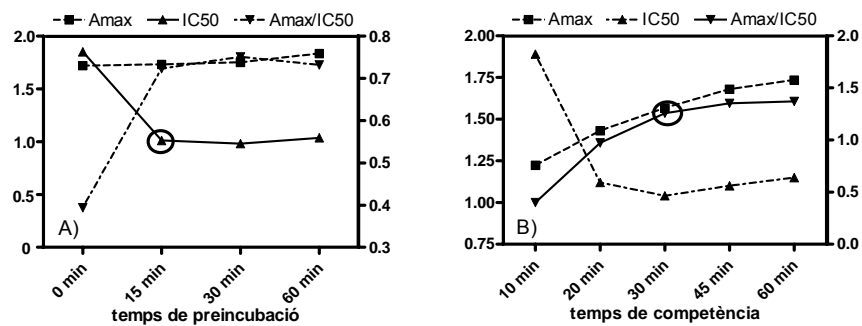
Gràfica 4.2 Efecte de la concentració de Tween 20 en el tancament de competència de l'assaig As170/hG-BSA. Els valors de Amax són U.A. (eix de la dreta, junt amb Amax/IC₅₀) i els de IC₅₀ en nM (eix de la esquerra).

4.1.3.2 Efecte del temps de preincubació i el temps de competència

En certes ocasions hi pot haver una millora de la detectabilitat quan es posa en contacte l'analit i l'anticòs prèviament a l'etapa de competència. Els resultats d'aquest estudi pel cas de l'ELISA de la THG, es poden veure a la **Gràfica 4.3.A**, on s'aprecia una millora de l'assaig quan hi ha una preincubació de l'anticòs amb l'analit. Amb només 15 min d'estar en contacte l'analit i l'anticòs, es millora la detectabilitat de 1.85 nM a 1.01 nM,

gairebé un 50% de millora, per tant es va establir que el protocol tingués una etapa addicional de 15 min de preincubació.

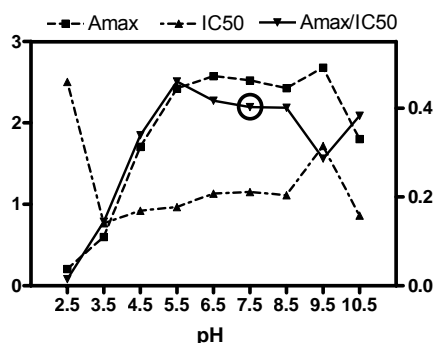
Un altre paràmetre important a l'etapa de competència és el temps requerit per establir competència entre l'analít i el competidor per l'anticòs. A la **Gràfica 4.3.B** es representa l'efecte dels diferents temps de competència avaluats. En aquest cas, es va veure que períodes inferiors a 20 min ocasionen una davallada força important de l'Amax, a més d'un augment de valor de la IC₅₀. Per tant, es va decidir que el temps de competència fos de 30 min.



Gràfica 4.3 Efecte dels temps de reacció per l'assaig As170/hG-BSA. **A)** Temps de preincubació. **B)** Temps de competència. L'eix de les IC₅₀ es van mesurar en nM (eix de l'esquerra) i el d'Amax en U.A (eix de la dreta, junt amb Amax/IC₅₀).

4.1.3.3 Efecte del pH

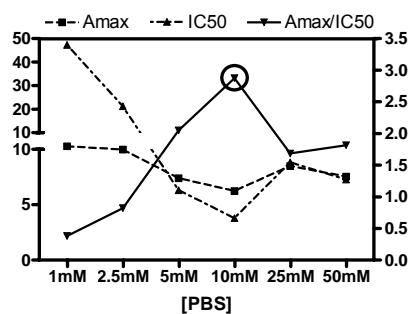
Tal i com es pot observar a la **Gràfica 4.4**, els valors de la IC₅₀ es van mantenir constants des de pH=3.5 a 8.5, però, els valors de l'Amax a pHs inferiors a 4.5, van ser molt baixos. Per tant, si s'observa l'Amax/IC₅₀ es veu que l'assaig va romandre constant entre pH 5.5 a 8.5, mantenint una IC₅₀ al voltant de 1.0 nM, si bé l'assaig sembla tolerar millor els medis bàsics que no pas àcids. Per tant, es va seguir treballant a pH=7.5, sabent que l'assaig no es veurà afectat al voltant d'aquest pH.



Gràfica 4.4 Efecte del pH a l'etapa de competència per l'assaig As170/hG-BSA. L'eix de les IC₅₀ es van mesurar en nM (eix de l'esquerra) i el d'Amax en U.A. (eix de la dreta, junt amb Amax/IC₅₀).

4.1.3.4 Efecte de la conductivitat

Es va comprovar si la força iònica del medi de competència podia afectar les interaccions analít-anticòs anticòs-antigen de tapissat per obtenir una millora de la detectabilitat de l'assaig. Es van preparar diferents solucions de PBS (de 50mM a 1mM) amb una conductivitat específica entre 54.5 i 1.09 mS·cm⁻¹. Cada solució es va ajustar a pH=7.5 i se li va afegir la quantitat corresponent de Tween 20. Els resultats de l'experiment es mostren a la **Gràfica 4.5**, on s'aprecia que l'assaig és bastant sensible als canvis de conductivitat del medi. Tal i com es pot observar, quan els medis amb força iònica baixa no són favorables ja que empitjora significativament la detectabilitat (IC₅₀ de 20nM quan es treballa a 2.5mM de PBS). En canvi l'assaig sembla tolerar molt millor els medis amb conductivitats altes. Tot i això, els millors valors d'IC₅₀ es van obtenir quan la conductivitat estava al voltant de 10.9 mS/cm, que correspon a un tampó de PBS de 10 mM. Per tant es va decidir treballar a aquesta concentració de PBS.



Gràfica 4.5 Efecte de la conductivitat al medi de competència per l'assaig As170/hG-BSA. L'eix de les IC₅₀ es va mesurar en nM (eix de l'esquerra) i el d'Amax en U.A. (eix de la dreta, junt amb Amax/IC₅₀).

4.1.4 Especificitat de l'ELISA As170/hG-BSA

La selectivitat dels anticossos en aquest assaig davant de compostos estructuralment relacionats, va ser avaluada preparant corbes de calibratge per cada un dels compostos triats seguint les mateixes condicions de treball que per la THG, i mesurant-les en l'ELISA optimitzat. A partir de les IC₅₀ determinades, es va calcular el percentatge de reactivitat creuada (%RC) segons la següent expressió:

$$\%RC = \frac{IC_{50}(THG)}{IC_{50}(analit)} \times 100$$

Es van avaluar altres anabolitzants esteroidals, com la boldenona, la metilboldenona, la trenbolona, la noretandrolona, l'estanozolol, la nortestosterona, la metiltestosterona, l'androstendiona o l'androstandienedione. També es van avaluar compostos esteroidals endògens com poden ser el colesterol, la testosterona, la dihidrotestosterona, la progesterona, l'estradiol o l'estrone. Així com altres estructures esteroidals com la dexametasona, l'etinilestradiol, la pregnenolona o el precursor sintètic de la THG, la gestrinona.

Taula 4.3 Especificitat de l'ELISA As170/hG-BSA

Compost	IC₅₀ nM	% RC
Tetrahidrogestrinona	1.03	100
Gestrinona	16.41	6
Noretandrolona	5.12	20
Trenbolona	>1000	<0.2
Androstenediona	>1000	<0.2
Androstan-diene-diona	>1000	<0.2
Estanozolol	>1000	<0.2
Dihidrotestosterona	>1000	<0.2
Boldenona	>1000	<0.2
Metilboldenona	>1000	<0.2
Nortestosterona	>1000	<0.2
Metiltestosterona	>1000	<0.2
Testosterona	>1000	<0.2
Progesterona	>1000	<0.2
Pregnenolona	>1000	<0.2
Dexametasona	>1000	<0.2
Etinilestradiol	>1000	<0.2
Estradiol	>1000	<0.2
Estrona	>1000	<0.2
Colesterol	>1000	<0.2

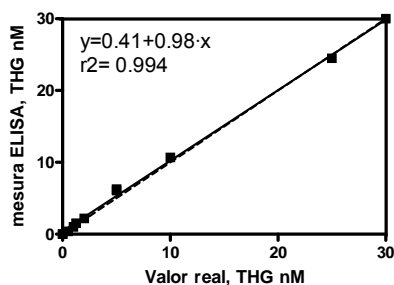
Els resultats d'aquest experiment es mostren a la **Taula 4.3**. Tal com es pot observar, va resultar un assaig molt específic respecte els altres compostos esteroidals. S'ha de remarcar la baixa reactivitat creuada amb la gestrinona, precursor sintètic de la THG, on hi ha un cert reconeixement, possiblement degut a que la gestrinona conserva l'estructura triènica de la THG i amb el grup etil a 18, però, amb la diferència que la G té un grup etinil a 17 α en comptes del grup etil de la THG. Això ens dóna entendre que aquest grup etil a 17 α és un determinant antigènic important pel reconeixement de la THG, més que la resta de la molècula. Això també queda evidenciat per la reactivitat creuada de la trenbolona. Aquesta molècula té la mateixa estructura triènica que la THG, però en

comptes d'un grup etil a 18, té un grup metil, i no conté el grup etil a 17 α . Per tant, l'estructura triènica, com a priori s'hauria esperat, no és determinant del reconeixement. L'únic compost que presenta una reactivitat creuada important és la noretandrolona, un compost molt semblant a la nandrolona, però, amb un grup etil addicional en posició 17 α . La raó d'aquest reconeixement l'hem de buscar en la similitud de la THG i la noretandrolona en el grup etil en posició 17 α .

En una possible aplicació a la detecció de THG en matrius biològiques, no seria d'esperar interferències procedents dels compostos esteroidals endògens, ja que no tenen gaire efecte sobre l'assaig.

4.1.5 Estudis d'exactitud de l'ELISA optimitzat

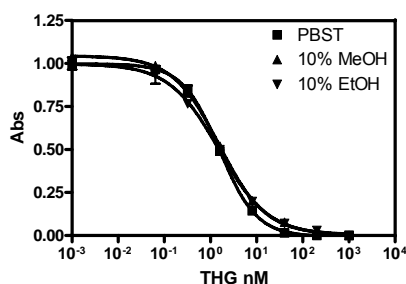
Per tal d'avaluar la precisió i l'exactitud de l'assaig es van realitzar una sèrie de mesures de mostres cegues. Una persona aliena al desenvolupament de l'assaig va preparar una sèrie de mostres en el tampó de treball. A partir de cada mostra es van preparar dilucions (2, 4 i 8 vegades) per tal d'assegurar una mesura fiable dins de l'interval de treball de l'ELISA. Segons es pot veure a la **Gràfica 4.6**, els resultats d'aquest experiment van mostrar la bona correspondència entre els valors mesurats i els valors reals, amb una pendent de 0.98 i una r^2 de 0.994.



Gràfica 4.6 Estudis d'exactitud per l'ELISA As170/hG-BSA emprant mostres cegues. Valors representats en nM

4.1.6 Efecte dels dissolvents orgànics a l'assaig As170/hG_BSA

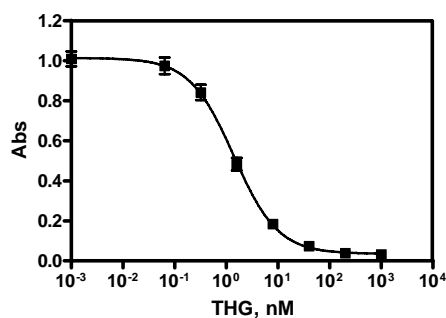
Per intentar de millorar la detectabilitat de l'assaig, o per si fos necessària la presència d'un dissolvent orgànic a l'etapa de competència per la determinació de THG en mostres que provenen d'extractes en solvents orgànics, es va avaluar l'efecte del MeOH i l'EtOH al 10% en l'etapa de competència. Els resultats obtinguts es poden veure a la **Gràfica 4.7**. Tal i com es pot observar, la presència de aquest dissolvents orgànics a aquesta concentració no afecta ni a la detectabilitat de l'assaig ni hi ha una inhibició de la Amax. Per tant, en el cas de que fos necessari, es podria utilitzar MeOH o EtOH a l'assaig a aquesta concentració.



Gràfica 4.7 Efecte del MeOH i l'EtOH al 10% en l'etapa de competència.

4.1.7 Sumari de l'ELISA As170/hG-BSA per THG.

El protocol final de l'assaig As170/hG-BSA per la detecció de la THG va consistir en un ELISA de format indirecte, el qual consta d'una etapa de preincubació (15min) i una etapa de competència (30min). El medi en el qual té lloc la interacció té un pH=7.5, amb una concentració de Tween 20 de 0.05% i un tampó PBS a una conductivitat de 10.9 mS/cm. Després es segueix amb les etapes de revelat del senyal, que corresponen a una etapa amb anti-IgG-HRP (30 min) i una de substrat (30 min). Sota aquestes condicions es va obtenir una corba de calibratge (vegeu **Gràfica 4.8**) amb una IC₅₀ de 0.45 ± 0.14 µg/L (N=9) i amb un LOD de 0.045 ± 0.015 µg/L (N=9, corresponent al 90% de la inhibició de l'assaig). A la **Taula 4.4** es mostren els paràmetres de l'assaig. Pel valor de la desviació estàndard, es pot comprovar la bona reproduïbilitat de l'assaig.



Gràfica 4.8 Corba de calibratge de l'ELISA optimitzat As170/hG-BSA per la THG.

Taula 4.4 Característiques de l'ELISA optimitzat As170/hG-BSA.

As170/hG-BSA ^{*1,2}	
Amax	0.88±0.14
Amin	0.03±0.01
IC₅₀ µg/L	0.45±0.14
Pendent	-0.991±0.14
Interval de treball, µg/L	0.108±0.032 a 1.983±0.713
LOD, µg/L	0.045±0.015
r²	0.992±0.004

^{*1} Les dades corresponen a la mitja i la desviació estàndard dels paràmetres extrets de l'equació logística emprada per ajustar la corba (N=9, assaigs realitzats em diferents plaques i en dies diferents)

^{*2} El LOD correspon a la corba el valor corresponent a IC₉₀, mentre que l'interval de treball correspon a IC₈₀-IC₂₀.

A més d'obtenir un assaig per la determinació de THG amb una detectabilitat molt bona i amb una bona reproduïbilitat, es va obtenir una especificitat molt gran respecte altres compostos esteroidals, excepte en el cas de la gestrinona i la noretandrolona, que es va obtenir una reactivitat creuada del 6 i 20%, respectivament. S'ha de sumar la bona correspondència que es va observar quan es van mesurar mostres dopades amb una pendent de 0.98 i una r² de 0.994. Respecte la presència de dissolvents orgànics al tampó de competència, no es va veure una diferència substancial en els paràmetres de la corba fins a un 10% d'EtOH o de MeOH.

4.2 Desenvolupament d'immunoassaigs per St

Pel desenvolupament d'un ELISA de format indirecte per la detecció de St, es van utilitzar els següents antisèrums: **As145**, **As147**, **As148** i **As149**. Com antigens de tapissat es van utilitzar **hA_St-BSA** i **hB_St-BSA**. Pel desenvolupament dels ELISAs directes, es van fer servir els traçadors enzimàtics **hA_St-HRP** i **hB_St-HRP** (vegeu **Figura 4.3**).

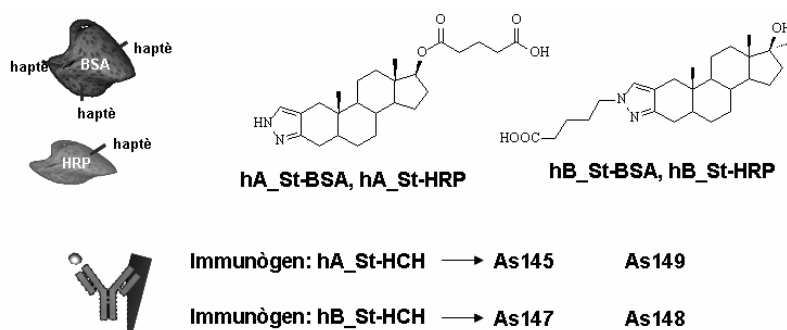


Figura 4.3 Immunoreactius per al desenvolupament d'ELISAs per St

Tal com s'ha comentat prèviament, l'objectiu en aquest cas era aconseguir diferents assaigs amb uns patrons de reconeixement definit segons si l'aplicació analítica era el camp agroalimentari (St i 16bOH-St) o l'àmbit esportiu (St i 3'OH-St).

4.2.1 Valoració de l'afinitat dels As145,147-149 pels AT(hA_St-BSA i hB_St-BSA) i pels TE (hA_St-HRP i hB_St-HRP).

Es va avaluar l'afinitat dels As pels AT mitjançant un ELISA indirecte no competitiu. Es va veure una gran resposta del As147 i As148 per hB_St-BSA, arribant a dilucions de 1/64000 per aconseguir una absorbància de 1.2 U.A., i per hA_St-BSA, arribant a dilucions de 1/8000 de l'antisèrum per obtenir una resposta de 1.1 U.A. Respecte dels As 145 i As149 es va observar molta més afinitat pel seu antigen homòleg, el hA_St-BSA (dilució 1/8000 per 1.2 U.A.), que pel hB_St-BSA (dilució 1/1000 per 0.5 U.A.), per tant aquesta combinació es va descartar per continuar els estudis.

Respecte a l'afinitat pels TE, es van realitzar ELISAs directes no competitiu 1D observant-se resposta només pel hA_St-HRP quan els As eren As145 i As149. És a dir,

només els As generats contra l'haptè de tipus A donaren resposta en aquest format i/o ho van fer exclusivament en condicions homòlogues.

Les combinacions escollides per realitzar ELISA tipus 2D, van ser els As147,148 amb hB_St-BSA i els As145,149,147 i 148 amb hA_St-BSA pel que fa al format directe, les combinacions escollides per als ELISAs competitius en format directe van ser hA_St-HRP i As145,149. Com a resultat d'aquests estudis es van seleccionar les concentracions d'immunoreactius que es mostren a la **Taula 4.5** per fer els experiments de competència.

Taula 4.5 Concentracions d'immunoreactius a partir dels assaigs 2D.

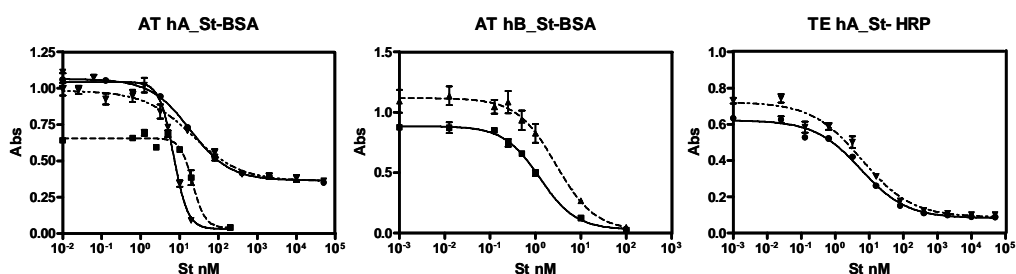
Immunogen.	As(Dilució)	Competidor($\mu\text{g/mL}$)	U.A.	Format*		
hA_St-HCH	145	1/4000	hA_St-BSA	0.078	0.698	Ind
		1/8000	hA_St-HRP	0.312	1.02	D
	149	1/4000	hA_St-BSA	0.156	0.786	Ind
		1/8000	hA_St-HRP	0.156	1.15	D
hB_St-HCH	147	1/2000	hA_St-BSA	0.625	0.796	Ind
		1/32000	hB_St-BSA	0.039	0.790	Ind
	148	1/2000	hA_St-BSA	0.625	0.845	Ind
		1/32000	hB_St-BSA	0.078	0.924	Ind

* Ind= Indirecte, D=Directe

4.2.2 Assaigs competitius pel St.

A partir de les concentracions que es van obtenir anteriorment es van realitzar els assaigs ELISA competitius en format indirecte. La competència es va realitzar amb PBST estàndard (PBS 10mM, 0.05% Tween 20) i l'estanozolol com analit. En tots els casos es va observar competència entre l'antigen de tapissat i l'analit per l'anticòs, obtenint-se així les corbes de competència que es mostren a la **Gràfica 4.9**. Segons les dades que es van obtenir mitjançant l'equació logística (vegeu **Taula 4.6**), els assaigs amb una millor detectabilitat corresponen als As147-148, utilitzant com AT el hB_St-BSA (condicions homòlogues). Aquest mateixos antisèrums també van donar una detectabilitat bona quan l'AT era hA_St-BSA, però, tal i com es mostra a la **Taula 4.6**, el pendent va donar valors massa alts, al voltant de -2. Tot i així, es van considerar assaigs útils per seguir investigant. Respecte als As145,149, la detectabilitat va ser pitjor que les anteriors, però

amb un agreujant addicional com va ser el soroll de fons alt que van donar ($A_{min}=0.36$). Una explicació a aquest soroll de fons tan alt, podria ser que el mètode de conjugació emprat per preparar l'immunogen i a l'antigen de tapissat va ser el mateix (vegeu apartat 3.5). Per tant, possibles subproductes de conjugació a l'HCH podrien haver creat anticossos que després reconeixien el mateixos subproductes al conjugat de BSA.



Gràfica 4.9 Assaigs competitiu obtinguts a partir de les combinacions AT-As. As147 (■), As148 (▲), As145 (●) i As149 (▼).

Taula 4.6 Característiques dels ELISAs preliminars obtinguts per a la detecció de St

	As	Comp.	A _{max}	A _{min}	Pendent	IC ₅₀ µg/L	R ²
hA_St-HCH	145	hA_St-BSA	1.06	0.36	-0.84	6.12	0.994
		hA_St-HRP	0.62	0.08	-0.59	1.83	0.98
	149	hA_St-BSA	0.98	0.36	-0.69	7.12	0.98
		hA_St-HRP	0.72	0.03	-0.64	1.96	0.97
hB_St-HCH	147	hA_St-BSA	1.04	0.03	-2.38	2.30	0.98
		hB_St-BSA	0.88	0.03	-1.09	0.41	0.992
	148	hA_St-BSA	0.65	0.04	-2.73	7.15	0.96
		hB_St-BSA	1.11	0.02	-1.01	0.92	0.96

Donat que el nostre propòsit era aconseguir un assaig per a la determinació simultània de St i 16βOH-St (anticossos generats a partir de hA_St-HCH) i un altre per St i 3'OH-St (anticossos generats a partir d'hB_St-HCH), es va decidir escollir per la seva posterior optimització una combinació As/competidor per cadascun dels immunògens inoculats: la **As147/hB_St-BSA** i la **As145/hA_St-HRP**. Aquestes dues combinacions són homòlogues, és a dir, l'analit competeix amb el conjugat del mateix haptè pel qual s'han obtingut els anticossos corresponents. També es va escollir la combinació **As147/hA_St-BSA**, com a combinació heteròloga, ja que d'acord amb els precedents aquests tipus de

combinacions solen donar lloc a assaigs menys específics, per tant, amb un patró més ampli de reconeixement de productes estructuralment relacionats.

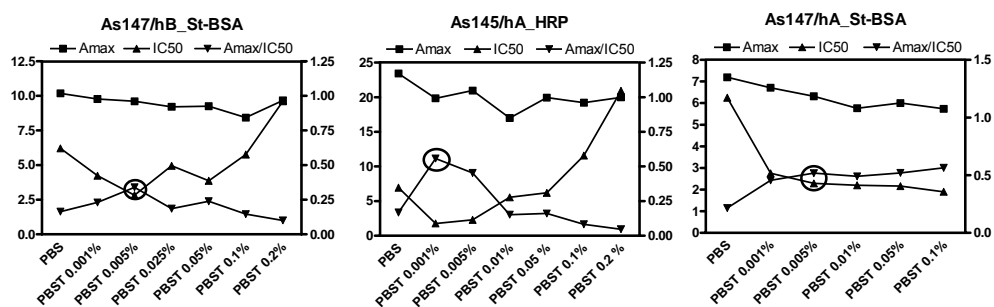
4.2.3 Optimització i avaluació de l'ELISAs per St

4.2.3.1 Efecte del Tween 20.

El primer paràmetre que es va estudiar, va ser l'efecte de la concentració de Tween 20 a l'assaig **As147/hB_St-BSA**. L'efecte d'aquest detergent a l'assaig va ser d'una millora de la detectabilitat a mesura que s'anava disminuint la concentració de Tween 20 al medi. Tal i com es pot observar a la **Gràfica 4.10**, la concentració òptima de treball va ser de 0.005% de Tween 20. Aquest tipus de comportament s'ajusta al d'altres ELISAs, ja desenvolupats, per compostos hidrofòbics^{164, 170, 171}, en els quals millorava la detectabilitat de l'assaig en tenir una concentració baixa de Tween 20 o inclòs en absència d'aquesta. El logP calculat per l'estanozolol és 5.53, un valor que fa que se'l pugui arribar a considerar lipòfil. A baixes concentracions de Tween 20 millora les interaccions de l'anticòs pel analit, però al contrari que altres compostos lipofílics, en absència absoluta de Tween 20 l'assaig empitjora. Una possible explicació pot ser que sigui necessari una concentració mínima de Tween 20 per ajudar a la solubilització de l'estanozolol en medis aquosos.

Aquest mateix comportament es va observar a l'assaig **As145/hA_St-HRP**. Com es pot veure a la **Gràfica 4.10**, la concentració òptima va ser de 0.001% de Tween 20. Igualment, l'assaig empitjora en absència de Tween.

Respecte a l'altra assaig indirecte **As147/hA_St-BSA**, es va observar un comportament diferent. Segons es pot veure a la **Gràfica 4.10**, l'assaig no es va veure afectat per la variació de la concentració de Tween 20, tot i que en absència d'aquest, la detectabilitat empitjorava significativament.

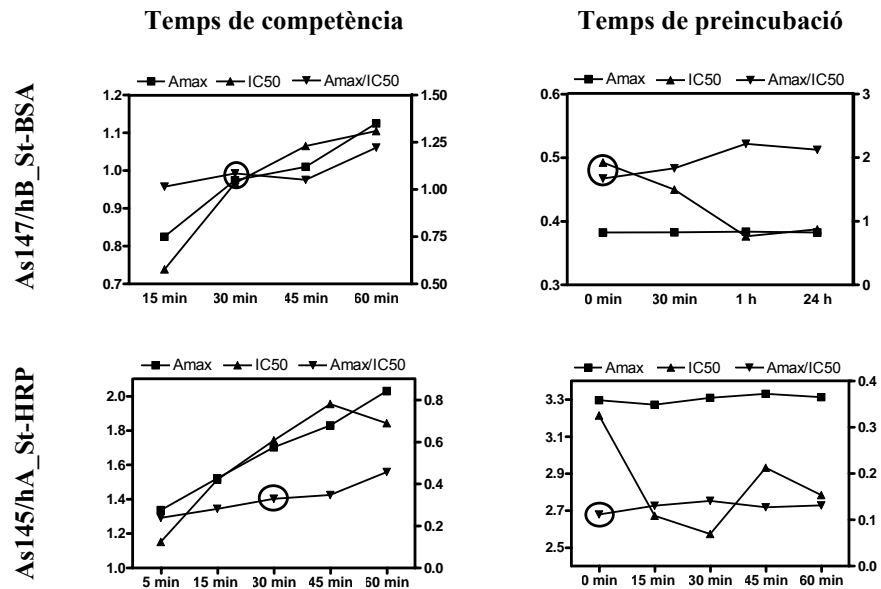


Gràfica 4.10 Efecte de la concentració de Tween 20 en el tampó de competència dels assaigs **As147/hB_St-BSA**, **As145/hA_St-BSA** i **As147/hB_St-BSA**. Els valors de Amax són U.A. (eix de la dreta, junt amb Amax/IC₅₀) i els de IC₅₀ en nM (eix de la esquerra).

4.2.3.2 Efecte del temps de preincubació i el temps de competència

Segons es pot veure a la **Gràfica 4.11**, hi ha una certa millora, en termes de detectabilitat, quan es posa en contacte l'analít i l'anticòs en l'etapa prèvia de preincubació a l'assaig **As147/hB_St-BSA**. Malgrat això la petita millora no compensava la introducció d'una etapa més, donat que s'allargaria massa el temps de l'assaig. Per altra banda, a l'assaig **As145/hA_St-HRP** no es va observar cap millora quan es van posar en contacte l'anticòs i l'analít durant un cert temps abans de la competència.

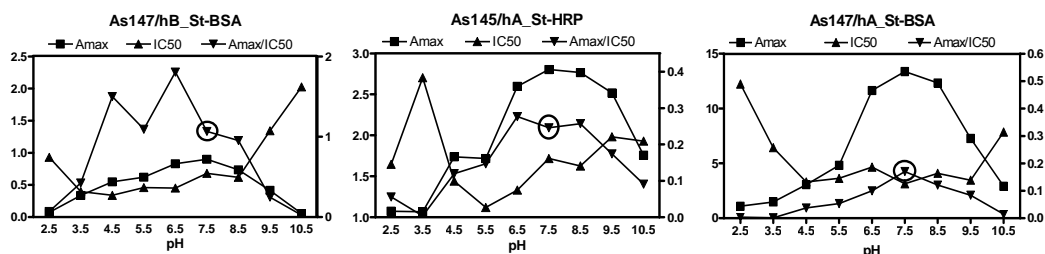
Respecte al temps de competència es va poder observar un augment del senyal màxim a mesura que augmentava el temps de competència, però paral·lelament, la IC₅₀ també augmentava (vegeu **Gràfica 4.11** a l'assaig **As147/hB_St-BSA**). Quan es va mirar la relació Amax/IC₅₀, es va poder veure que romaní constant a diferents temps de competència. Per aquest motiu, es va decidir deixar en 30 min l'etapa de competència. Respecte a l'assaig **As145/hA_St-HRP**, es va observar un efecte molt similar al descrit anteriorment, per tant també es va establir l'etapa de competència en 30 min.



Gràfica 4.11 Efecte dels temps de reacció per a l'assaig **As147/hB_St-BSA** i **As145/hA_St-HRP**. Es va avaluar el temps de preincubació i el temps de competència. L'eix de les IC_{50} es van mesurar en nM (eix de l'esquerra) i les d'Amax en U.A (eix de la dreta, junt amb Amax/ IC_{50})

4.2.3.3 Efecte del pH

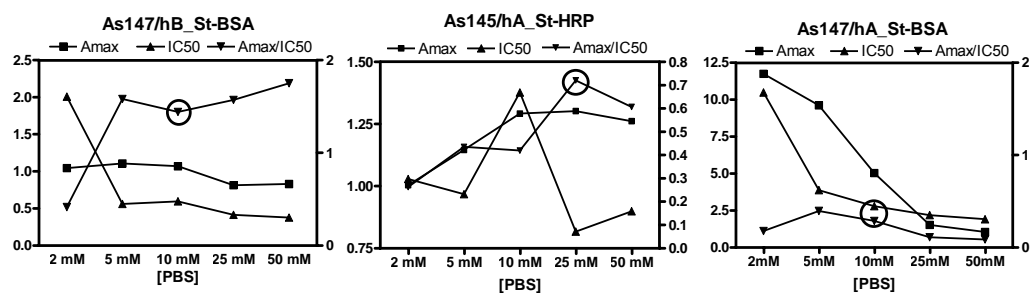
En avaluar l'efecte del pH a l'assaig **As147/hB_St-BSA** (vegeu **Gràfica 4.12**). Es va poder observar una certa millora en la relació Amax/ IC_{50} a pH=6.5, però, es va optar per seguir treballant a pH 7.5 ja que no es va considerar prou significativa. L'efecte sobre l'assaig **As145/hA_St-HRP** mostren que en l'interval de pH entre 6.5-8.5 els valors de Amax i IC_{50} eren molt similars (vegeu **Gràfica 4.12**). A l'igual que abans també es va decidir treballar a pH 7.5, tot i que a l'igual que amb l'assaig indirecte la detectabilitat és lleugerament millor a pH 6.5. Respecte a l'assaig **As147/hA_St-BSA**, es va observar, com en l'anterior cas, uns valors molt similars entre pH 6.5-8.5, però, en aquest cas era lleugerament millor a pH 7.5.



Gràfica 4.12 Efecte del pH a l'etapa de competència pels assaigs As147/hB_St-BSA i As145/hA_St-BSA. L'eix de les IC₅₀ es van mesurar en nM (esquerra) i les d'Amax en U.A. (dreta, junt amb Amax/IC₅₀).

4.2.3.4 Efecte de la conductivitat

L'efecte de la força iònica es va estudiar mitjançant la utilització de tampons de PBS a diferents concentracions (de 50mM a 2mM, que donaven una conductivitat específica de 55.9 a 2.23 mS/cm). Es va ajustar el pH a 7.5 i es va afegir la concentració corresponent de Tween 20 per cada assaig, i un temps de competència de 30 min. Segons es pot extreure de la Gràfica 4.13, l'assaig As147/hB_St-BSA és estable a concentracions altes de PBS en termes de Amax/IC₅₀, però, s'ha de tenir en compte que baixa l'Amax. En canvi, es va observar que a baixes concentracions de PBS (2mM), l'assaig empitjora considerablement.



Gràfica 4.13 Efecte de la conductivitat al medi de competència pels assaigs As147/hB_St-BSA i As145/hA_St-BSA. L'eix de les IC₅₀ es van mesurar en nM i les de Amax en U.A.

Aquest fet es pot explicar tenint en compte que les interaccions que s'estableixen entre analit-anticòs-AT siguin de naturalesa electrostàtica, entre d'altres. El fet que no hi hagi un medi salí adequat, podria fer que aquestes interaccions es vegin afectades. A la vista

dels resultats es va decidir treballar a una concentració de PBS de 10mM. En aquest sentit, a l'assaig **As145/hA_St-HRP** es va observar un comportament diferent, ja que l'Amax es veia afectada per la disminució de la força iònica, però, en aquest cas, la detectabilitat era superior a una concentració de PBS de 25mM. Respecte l'assaig **As147/hA_St-BSA**, es va observar el comportament contrari. Es va observar un augment de l'Amax a mesura que disminuïa la força iònica, amb una pèrdua de detectabilitat. En aquest cas, a concentracions de PBS superiors a 10 mM, la relació Amax/IC₅₀ roman constant, però amb una davallada de l'Amax. Per tant, es va escollir una concentració de PBS de 10 mM.

4.2.4 Especificitat dels assaigs per St.

En aquest cas es van preparar corbes de calibratge, amb altres compostos esteroidals relacionats (vegeu **apartat 4.1.4**). A més, en aquest assaig, per la seva rellevància, es va mesurar la reactivitat creuada dels metabòlits de l'estanozolol, 16βOH-St (16b-hidroxi-estanozolol) i 3'OH-St (3'-hidroxi-estanozolol), a més del precursor de la síntesi de hA_St, el NorSt (Norestanozolol). A la **Taula 4.7** estan recollits els valors en % de reactivitat creuada amb el St.

Taula 4.7 Especificitat dels ELISAs optimitzats.

Immunogen	hA_St-HCH		hB_St-HCH	
	As145/ hA_St-HRP	As147/ hB_St-BSA	As147/ hA_St-BSA	
Estanozolol	100	100	100	
16b-OH-estanozolol	42	2	17	
3'OH-estanozolol	1	1	51	
Norestanozolol	166	10	45	
Testosterona	0.6	<0.05	1	
Boldenona	<0.08	<0.05	<0.2	
Metilboldenona	2	11	21	
Dihidrotestosterona	<0.08	<0.05	2	
Colesterol	<0.08	<0.05	<0.2	
Estrona	<0.08	<0.05	<0.2	
Progesterona	<0.08	6	3	
Pregnenolona	<0.08	<0.05	<0.2	
Dexametasona	<0.08	<0.05	<0.2	

4.2.4.1 Especificitat de l'assaig As145/hA_St-HRP

A la **Taula 4.7** es pot observar el perfil de reactivitat creuada de l'assaig directe per St. El fet que l'assaig **As145/hA_St-BSA** utilitzi un anticòs que prové de la immunització amb hA_St, determina que es reconeguin altres compostos (vegeu **Figura 4.4**). Aquest haptè deixa exposat al sistema immune la zona de l'anell de pirazole, per tant tots aquells compostos que conservin aquesta zona, s'haurien de reconèixer. Així, doncs, tal com havíem previst durant el disseny de l'haptè, són reconeguts significativament el St, i un dels seus metabòlits, el 16 β OH-St. Per altra banda, el fet que el 3'-OH-St, tingui un hidroxil a l'anell de pirazole, fa que disminueixi significativament el reconeixement. S'ha de remarcar l'elevada reactivitat creuada del NorSt(166%) probablement, deguda a que el precursor sintètic de l'hA_St és el NorSt. Per tant, els anticòsos produïts tindran més afinitat pel NorSt que pel St, ja que aquest últim té el grup Me a 17 α . En el cas que el NorSt fos utilitzat de forma fraudulenta tant el camp agroalimentari com en el dels esports, es podria fer servir aquest assaig per aquest propòsit.

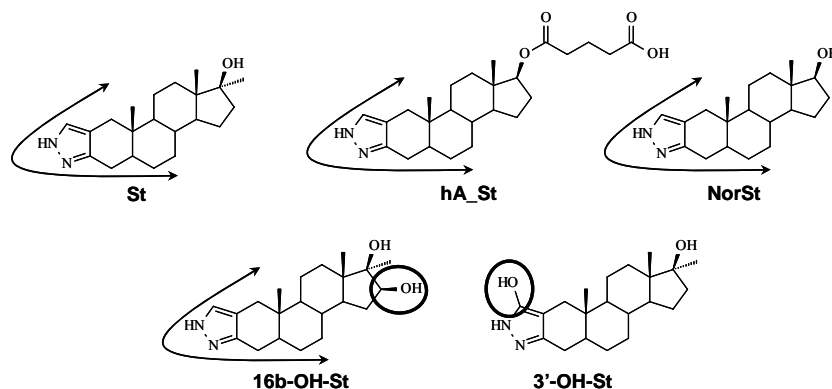


Figura 4.4 Estructures químiques de l'haptè d'immunització (hA_St) i dels compostos que mostren una certa reactivitat creuada a l'assaig **As145/hA_St-HRP**

Aquest elevat reconeixement del NorSt en comparació amb el St, ens va sorprendre una mica donat que confiàvem que l'anell D de l'esteroid estigués sota l'efecte apantallant de la HCH i que per tant les modificacions que es produïssin en aquest anell no afectessin el reconeixement. Per tant, aquests resultats junt amb la davallada del reconeixement del 16 β OH-St (100% de St a 42% de 16 β OH-St), apunten a una contribució significativa d'aquesta part de la molècula en la interacció amb l'anticòs. La raó l'hem atribuït a la

llargària del braç espaiador. Possiblement un braç espaiador més curt hauria afavorit l'efecte estèric de la proteïna i per tant fer que les diferències en el reconeixement del St, NorSt i el 16 β OH-St fossin més petites.

4.2.4.2 Especificitat de l'assaig As147/hB_St-BSA

L'assaig **As147/hB_St-BSA** va mostrar una alta especificitat per l'estanozolol (vegeu **Taula 4.7**). Mentre que els metabòlits van resultar tenir una reactivitat creuada molt baixa. El fet que el 16 β OH-St no es reconegués per aquest assaig, era d'esperar, ja que els antisèrums es van produir amb l'hB_St, que deixava exposat al sistema immune els anells D, C i B (vegeu **Figura 4.5**). Però, el 3'OH-St, aquesta àrea és comuna amb el St i hB_St, per tant, era d'esperar una reactivitat creuada major de la que es va observar. Una possible explicació d'aquest comportament, podria induir a pensar que l'alcohol a la posició 3' afectés molt les propietats físico-químiques de l'anell de pirazole el que faria que els As no reconguessin aquest analit. Per tant hem de pensar de nou que l'excessiva longitud del braç espaiador ha fet que els anticossos també reconguessin l'anell de pirazole i l'anell A. En els estudis de modelatge molecular (vegeu **apartat 2.1.2**) ja s'havia posat en evidència el canvi de valor de la càrrega puntual a C3' pel fet de que hi hagués el grup hidroxil a aquesta posició. Contràriament la davallada del reconeixement del NorSt ha estat proporcionalment inferior a la del 3'OH-St, tot i que la modificació estructural (absència del grup Me a 17 α) es troba a la zona a on *a priori* la resposta hauria d'haver estat més afectada. També, en aquest cas, els estudis de modelatge indiquen que tot i que hi ha un canvi en la magnitud de la càrrega a C17 pel fet de no tenir el grup metil, aquest és inferior al canvi ocasionat per la presència del grup hidroxil a C3'. Sorprenentment, també es va observar una certa reactivitat creuada amb la MB que es va atribuir a que conserva el mateix determinant antigènic que l'hB_St, tot i que a la resta de l'estructura hi han canvis significatius que no justifiquen que aquest esteroide sigui reconegut.

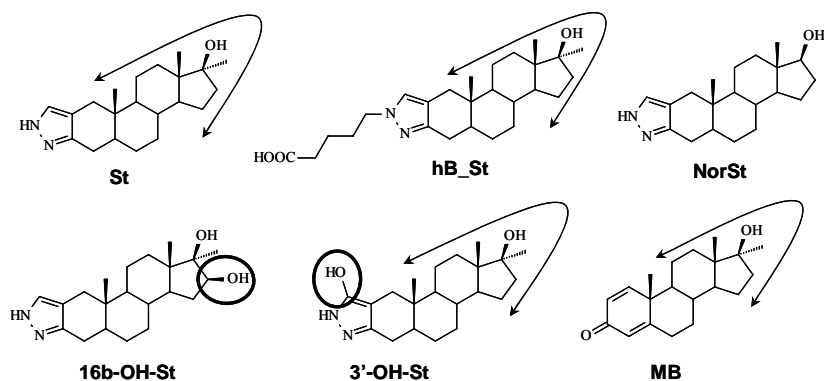


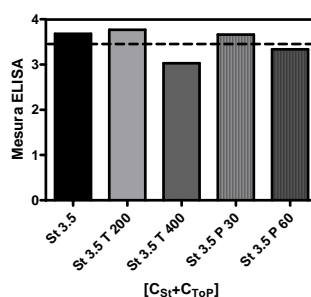
Figura 4.5 Estructures químiques de l'haptè d'immunització (hB_St) i dels compostos que mostren una certa reactivitat creuada a l'assaig **As147/hB_St-BSA**

4.2.4.3 Especificitat de l'assaig **As147/hA_St-BSA**

Tal i com s'havia comentat anteriorment, i en base a precedents del nostre propi grup i d'altres^{150,152,155}, el fet d'utilitzar una combinació heteròloga, l'assaig podia esdevenir menys selectiu, és a dir, podria reconèixer compostos estructuralment relacionats. Aquest fet s'afirma amb l'assaig **As147/hA_St-BSA**, ja que tal com es pot observar a la **Taula 4.7**, aquesta combinació reconeixia el 3'-OH-St. Però, a més, també reconeixia el 16 β OH-St i el NorSt. El fet que s'utilitzi una combinació en la qual l'afinitat de l'antisèrum per l'AT és menor que en el cas d'una combinació homòloga, fa que es reconeguin més compostos relacionats estructuralment. Així, el 16 β OH-St, es reconeix amb una reactivitat creuada moderada, tot i que el grup hidroxil es troba en aquest cas a la zona més exposada al sistema immunitari per part de l'haptè d'immunització hB_St. El mateix passa amb el reconeixement del NorSt, on la pèrdua del grup metil a 17 α , sembla no tenir gaire efecte. És de destacar també, el reconeixement de la MB que inclòs va millorar respecte l'assaig **As147/hB_St-BSA**. Pel cas del 3'-OH-St, el reconeixement era d'esperar d'acord amb l'estructura de l'haptè d'immunització. No obstant és remarcable l'augment en el reconeixement respecte de la combinació homòloga.

4.2.4.4 Efecte d'hormones endògenes sobre l'assaig As147/hB_St-BSA

Tot i que la reactivitat creuada mostrada per l'assaig As147/hB_St-BSA sobre les hormones endògenes (com ara la progesterona, testosterona o estrona) era molt baixa, el fet que aquestes hormones es poden trobar a l'organisme en grans quantitats podria interferir amb l'assaig, i per tant donar lloc a falsos positius. Està descrit que els nivells de testosterona en vaques en sèrum poden arribar a 0.1 mg/L, mentre que els nivells de progesterona en sèrum poden estar, depenent de l'edat i de l'estat gestatiu de les vaques, entre 8.5ng/mL a 1.4mg/mL¹⁷². Per tant, es va avaluar l'efecte sobre una mostra dopada amb St, la presència d'hormones endògenes, com la testosterona i la progesterona, a elevades concentracions. Es van escollir dues concentracions de T, 200 i 400 nM (que corresponen a 57.8 µg/L i 115.6 µg/L), i dues concentracions de P, 30 i 60 nM (9.42 µg/L i 18.84 µg/L, respectivament), sobre una solució de 3.5 nM (1.14 µg/L) de St. Tal i com es pot observar a la **Gràfica 4.14**, la presència de T i P a aquest nivells de concentració no afecta la quantificació de l'estanozolol.

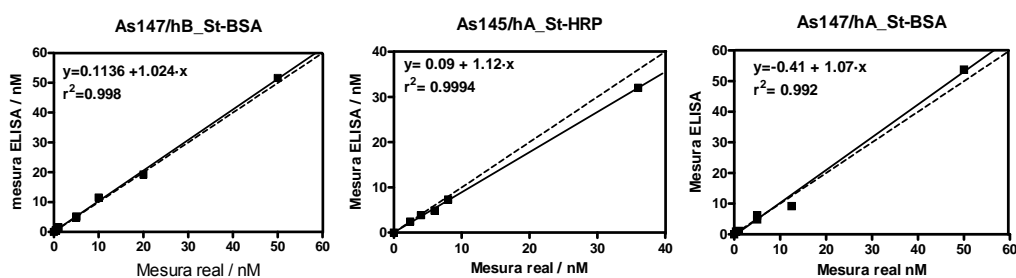


Gràfica 4.14 Efecte sobre la mesura del St amb concentracions elevades d'hormones endògenes (T i P).

4.2.5 Estudis d'exactitud per la determinació de St

Els estudis d'exactitud es van realitzar de la mateixa manera que a l'apartat **4.1.5**, preparant en cada cas les mostres cegues amb el tampó optimitzat de l'assaig. Segons les dades que es poden extreure de la **Gràfica 4.15**, la correlació entre la mesura de les mostres cegues i els valors reals, va ser molt bona pels tres assaigs avaluats.

Només per l'assaig **As145/hA_St-HRP**, es va observar una lleugera sobreestimació de la mesura (pendent 1.12) que no es va considerar significativa.



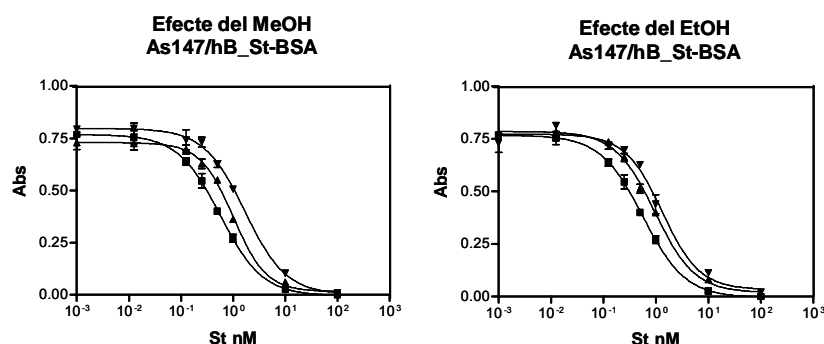
Gràfica 4.15 Estudis d'exactitud pels ELISAs **As147/hB_St-BSA** (N=10), **As145/hA_St-HRP** (N=6) i **As147/hA_St-BSA** (N=7) emprant mostres cegues. Valors representats en nM

4.2.6 Efecte dels dissolvents orgànics a l'assaig

L'addició de dissolvents orgànics a la corba de calibratge pot augmentar la detectabilitat de l'assaig. Per altra banda, és important conèixer l'efecte que ocasionen, pel cas que s'hagin d'analitzar extractes que s'hagin fet amb dissolvents orgànics. Per compostos hidrofòbics, com és el cas del stanozolol, la presència de dissolvents orgànics augmenta la solubilitat de l'analit, donada la baixa solubilitat d'aquest tipus de compostos en medis aquosos²⁰⁹. Per altra banda, molts dels extractes que es solen analitzar, provenen d'extraccions amb dissolvents orgànics, ja sigui provinents de mostres eluides de SPE o d'extractes directes de les mostres.

Així doncs, es va procedir a fer aquests estudis preparant corbes en tampó al qual se li havia afegir dissolvent orgànic a diferents concentracions. Com es pot observar a la **Gràfica 4.16**, l'assaig empitjora a la més mínima quantitat de dissolvent orgànic, tan en metanol com en etanol. El mateix comportament es va observar en emprar ACN, alcohol isopropílic, DMF, DMSO i dioxà (dades no mostrades). Sembla ser que l'addició de dissolvents orgànics no tan sols no millora l'assaig, sinó que l'empitjora. Aquest efecte s'ha de tenir en compte per posteriors anàlisis de mostres que portin una quantitat de dissolvent orgànic. En el cas que sigui necessari un dissolvent orgànic, els més adients serien el MeOH o l'EtOH a la concentració més baixa possible. Tal i com es pot observar a la **Gràfica 4.16** petites proporcions d'aquests dissolvents, no baixen el senyal, però sí

que hi ha un desplaçament de les corbes a la dreta, el que implica una pèrdua de detectabilitat. Així, a l'assaig **As147/hB_St-BSA** amb un 10% d'EtOH el valor de la IC50 varia des de 0.56 nM, en absència d'etanol, fins a 1.32 nM. Aquest mateix efecte es va observar a la resta d'assaigs optimitzats **As147/hA_St-BSA** i **As145/hA_St-HRP** (dades no mostrades).



Gràfica 4.16 Efecte dels dissolvents orgànics a l'assaig **As147/hB_St-BSA**. Es mostren la corba de referència en PBST (■), 4% (▲) i 10% (▼) de dissolvent orgànic.

Per tal d'assegurar el reconeixement dels metabòlits d'interès en aquestes condicions es van tornar a repetir els experiments de reactivitat creuada en presència d'un determinat % de dissolvent orgànic. Es van realitzar els assaigs amb un 7% d'EtOH, perquè, tal com es veurà més endavant aquesta proporció és la que es faria servir en cas d'introduir una etapa de tractament de mostra basada en l'extracció mitjançant immunosorbents. Segons les dades que es van obtenir (vegeu **Taula 4.8**), el perfil de reactivitat creuada és diferent en presència d'un 7% d'EtOH (vegeu **Taula 4.7**), observant-se que l'assaig **As147/hA_St-BSA** reconeix millor el 3'OH-St.

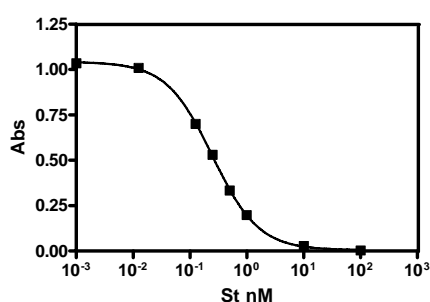
Taula 4.8 Reactivitat creuada dels assaig desenvolupats per St amb un 7% d'EtOH.

Compost	As145/	As147/	As147/
	hA St-HRP	hB St-BSA	hA St-BSA
Estanozolol	100	100	100
16b-OH-estanozolol	53	2	26
3'OH-estanozolol	2	2	92

4.2.7 Condicions finals dels ELISAs per St

4.2.7.1 ELISA As147/hB_St-BSA

El protocol final de l'assaig **As147/hB_St-BSA** per a la detecció de **St** va consistir en un ELISA de format indirecte en la que no hi ha una etapa de preincubació, l'etapa de competència es va establir en 30min, en PBS a pH=7.5, amb una concentració de Tween 20 de 0.005% i a una conductivitat de 11.2 mS/cm (10 mM de PBS). Després se segueix amb les etapes de revelat del senyal, que corresponen a una etapa d'incubació amb anti-IgG-HRP (30 min) i una de substrat (30 min). Sota aquestes condicions es va obtenir una corba de calibratge (vegeu **Gràfica 4.17**) amb una IC_{50} de $0.16 \pm 0.03 \mu\text{g/L}$ (N=9) i amb un LOD de $0.022 \pm 0.01 \mu\text{g/L}$ (N=9, corresponent al 90% de la inhibició de l'assaig). A la **Taula 4.9** es mostren els paràmetres de l'assaig. Tal i com es desprèn dels valors de la desviació estàndard presenta una bona reproduïbilitat de l'assaig. Així com, dels estudis d'exactitud realitzats es desprèn la bona correlació que s'establia entre les mostres dopades i les mesures amb l'ELISA (pendent 1.02, r^2 de 0.998). Respecte de la seva especificitat, per contra del que s'havia previst, es va obtenir un assaig específic pel St. Però, s'ha de destacar l'efecte que produeix els dissolvents orgànics sobre l'assaig, empitjorant-lo a partir de baixes concentracions d'EtOH o de MeOH.



Gràfica 4.17 Corba de calibratge de l'ELISA optimitzat **As147/hB_St-BSA** pel St.

Taula 4.9 Característiques per l'ELISA As147/hB_St-BSA optimitzat.

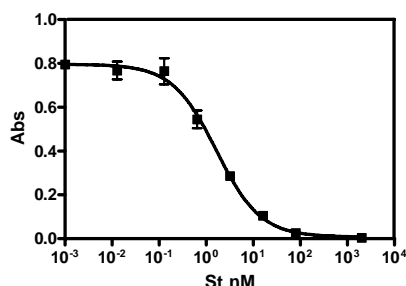
As147/hB_St-BSA*^{1,2}	
Amax	1.04±0.03
Amin	0.02±0.01
IC₅₀ µg/L	0.16±0.06
Pendent	-1.07±0.08
Interval de treball, µg/L	0.046±0.016 a 0.603±0.049
LOD, µg/L	0.022±0.01
r²	0.9991±0.0008

*¹ Les dades corresponen a la mitja i la desviació estàndard dels paràmetres extrets de l'equació logística emprada per ajustar la corba (N=9, assaigs realitzats en diferents plaques i en dies diferents)

*² El LOD correspon a la corba el valor corresponent a IC₉₀, mentre que l'interval de treball correspon a IC₈₀-IC₂₀.

4.2.7.2 ELISA As145/hA_St-HRP

El protocol final de l'assaig As145/hA_St-HRP per la detecció de St va consistir en una etapa de competència de 30 min, on el tampó de l'etapa de competència tenia aquestes característiques: concentració de Tween 20 de 0.001%, a una concentració de PBS de 25mM i a un pH=7.5. A continuació s'afegeix el substrat (30 min) i es procedeix a llegir el senyal colorimètric. Sota aquestes condicions es va obtenir una corba de calibratge com la que es mostra a la **Gràfica 4.18**. De l'ajust amb l'equació logística (vegeu **Taula 4.10**) s'extreuen que l'assaig presenta una IC₅₀ de 0.56±0.04 µg/L (N=9), amb un LOD de 0.036±0.009 µg/L (N=9). De la mateixa manera es va observar una lleugera sobreestimació entre mostra dopada i mostra mesurada (pendent 1.12 amb un r² de 0.9994). Respecte els estudis d'especificitat, es va observar reactivitat creuada amb els compostos que contenen el mateix epítip que el hA_St, com ara el 16βOH-St i el NorSt. L'assaig, com en el cas anterior, és molt sensible a la presència de dissolvents orgànics al tampó de competència, observant-se un empitjorament respecte la seva detectabilitat. A més, en presència d'un 10% d'EtOH a l'etapa de competència, variava el perfil de reactivitat creuada respecte els metabòlits més importants del St, el 16bOH-St i el 3'OH-St, que passaven d'un 42 i 1%, a un 53 i 2% de reactivitat creuada, respectivament.



Gràfica 4.18 Corba de calibratge de l'ELISA optimitzat As145/hA_St-BSA pel St.

Taula 4.10 Característiques per l'ELISA As145/hA_St-BSA optimitzat.

As145/hA_St-BSA* ^{1,2}	
Amax	0.80±0.04
Amin	0.06±0.02
IC ₅₀ µg/L	0.56±0.04
Pendent	-0.90±0.02
Interval de treball, µg/L	0.131±0.014 a 3.150±0.059
LOD, µg/L	0.036±0.009
r ²	0.996±0.003

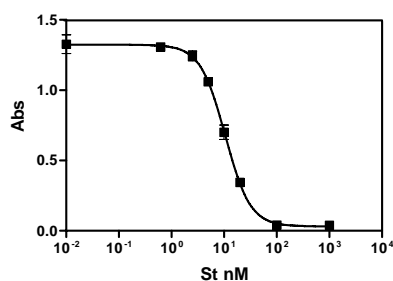
*¹ Les dades corresponen a la mitja i la desviació estàndard dels paràmetres extrets de l'equació logística emprada per ajustar la corba (N=9, assaigs realitzats en diferents plaques i dies diferents)

*² El LOD correspon a la corba el valor corresponent a IC₉₀, mentre que l'interval de treball correspon a IC₈₀-IC₂₀.

4.2.7.3 ELISA As147/hA_St-BSA

En aquest assaig només es va optimitzar el paràmetre més rellevant a l'hora de millorar l'assaig, que en aquest cas va ser la concentració de Tween 20. Per tant, les condicions per a la detecció d'estanozolol van ser: temps de competència de 30 min, amb un tampó de PBS 10mM a pH7.5 i amb una concentració de Tween 20 de 0.005%. La corba de calibratge que es va obtenir per aquesta combinació amb aquestes condicions es pot veure a la **Gràfica 4.19**. Es va aconseguir una IC₅₀ de 0.72±0.13 µg/L (N=9) i un LOD de 0.193±0.029 µg/L (N=9). Les característiques d'aquest assaig estan recollides a la **Taula 4.11**. Així doncs, es va obtenir una bona correlació entre mostres dopades i mostres mesurades realitzat al estudis d'exactitud (pendent de 1.07 i r² de 0.992). La reactivitat creuada observada per aquest assaig va ser més ampla que els anteriors obtenint-se valors

per 16βOH-St, 3'OH-St, NorSt i MB de 17, 51, 45 i 21% de RC, respectivament. Com s'ha mencionat anteriorment, es va observar un empitjorament, en termes de detectabilitat, en presència de dissolvents orgànics, així com una variació en el perfil d'especificitat de l'assaig, on es va observar un augment per part del 16βOH-St i 3'OH-St fins a valor de 26 i 92 %, respectivament.



Gràfica 4.19 Corba de calibratge de l'assaig optimitzat As147/hA_St-BSA pel St.

Taula 4.11 Característiques per l'ELISA As147/hA St-BSA optimitzat.

As147/hA_St-BSA^{*1,2}	
Amax	1.10±0.05
Amin	0.04±0.01
IC₅₀ µg/L	0.72±0.13
Pendent	-2.09±0.08
Interval de treball, µg/L	0.331±0.049 a 1.36±0.239
LOD, µg/L	0.193±0.029
r²	0.998±0.002

*¹ Les dades corresponen a la mitja i la desviació estàndard dels paràmetres extrets de l'equació logística emprada per ajustar la corba (N=9 assaigs realitzats en diferents plaques i dies diferents).

*² El LOD correspon a la corba el valor corresponent a IC₉₀, mentre que l'interval de treball correspon a IC₈₀-IC₂₀.

4.3 Desenvolupament d'immunoassaigs per B i MB

En el desenvolupament de ELISA per la determinació de boldenona i metilboldenona es van utilitzar els antisèrums **As138** i **As153** (obtinguts per immunització amb hA_B-HCH, i que en principi haurien de reconèixer tant la B com la MB) i els antisèrums **As142** i **As143** (obtinguts per immunització amb hB_MB-HCH i que *a priori* haurien de reconèixer fonamentalment la MB). Com a competidors es van utilitzar els haptens hA_B, hB_MB, hA_T i hB_B, que units a BSA, com a antigens de tapissat per al desenvolupament del format indirecte, i que units a HRP, pel format directe (vegeu **Figura 4.6**).

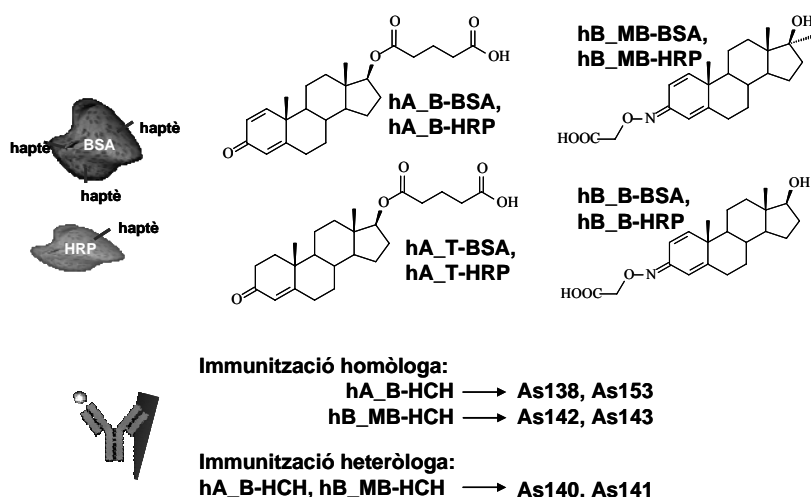
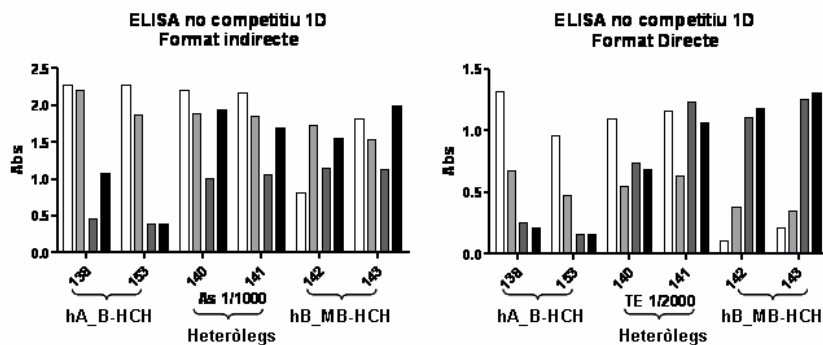


Figura 4.6 Immunoreactius per al desenvolupament d'ELISAs per B i MB

Donat que l'epítot exposat per l'hB_MB (agrupació hidroximetil a C17 de l'anell D) és comú a d'altres esteroides anabolitzants important com ara la MT i el St, en aquest cas ens varem proposar fer un estudi d'immunitzacions heteròlogues amb l'objectiu d'incrementar l'especificitat d'aquest assaig per la MB, en front d'altres substàncies amb el mateix epítot. Amb aquest propòsit, es van obtenir els antisèrums **As140** i **As141**, i com haptens de competició es van emprar igualment els descrits anteriorment (vegeu **Figura 4.6**).

4.3.1 Estudi d'afinitat dels As138,140-143,153 amb els competidors a BSA i HRP

Així doncs, es van avaluar l'afinitat dels antisèrums obtinguts, tant en la immunització homòloga (per B, **As138** i **As153**; per MB, **As142** i **As143**) com en l'heteròloga (**As140** i **As141**), pels haptens de competició hA_B, hB_MB, hA_T i hB_B units a BSA, (format indirecte), i units a HRP (format directe). Els assaig d'afinitat es van realitzar mitjançant ELISAs no competitiu 1D.



Gràfica 4.20 ELISA no competitiu 1D en format indirecte (esquerra) i en format directe (dreta). Els antisèrums es van assajar amb el competidors: hA_B (□), hA_T (■), hB_B (■) i hB_MB (■).

Segons es pot observar a la **Gràfica 4.20**, en ambdós formats es va observar un perfil de reconeixement molt similar. En els competidors units a l'haptè hA_B va ser clarament reconeguts pels seus antisèrums homòlegs (**As136** i **As153**), així com pels procedents de la immunització heteròloga (**As140** i **As141**). De la mateixa manera, el competidor unit hB_MB va ser reconegut pels seus antisèrums homòlegs (**As142** i **As143**) i pels d'immunització heteròloga (**As140** i **As141**). Respecte als competidors units a hA_T, es va observar un comportament diferencial, ja que en el format indirecte va ser força reconegut per tots els antisèrums, mentre que en el format directe, el hA_T-HRP va donar una baixa resposta. Per altra banda, els competidors units a hB_B, van donar una resposta similar a l'hB_MB, es a dir, van ser reconeguts pels **As140-143**, i poc pels antisèrums obtinguts a partir de l'hA_B-HCH, **As138** i **As153**.

Seguidament, mitjançant els ELISAs no competitiu 2D, es van trobar les concentracions d'immunoreactius que es van emprar per la realització dels ELISAs competitiu, tal com

explica a l'apartat 9.2.8.1.3. En aquest cas es va avaluar la capacitat de reconèixer tant la B com la MB.

4.3.2 Desenvolupament d'assaigs pel reconeixement simultani de B i MB (hA_B-HCH)

Tal i com s'havia comentat anteriorment, els antisèrums obtinguts a partir de la immunització de hA_B-HCH permetrien la determinació simultània de B i MB. Per tant, es va buscar la combinació més idònia per aquest propòsit. D'aquesta manera, es va avaluar l'afinitat dels antisèrums As138 i As153 pels competidors preparats, obtenint-se varies combinacions As/AT en les quals s'observà competència tant de B com de MB (vegeu **Taula 4.12**).

Taula 4.12 Combinacions dels ELISAs amb els antisèrums obtinguts a partir de la immunització de hA_B-HCH

Immunògen: hA_B-HCH			Boldenona			Metilboldenona		
Format	As	Comp.	Pendent	IC ₅₀ nM	RC %	Pendent	IC ₅₀ nM	RC %
Directe	138	hA_B* ¹	-0.57	10.28	100	-0.45	68.47	14
	153		-0.47	6.4	100	-0.47	41.91	14
Indirecte	138	hA_B* ²	-0.51	4.76	100	-0.40	328.7	1
		hA_T* ²	-0.53	13.78	100	-0.32	364.2	4
		hB_MB* ²	-1.78	26.1	100	-1.17	44.04	59
	153	hA_B* ²	-0.26	27.51	100	-0.50	1246	2
		hA_T* ²	-0.40	18.3	100	-0.47	70.48	26

*¹ Conjugat unit a HRP, *² Conjugat unit a BSA

Tal i com es pot veure a la **Taula 4.12**, es van obtenir uns assaigs que mostraven una especificitat per la B més gran del que s'havia previst inicialment. En el cas del format directe, en ambdós assaigs, es va obtenir una reactivitat creuada del 14%. Pel que fa als assaigs indirectes, les combinacions homòlogues, és a dir, As138 i As153 amb el competidor hA_B-BSA, són molt específics per la B i van ser les que van aconseguir la millor detectabilitat. Per contra, les combinacions heteròlogues van donar unes reactivitats creuades més grans, corroborant el que ja havíem comprovat respecte del comportament de les combinacions heteròlogues (vegeu **apartat 4.2.4**) Així, en el millor dels casos, es va arribar a un 59% de reactivitat creuada de la MB respecte a la B, encara que la detectabilitat va ser inferior a la de les combinacions homòlogues. Un fet a

destacar són les baixes pendents obtingudes en la majoria d'assaigs, entre -0.40 i -0.57 per la B, excepte en la combinació As138/hB_MB-BSA que es va obtenir una pendent de -1.78 per la B.

El fet que la majoria de combinacions fossin selectives per B, no era d'esperar, ja que segons els càlculs teòrics que es van realitzar (vegeu **apartat 2.1.1**), aquest haptè hauria d'haver produït As per a la detecció simultània de B i MB. Tal com s'ha demostrat prèviament, la introducció del braç espaiador a l'anell D no produïa canvis importants a la zona exposada al sistema immune, que és l'epítoc comú d'aquestes dues molècules. Això podria indicar que s'ha produït una fracció d'anticossos força important que també reconeixen l'anell D, tot i la proximitat amb la proteïna transportadora. Per tant, el grup metil a C17 de la MB destorbaria la interacció amb el centre de reconeixement de l'anticòs. Amb aquest resultat es torna a passar en evidència que el braç espaiador hauria d'haver estat més curt per tal d'emascarar el reconeixement de l'anell D, que és on es produeix la variabilitat d'aquests esteroides.

4.3.3 Desenvolupament d'assaigs per MB

4.3.3.1 Immunització homòloga (hB_MB-HCH)

Per desenvolupar un assaig específic per MB, es va utilitzar l'immunogen hB_MB-HCH, el qual produiria anticossos específics contra MB respecte de B. D'aquesta manera es van obtenir els antisèrums 142 i 143. A la **Taula 4.13**, es mostren les combinacions As/AT que van donar competència en funció de les IC₅₀ obtingudes en aquest cribatge. També es mostren els resultats obtinguts de la competència amb la B.

Taula 4.13 Combinacions dels ELISAs amb els antisèrums obtinguts a partir de la immunització de hB_MB-HCH

Immunògen: hB_MB-HCH			Boldenona			Metilboldenona		
Format	As	Comp.	Pendent	IC ₅₀ nM	RC %	Pendent	IC ₅₀ nM	RC %
Directe	142	hB_B ^{*1}	-1.38	4.28	10	-1.35	0.45	100
		hB_MB ^{*1}	-0.6	8.92	11	-0.7	0.86	100
	143	hB_B ^{*1}	-0.84	8.07	5	-1.01	0.41	100
		hB_MB ^{*1}	-0.77	127.4	2	-0.75	3.38	100
Indirecte	142	hA_T ^{*2}	-1.2	31.37	30	-0.92	9.37	100
		hB_B ^{*2}	-0.87	51.49	11	-0.71	5.44	100
		hB_MB ^{*2}	-0.65	23.32	26	-0.80	6.13	100
	143	hA_B ^{*2}	-1.22	143.4	19	-2.06	27.5	100
		hA_T ^{*2}	-0.92	151.3	3	-0.83	5.24	100
		hB_B ^{*2}	-0.89	45.02	12	-0.76	5.57	100
		hB_MB ^{*2}	-0.69	52.56	10	-0.94	5.05	100

*¹ Conjugat unit a HRP, *² Conjugat unit a BSA

Tal i com era de preveure, es van obtenir assaigs específics contra la MB. A més, amb un valor afegit que és la gran detectabilitat d'alguns assaigs, com són els de format directe amb As142 i hB_B-HRP o hB_MB-HRP, i amb As143 i hB_B-HRP. En el cas del format indirecte la detectabilitat no va ser tan bona, i es va poder apreciar que les combinacions heteròlogues amb els haptens hA_B i hA_T, el reconeixement de la B era millor que en les condicions homòlogues amb hB_MB.

4.3.3.2 Immunització heteròloga

L'estratègia que es va emprar per realitzar la immunització heteròloga va ser una immunització alternada dels immunògens hA_B-HCH i hB_MB-HCH. El propòsit d'aquest tipus d'immunització era el d'obtenir anticossos específics contra MB, donat que el primer immunogen conserva la mateixa àrea que la MB, els anells A i B, i a la vegada es tracta d'un àrea molt característica per la B i MB i que d'altres esteroides (per exemple, la MT), que podrien interferir, en el cas dels As generats contra hB_MB, no tenen. El segon immunogen conté l'àrea diferencial de la MB respecte de la B, que són els anells C i D. Amb aquesta estratègia es va voler enriquir la proporció d'anticossos específics per MB a través d'una immunització alternada d'aquests dos immunògens.

4.3.3.2.1 Efecte sobre l'especificitat de la immunització heteròloga

Un cop obtinguts els antisèrums As140 i As141, es va procedir al seu estudi. Les diferents combinacions obtingudes As/Ag tant en format indirecte com directe van mostrar competència tant amb la B com amb la MB. Per tal de realitzar l'estudi de quin era el grau d'especificitat aconseguit respecte els antisèrum obtinguts amb la immunització homòloga, es van escollir dues combinacions dels As heteròlegs i es van comparar amb la seva combinació homòloga corresponent. Així, per B, es va comparar les combinacions As138/hA_B-BSA amb la combinació As140/hA_B-BSA, totes dues combinacions homòlogues respecte l'antigen de tapissat, però, fent servir antisèrum homòleg, com en el primer cas, i antisèrum heteròleg en el segon cas. Pel cas de la MB, es van escollir les combinacions As142/hB_MB-BSA (As procedent d'immunització homòloga) i As141/hB_MB-BSA (As procedent d'immunització heteròloga). Amb aquestes combinacions es va estudiar l'especificitat de cada assaig (vegeu **Taula 4.14**).

Taula 4.14 Estudi de l'especificitat respecte la immunització realitzada.

Immunògen	hA_B-HCH	Heteròlegs		hB_MB-HCH
	As138/ hA_B-BSA	As140/ hA_B-BSA	As141/ hB_MB-BSA	As142/ hB_MB-BSA
Compost	% RC			
Boldenona	100	100	34	43
Metilboldenona	10	53	100	100
α-Boldenona	16	30	nrc	nrc
Metiltestosterona	2	11	121	121
Nortestosterona	0.8	2	7	4
Progesterona	9	31	nrc	0.7
Testosterona	11	20	14	29
Estanozolol	nrc	nrc	21	100
Pregmolona	nrc	nrc	0.3	0.5
AD	9	13	nrc	2
ADD	160	117	nrc	nrc
Colesterol	nrc	nrc	nrc	nrc
Estrona	nrc	nrc	nrc	nrc
DHT	6	4	6	16

nrc: No hi ha reactivitat creuada

Tal i com es pot observar a la **Taula 4.14**, en el cas de les combinacions homòlogues per B (As138 i As140 amb hA_B-BSA) es va veure un cert grau de similitut. Tots els compostos que donaven una reactivitat creuada amb la combinació As138/hA_B-BSA, ho feien amb la combinació As140/hA_B-BSA, però, en certs casos, amb un augment del reconeixement, com per exemple, en els casos de la MB, la α -B, la MT, la P i la T. Una

possible explicació pot ser la contribució dels clons específics generats per hB_MB-HCH que han fet que s'augmentés el grau de reconeixement. Pel que fa a la combinació per augmentar l'especificitat respecte la MB, es va observar una lleugera millora de l'especificitat. Com per exemple, es va reduir la reactivitat creuada respecte la B, la T i sobre tot amb el St. Però en el cas de la MT, va quedar sense variació. Per tant, l'objectiu inicial d'obtenir un antisèrum amb un grau d'especificitat superior per la MB amb la immunització heteròloga respecte la immunització homòloga es va complir parcialment.

4.3.3.2 Anàlisi del comportament dels As heteròlegs en funció del competidor

A la **Taula 4.15**, es mostren les combinacions As/Ag que van donar competència amb B i MB en funció de les IC₅₀ obtingudes en aquest cribatge.

Tal i com es pot observar a la **Taula 4.15**, es va trobar un comportament diferent depenent del tipus de competidor que es feia servir i amb un grau de reconeixement més ampli que l'esperat. Així, l'assaig As140/hA_B-HRP reconeix la B (100%) i la MB (74%) i l'assaig As140/hA_T-HRP reconeix la B (100%) i la MB amb un 42%. En certes combinacions el grau d'especificitat va ser més gran per la B, com en la combinació As141/hA_T-HRP on la MB només es reconeixia un 11%. Aquest resultat és contrari al que buscàvem, però val a dir que no hi ha a la literatura suficients precedents per saber quina havia de ser l'especificitat. Com s'ha comentat abans, aquests tipus d'estratègies s'han fet servir fonamentalment en l'àmbit de la producció d'anticossos catalítics. Al nostre grup s'han fet alguns estudis amb antisèrums produïts per immunització pseudoheteròloga ^{155, 173} i s'ha observat un reconeixement bastant ampli de productes estructuralment relacionats.

Taula 4.15 Combinacions dels ELISAs amb els antisèrums obtinguts a partir de la immunització heteròloga

Immunògens: hA_B i hB_MB ^{*4}			Boldenona			Metilboldenona		
	As	Comp	Pendent	IC ₅₀ nM	RC %	Pendent	IC ₅₀ nM	RC %
Directe	140 ^{*1}	hA_B ^{*2}	-0.78	3.58	100	-0.67	4.85	74
		hA_T ^{*2}	-0.62	87	100	-0.46	207.2	42
		hB_B ^{*2}	-1.15	11.38	8	-1.00	0.97	100
		hB_MB ^{*2}	-1.2	100.6	2	-0.87	2.56	100
	141 ^{*1}	hA_B ^{*2}	-0.73	3.53	100	-0.79	32.4	11
		hA_T ^{*2}	-0.53	2.2	100	-0.58	20.32	11
		hB_B ^{*2}	-1.2	11.38	21	-0.90	2.42	100
		hB_MB ^{*2}	-0.52	3.62	28	-0.91	1	100
Indirecte	140 ^{*1}	hA_B ^{*3}	-0.41	31.15	100	-0.41	470.4	7
		hA_T ^{*3}	-0.45	64.88	84	-0.42	54.34	100
		hB_B ^{*3}	-0.59	89.27	4	-0.73	3.92	100
		hB_MB ^{*3}	-0.61	122.6	5	-0.68	5.59	100
	141 ^{*1}	hA_B ^{*3}	-0.53	2.47	100	-0.47	19.45	13
		hA_T ^{*3}	-0.32	14.66	100	-0.59	261.5	6
		hB_B ^{*3}	-0.82	26.28	100	-0.49	45.45	58
		hB_MB ^{*3}	-0.65	27	66	-0.55	17.71	100

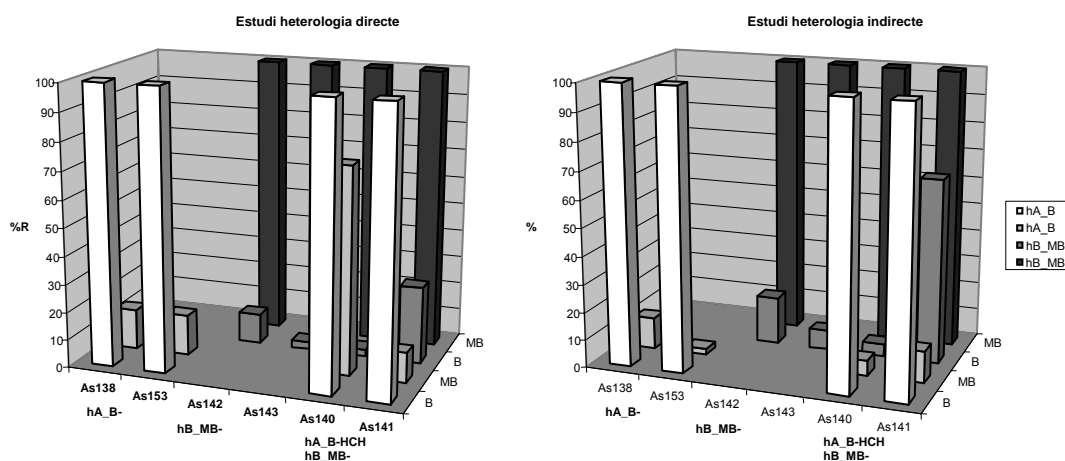
^{*1} El criteri d'establir el 100%, ha estat assignar-ho al compost més sensible. ^{*2} Conjugat unit a HRP, ^{*3} Conjugat unit a BSA, ^{*4} Conjugats a HCH

De la **Taula 4.15** es pot extreure que hi havia un comportament mixt, depenent de l'haptè de competició. Així, de forma general, es va observar que quan l'haptè de competició és de tipus A, es reconeix millor la B, mentre que quan l'haptè de competició és de tipus B, es reconeix millor la MB. Aquest comportament només té dos excepcions pel cas del format indirecte que són les combinacions As140/hA_T-BSA i As141/hB_B.

Tal i com s'havia observat en el apartat anterior (vegeu **Taula 4.14**) i amb el comportament observat amb la **Taula 4.15**, aquest comportament antisèrums heteròlegs s'havia d'estudiar. Per aquest motiu es van estudiar els antisèrums homòlegs i heteròlegs amb els mateixos competidors. D'aquesta manera queda un nombre petit d'assaigs per poder treure conclusions. En el format directe, tal i com es mostra a la **Gràfica 4.21**, els antisèrums heteròlegs es comporten de forma similar als antisèrums homòlegs en la corresponent combinació As/TE homòloga. Per exemple, la combinació As141/hA_B-HRP va donar un perfil molt similar als As138 i As153 (obtinguts a partir de hA_B-HCH) amb el mateix traçador, encara que en el cas de As140/hA_B-HRP, el reconeixement de la MB va millorar fins arribar a un 73% de reactivitat respecte la B. Per altra banda, la combinació As140/hB_MB-HRP va donar un perfil similar al dels As142 i

Desenvolupament d'IA per a la determinació d'hormones anabolitzants

As143 (obtinguts a partir de hB_MB-HCH) amb el mateix traçador, tot i que amb la combinació As141/hB_MB-HRP, hi va haver un major reconeixement de la B, amb un 27.2% de reconeixement respecte la MB.



Gràfica 4.21 Perfil de reactivitat creuada de les combinacions homòlogues i heteròlogues per conjugats hA_B i hB_MB, respecte la B i la MB. A la dreta format directe i l'esquerra format indirecte.

En el cas del format indirecte, a l'igual que anteriorment, en les combinacions homòlogues es va observar una especificitat pels seus corresponents analits, és a dir, les combinacions que van utilitzar As produïts amb l'immunogen hA_B-HCH, van ser específiques per B, i els anticòs que van ser obtinguts a partir de hB_MB-HCH, van ser específics contra MB. Però, respecte als anticòs heteròlegs, es va observar un comportament similar depenent del competidor utilitzat. Així, quan es va utilitzar com a competidor l'hA_B-BSA, van donar com a resultat assaigs específics per B, mentre que quan es va utilitzar el competidor hB_MB-BSA també va ser MB l'analit més reconegut tot i que per l'As141 la reactivitat creuada de B respecte la MB va ser de l'ordre del 66%.

Com a conclusió d'aquest estudi, es va poder observar que els antisèrums heteròlegs es van comportar com una mescla d'antisèrums dels específics per B i dels específics per MB. Això es va poder comprovar tant en el format directe com en l'indirecte.

Per tant, per la posterior optimització, seguint criteris de detectabilitat de la B i MB, i criteris d'especificitat, es van escollir els següents assaigs: per a la determinació de B,

As141/hA_T-HRP; per a la determinació de MB, As143/hB_B-HRP, els quals van donar una detectabilitat millor, i un perfil parcial de reactivitat creuada més diferenciat.

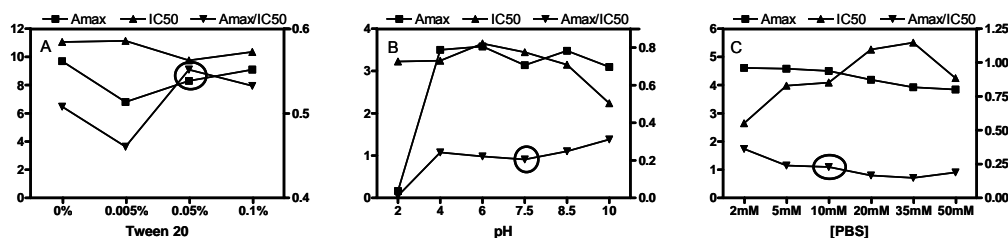
4.3.4 Optimització i avaluació dels ELISAs per B i MB

Com s'ha dit anteriorment, es van escollir per la seva optimització i avaluació els assaigs As141/hA_T-HRP per B, i As143/hB_B-HRP per MB, ambdós en format directe. Es van escollir aquests assaigs seguint un criteri de detectabilitat. Ambdós assaigs van mostrar una millor detectabilitat respecte als assaigs obtinguts en format indirecte. Per tant, i donat que amb el format directe ens estalviarem una etapa més en l'assaig, es va decidir abordar l'optimització d'aquest dos assaig per la determinació de B i MB.

A l'igual que anteriorment, el cas de la THG (apartat 4.1.3) i del St (apartat 4.2.3), es van estudiar diferents paràmetres físico-químics que pogueren millorar la detectabilitat de l'assaig, com ara la concentració de Tween 20 al medi, l'efecte del pH i l'efecte de la força iònica a l'etapa de competència.

4.3.4.1 Optimització i avaluació de l'assaig As141/hA_T-HRP

Un dels paràmetres que esdevingué important al cas anterior pels assaigs per St fou la concentració de Tween 20. En aquest cas, tal i com es pot observar a la **Gràfica 4.22 A**, no hi havia un canvi substancial tant en termes de detectabilitat com de la Amax. S'observava un lleuger empitjorament en condicions en disminuir la concentració de Tween 20. Per tant, es va decidir seguir endavant amb un 0.05%.



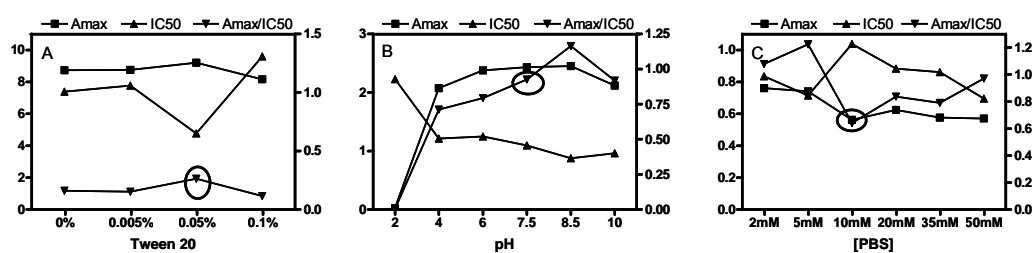
Gràfica 4.22 Estudi dels paràmetres físico-químics per l'assaig As141/hA_T-BSA (A, Efecte del Tween 20; B, pH; i C, força iònica). L'eix de les IC₅₀ està expressat en nM (eix esquerre), i l'eix de l'Amax està expressada en U.A. (eix de la dreta, junt amb Amax/IC₅₀).

Pel que fa al de pH, es va observar una estabilitat a l'assaig entre pH 4.0 i 8.5 (vegeu **Gràfica 4.22, B**). Es de destacar la resistència que té aquest assaig a pHs àcids, que no havíem observat als anteriors assaigs. Durant aquest interval de pH no es variava la detectabilitat d'una manera apreciable, es va decidir continuar amb l'etapa de competència a pH 7.5.

En cas de l'estudi de la força iònica del medi de competència (vegeu **Gràfica 4.22, C**), tampoc es va observar variacions substancials, tot i que l'assaig presentava valors d'IC₅₀ molt més baixos, quan el medi tenia una força iònica baixa.

4.3.4.2 Optimització i avaluació de l'assaig As143/hB_B-HRP

De la mateixa manera que anteriorment s'ha descrit es van avaluar la concentració de Tween 20, el pH i la força iònica per l'assaig As143/hB_B-BSA per la determinació de MB. Pel que fa a la concentració de Tween 20 (vegeu **Gràfica 4.23, A**) es va veure un certa millora quan es treballava en condicions estàndard (0.05% de Tween 20), però, aquesta millora no era substancial respecte als valors que es van obtenir a altres concentracions.



Gràfica 4.23 Estudi dels paràmetres fisico-químics per l'assaig As143/hB_B-BSA (A, Efecte del Tween 20; B, pH; i C, força iònica). L'eix de les IC₅₀ està expressat en nM (eix esquerre), i l'eix de l'Amax està expressada en U.A. (eix de la dreta, junt amb Amax/IC₅₀).

Segons es pot veure a la **Gràfica 4.23 B**, l'assaig As143/hB_B-BSA és estable a l'interval de pH entre 4-10. Es pot observar un lleugera millora, respecte la detectabilitat, quan es passa de medi àcid a bàsic. De totes maneres, donat que la millora no es va considerar substancial, per tant, es va decidir seguir treballant a pH 7.5.

Respecte a l'estudi de la força iònica, es pot observar un cert empitjorament de la IC₅₀ en condicions estàndard (10 mM), però aquesta variació no era substancial, ja que la variació d'IC₅₀ passa de 1.03 nM (10 mM PBS) a 0.83 nM (2 mM PBS). De totes maneres, tal i com es pot veure a la **Gràfica 4.23 C**, es pot observar un davallada de l'Am_{ax} quan s'augmenta la força iònica del medi. Es va escollir la concentració de PBS corresponent a 10 mM com a punt de compromís per la determinació de MB.

4.3.5 Especificitat dels assaigs per B i MB

Per comparar el grau d'especificitat de cada assaig de la B i la MB, es van realitzar les corbes de calibratge de compostos relacionats i es van mesurar amb els ELISAs corresponents. D'aquesta manera es va poder saber el valor de la IC₅₀ corresponent a cada analit, i a partir d'aquest valor, calcular el percentatge de reactivitat creuada. A la **Taula 4.16** es mostren les reactivitats creuades de compostos estructuralment relacionats amb l'assaig As141/hA_T-HRP, on el 100% correspon a la B, i amb l'assaig As143/hB_B-HRP, on el 100% correspon a la MB.

Taula 4.16 Reactivitat creuada dels ELISAs per B i MB

Immunogen	Heteròleg	hB_MB-HCH
Compost	As141/ hA_T-HRP	As143/ hB_B-HRP
Boldenona	100	10
Metilboldenona	18	100
α-Boldenona	13	<0.2
Androstandiona	5	0.5
Androstandiendiona	113	0.6
Testosterona	9	6
Progesterona	6	0.5
DHT	4	3
Estanozolol	<0.4	11
Estrona	<0.4	<0.2
Pregnenolona	<0.4	<0.2
Nortestosterona	<0.4	1
Metiltestosterona	<0.4	73
Colesterol	<0.4	<0.2

4.3.5.1 Especificitat de As141/hA_T-HRP per B

Aquesta combinació era la que presentava una detectabilitat més baixa per B. El reconeixement que s'obté de compostos més relacionats com la MB i la α -B, va ser moderada, 18 i 13%, respectivament. Un fet sorprenent va ser l'elevat reconeixement de l'androstandiendiona (ADD), amb un valor de CR de 113%. A l'igual que la MB, la B i la α -B, la ADD presenta la mateixa àrea de reconeixement a la qual s'adreçava l'hA_B (vegeu **Figura 4.7**).

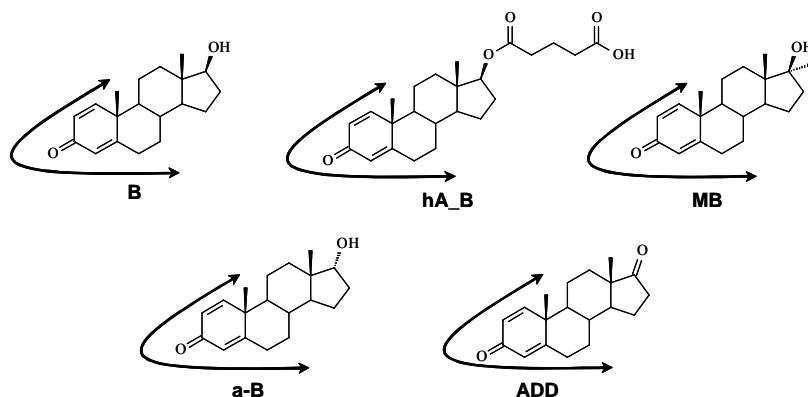


Figura 4.7 Estructures químiques de l'haptè A de boldenona (hA_B), boldenona (B), metilboldenona (MB), α -boldenona (a-B) i androstandiendiona (ADD) i l'àrea de reconeixement.

Però, mentre que la a-B i la MB, són molt poc reconegudes, l'ADD ho és tant com la B. No podem donar una explicació definitiva a aquest fet, però una possible raó, podria trobar-se de nou en la llargària del braç espaïador que fa que la contribució de l'anell D a la interacció amb l'anticòs sigui més gran del que inicialment hauríem esperat. Així, la davallada en el reconeixement de la MB i la a-B es trobaria en el grup Me a C17 i en la configuració de l'hidroxil, respectivament. En canvi, l'ADD, la cetona podria mimetitzar millor l'orientació del grup hidroxil de la B i per tant, establir els enllaços corresponents als llocs d'unió de l'anticòs, estabilitzant el complex Ag-Ac.

4.3.5.2 Especificitat de l'assaig As143/hB_B-HRP per MB

Segons es pot veure a la **Taula 4.16**, es va observar el perfil de reactivitat creuada que, a priori, s'esperava. Com a analits relacionats que tenen una reactivitat creuada remarcable,

són la MT, amb un 73%, i el St, amb un 11.5. Tots aquests, tal i com es pot veure a la **Figura 4.8**, tenen la mateixa àrea de reconeixement que l'immunògen, que en aquest cas era l'hB_MB-HCH. En el cas de l'estanozolol era d'esperar una millor reactivitat creuada, però, donat que té un grup antigènicament més potent, com és l'anell de pirazole, això afecta tota l'estructura tridimensional de la molècula. També era d'esperar la baixa reactivitat creuada amb la B, amb un 10%, tot i que són compostos molt similars.

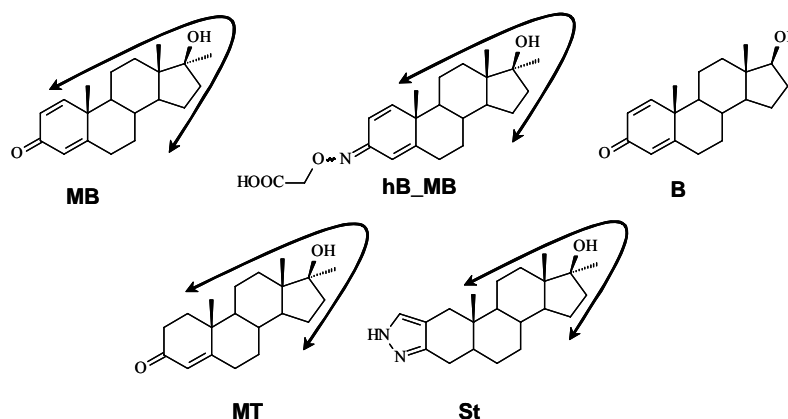
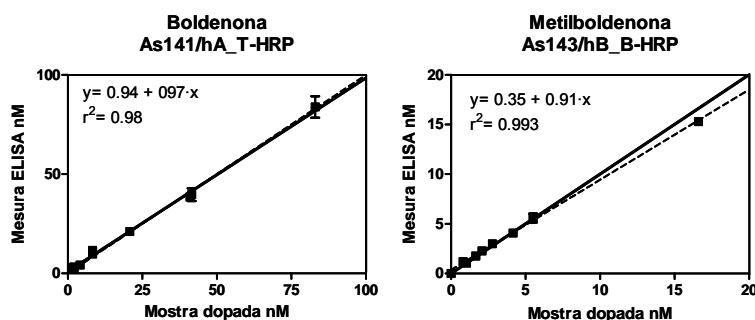


Figura 4.8 Estructures químiques de l'haptè B de metilboldenona (hB_MB), boldenona (MB), boldenona (B), estanozolol (St) i metiltestosterona (MT) i l'àrea de reconeixement.

4.3.6 Estudis d'exactitud per a la determinació de B i MB

Els estudis d'exactitud es van realitzar per tal d'avaluar la quantificació dels assaigs utilitzant mostres cegues. Com s'ha dir anteriorment (vegeu **apartat 4.1.5**), les mostres cegues van ser preparades per una persona aliena a l'experiment. Després d'analitzar-les amb el seu corresponent ELISA es va poder correlacionar la mesura experimental amb la concentració dopada. Tal i com es pot veure a la **Gràfica 4.24**, a l'assaig **As141/hA_T-HRP**, es va observar una bona correlació correspon amb un pendent de 0.97 i una r^2 de 0.98.

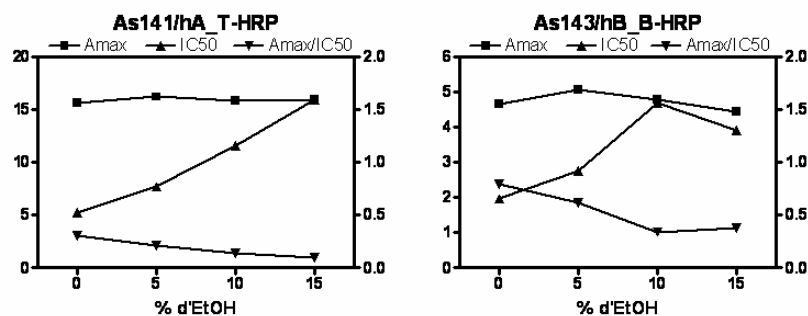


Gràfica 4.24 Estudis d'exactitud pels ELISAs As141/hA_T-HRP (N=10) per boldenona, i As143/hB_B-HRP (N=8) per metilboldenona emprant mostres cegues. Valors representats en nM.

Igualment, en els estudis d'exactitud realitzats per MB amb l'assaig As143/hB_B-HRP, es va observar una bona correlació entre mesures ($r^2=0.993$), tan sols amb una lleugera subestimació (pendent=0.91).

4.3.7 Efecte dels dissolvents orgànics als assaigs As141/hA_T-HRP i As143/hB_B-HRP

Es va avaluar l'efecte que produïa l'EtOH sobre l'assaig a diferents concentracions (vegeu Gràfica 4.25), ja que, tal i com es comentarà en el pròxim capítol, per tal d'analitzar mostres va ser necessari fer un tractament de la mostra que implicava l'ús d'aquest dissolvent. Tal i com es pot veure a la gràfica, es va observar un comportament similar a l'observat amb els ELISAs per estanozolol, on al introduir un dissolvent orgànic com l'EtOH empitjorava la detectabilitat de l'assaig. Per tant, alhora de escollir la concentració d'EtOH, s'haurà de valorar si l'empitjorament de detectabilitat queda compensat pel guany que es pugui obtenir de fer un tractament de la mostra.

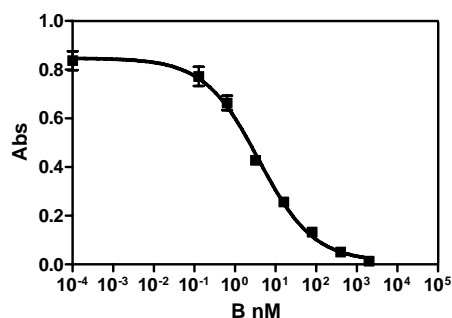


Gràfica 4.25 Efecte de l'EtOH sobre els assaigs per MB (As143/hB_B-HRP) i B (As141/hA_T-HRP). Amax (■), IC₅₀ (▲) i Amax/IC₅₀ (▼). L'eix de les IC₅₀ es van mesurar en nM (esquerra) i les de Amax en U.A (dreta, junt amb Amax/IC₅₀).

4.3.8 Condicions finals dels ELISAs per B i MB i paràmetres dels assaigs

4.3.8.1 ELISA per B As141/hA_T-HRP

Tal i com s'havia comentat anteriorment, les condicions seleccionades són iguals a les de l'assaig As143/hB_B-HRP. Les concentracions d'immunoreactius utilitzades van ser d'una dilució d'As141 de 1/8000 i una concentració de hA_T-HRP de 0.0625 µg/mL. Per tant, es va utilitzar un tampó de PBS 10mM a pH=7.5 amb un 0.05% de Tween 20, i el temps de competència es va establir en 30 min, sense preincubació. Després del rentat de la placa, es va procedir a obtenir la resposta colorimètrica mitjançant el substrat. D'aquesta manera es va obtenir la corba de calibratge per a la detecció de B com la que es mostra a la **Gràfica 4.26**. Segons es pot veure a la **Taula 4.17**, es va obtenir una IC₅₀ de 1.14±0.05 µg/L, amb un LOD de 0.153±0.011 µg/L (N=3). De la mateixa manera, amb aquest assaig es va obtenir una bona correlació entre mostra dopada i mostra mesurada per B (pendent de 0.97 amb un r² de 0.98). Respecte el seu perfil d'especificitat, es va obtenir reactivitat creuada amb la B i la α-B amb valor de 18 i 13% respectivament. Es va trobar, també, una reactivitat creuada molt elevada pel cas de la ADD, de 113%. Respecte de l'efecte de l'EtOH a l'etapa de competència, es va observar un lleuger empitjorament de l'assaig a concentracions baixes d'EtOH.



Gràfica 4.26 Corba de calibratge de l'ELISA optimitzat As141/hA_T-HRP per B.

Taula 4.17 Característiques de l'assaig As141/hA_T-HRP per B.

As141/hA_T-HRP ^{*1,2}	
Amax	0.84±0.07
Amin	0.011±0.006
IC₅₀ µg/L	1.14±0.05
Pendent	-0.644±0.011
Interval de treball, µg/L	0.493±0.026 a 33.481±1.111
LOD, µg/L	0.153±0.011
r²	0.98±0.02

*¹ Les dades corresponen a la mitja i la desviació estàndard dels paràmetres extrets de l'equació logística emprada per ajustar la corba (N=3, realitzat en plaques diferents i dies diferents).

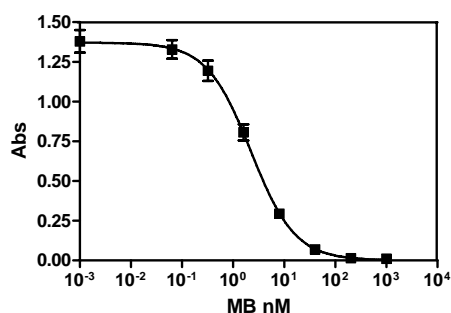
*² El LOD correspon a la corba el valor corresponent a IC₉₀, mentre que l'interval de treball correspon a IC₈₀-IC₂₀.

4.3.8.2 ELISA per MB As143/hB_B-HRP

Les concentracions d'immunoreactius utilitzades van ser d'una dilució d'As143 de 1/16000 i una concentració de hB_B-HRP de 0.0625 µg/mL. Les condicions finals per a la determinació immunoquímica de MB mitjançant un assaig immunoenzimàtic van ser la utilització d'un tampó PBS 10 mM, a un pH de 7.5, amb un 0.05% de Tween 20. L'etapa de competència es va establir en 30 minuts i sense preincubació. A continuació, l'etapa de revelat amb el substrat també de 30 min. Sota aquestes condicions es va obtenir la corba de calibratge per a la determinació de MB, com la que es pot veure a la **Gràfica 4.27**. Els paràmetres extrets de l'equació d'ajust es poden veure a la **Taula 4.18**. Es va aconseguir un assaig amb una detectabilitat expressada per la IC₅₀ de 0.65±0.02 µg/L i amb un LOD

Desenvolupament d'IA per a la determinació d'hormones anabolitzants

de 0.071 ± 0.013 $\mu\text{g/L}$ (N=3). Així, es va obtenir una bona correlació entre mostra dopada i mostra mesurada per MB (pendent de 0.91 amb un r^2 de 0.993). Respecte el seu perfil d'especificitat, es va obtenir una reactivitat molt elevada amb la MT amb un valor de 73%, ja que té el mateix epítoc exposat al sistema immune que la MB. Respecte de l'efecte de l'EtOH a l'etapa de competència, es va observar un lleuger empitjorament de l'assaig a concentracions baixes d'EtOH.



Gràfica 4.27 Corba de calibratge per l'ELISA optimitzat As143/hB_B-HRP per la MB.

Taula 4.18 Característiques de l'ELISA As143/hB_B-HRP per MB

As143/hB_B-HRP*^{1,2}	
Amax	1.37±0.03
Amin	0.001±0.005
IC₅₀ $\mu\text{g/L}$	0.65±0.02
Pendent	-1.005±0.033
Interval de treball, $\mu\text{g/L}$	0.162±0.017 a 2.551±0.048
LOD, $\mu\text{g/L}$	0.071±0.013
r²	0.996±0.002

*¹ Les dades corresponen a la mitja i la desviació estàndard dels paràmetres extrets de l'equació logística emprada per ajustar la corba (N=3, realitzat en plaques diferents i dies diferents).

*² El LOD correspon a la corba el valor corresponent a IC₉₀, mentre que l'interval de treball correspon a IC₈₀-IC₂₀

5 Determinació d'anabolitzants en mostres biològiques mitjançant tècniques immunoquímiques.

L'objectiu final de qualsevol immunoassaig és de mesurar mostres reals. Els compostos estudiats s'engloben en aquesta tesi doctoral, són anabolitzants rellevants tant en el camp agroalimentari com en el camp dels esports. En ambdós camps, les mostres més comunes per realitzar el control d'aquest compostos són mostres biològiques, com ara plasma, orina, fetge, múscul, pèl, saliva, etc ¹⁷⁴. En aquests casos la resposta dels immunoassaigs pot estar afectada per interferències provinents de la mostra. L'efecte matriu és la desviació dels diferents paràmetres de la corba estàndard (en tampó) causada per les característiques de la mostra o pels seus components (excepte l'analit). Les interferències als immunoassaigs estan classificades en específiques i no específiques. Totes elles poden afectar l'interacció Ac-Ag i/o l'activitat enzimàtica, si s'està utilitzant (assaigs directes). Les interferències específiques es refereixen a les substàncies que són reconegudes pel Ac (compostos estructuralment relacionats amb l'analit i per tant, capaços d'interaccionar amb l'Ac). Les interferències de tipus no específic engloben altres components que no

Determinació d'HA en mostres biològiques

presenten cap semblança estructural amb l'analit, o poden ser també paràmetres fisicoquímics com ara el pH, la força iònica, etc.

En molts dels casos, aquest tipus d'interferents són desconeguts, per tant l'efecte matriu de mostres reals sempre s'haurà d'avaluar quan es vulgui mesurar mostres reals amb un mètode immunoquímic ^{175, 176}. Existeixen diferents aproximacions per tal d'avaluar l'efecte matriu d'una mostra. Si existeix una mostra blanc, es a dir, amb una concentració zero d'analit, es realitza la corba de dilució en la matriu i es compara amb la corba estàndard. Si no hi ha efecte matriu, no s'observarà desviacions dels paràmetres de la corba de referència. En el cas de no disposar d'una mostra blanc, usualment s'empra el mètode d'adicions estàndard.

Un cop la presència d'efecte matriu està confirmada, el següent pas és trobar la millor manera d'eliminar-la. La dilució de la mostra és la via més fàcil per tal d'evitar l'efecte matriu. La mostra es diluiria en el tampó de la corba de referència i es construiria la corba de l'analit per cadascuna de les dilucions de la mostra. L'efecte matriu de la mostra s'eliminarà amb la dilució de manera que la corba diluïda tindria els mateixos paràmetres que la corba de referència. Un altre solució és l'addició d'additius al tampó de l'assaig, per tal d'igualar la corba de la mostra amb la corba estàndard. L'aplicació de pretractaments de la mostra seria una altra solució però amb el desavantatge que s'inclouria una etapa més en el protocol general d'anàlisi de la mostra.

En aquest capítol, es mostrarà l'avaluació dels assaigs desenvolupats per l'estanozolol, la boldenona, la metilboldenona i la tetrahydrogestrinona, a l'anàlisi de mostres biològiques. Per a l'estanozolol s'avaluarà el sèrum humà, l'orina humana i l'orina bovina, per l'interès que té tant en camp agroalimentari com en l'esportiu. En el cas de la boldenona i la metilboldenona s'estudiarà l'orina bovina, pel seu interès en el camp agroalimentari. Finalment, per la tetrahydrogestrinona s'estudiarà l'orina humana, ja que aquest anabolitzant s'empra fraudulentament en el camp dels esports. Les mostres de plasma humà van ser d'origen comercial (Sigma, S-2257). Les mostres d'orina humana es van aconseguir d'individus voluntaris. Finalment, les mostres d'orina bovina procedents d'animals tractats i animals control van ser donades per en Prof. Mark Crowe (*University*

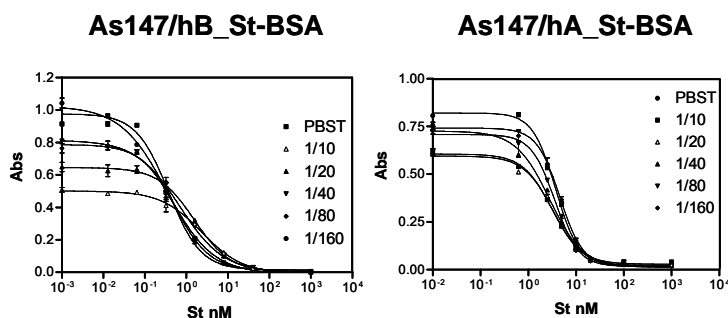
College of Dublin, Irlanda) gràcies a la col·laboració establerta dins del context del projecte RADAR. L'objectiu d'aquest capítol serà la mesura dels anabolitzants d'interès en les diferents matrius biològiques, i la manera d'eliminar l'efecte matriu de la mostra subjectada a estudi.

5.1 Determinació immunoquímica de St i metabòlits en mostres biològiques

5.1.1 Mostres de sèrum humà

5.1.1.1 Avaluació de l'efecte matriu del sèrum

Una potencial matriu d'interès per a la detecció d'estanozolol en humans és el sèrum. Per tant es va decidir avaluar les possibles interferències no específiques d'aquesta matriu sobre l'assaig desenvolupat anteriorment. Per la realització d'aquesta avaluació es va decidir treballar amb els assaigs obtinguts per la determinació de St i del metabòlit majoritari en humans, el 3'OH-St, **As147/hB_St-BSA**, el més sensible i específic, i el **As147/hA_St-BSA**, amb un perfil de reactivitat creuada més ampli. Per fer aquest estudi es va utilitzar una mostra de sèrum provinent Sigma, com a mostra representativa. Es van realitzar dilucions d'aquest sèrum amb PBS 10 mM i se li va afegir la quantitat corresponent de Tween 20. Seguidament, aquestes dissolucions es van utilitzar per preparar corbes patró d'estanozolol. Els resultats de l'efecte matriu del sèrum humà es mostra a la **Gràfica 5.1**. Com es pot observar, l'efecte matriu del sèrum humà va ser molt gran. Per tal que la mesura de les mostres fos comparable a la corba de referència va caldre diluir el sèrum en PBS unes 160 vegades. Aquest fet fa empitjorar el LOD de la detecció de St en sèrum humà fins a 3.07 µg/L, en el cas de **As147/hB_St-BSA** i per l'assaig **As147/hA_St-BSA** de 61.4 µg/L. Degut a que la MRPL per la detecció d'estanozolol en sèrum és de 2 µg/L, aquesta metodologia analítica no compliria amb els mínims requeriments per a la detecció d'aquest compost en sèrum. Per tant, calia l'estudi de tractaments del sèrum per minimitzar les interferències no específiques que afecten l'assaig (vegeu **apartat 5.1.1.2**).

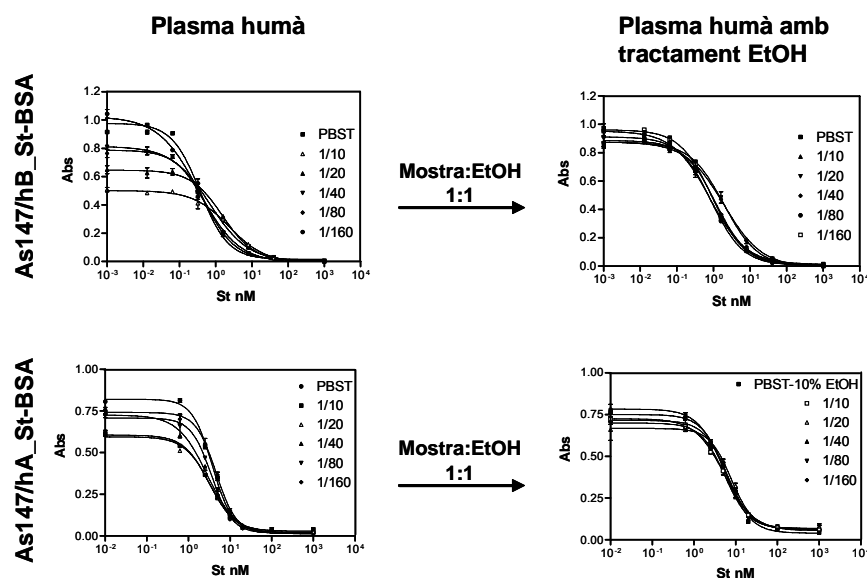


Gràfica 5.1 Efecte matriu produït pel sèrum humà en els ELISAs per St **As147/hB_St-BSA** i **As147/hA_St-BSA**. S'indica a la dreta les dilucions de l'orina en PBS i la de referència.

5.1.1.2 Determinació de St en sèrum humà

Una possible causa per l'efecte matriu observat podria ser el fet de la gran quantitat d'albúmines que conté el sèrum. Aquestes, com a proteïnes transportadores, poden unir-se amb l'analit, impedit la interacció amb l'anticòs, el que explicaria que la IC_{50} empitjori. Però, a més, s'ha de tenir en compte que l' A_{max} disminueix, per tant, les albúmines del sèrum podrien afectar d'una manera no específica bloquejant la interacció de l'anticòs amb l'antigen. Cal tenir en compte que el contingut d'albúmines en el sèrum humà està entre 30 a 50 g/L, mentre que el contingut d'hormones anabolitzants, en el cas que hi hagués seria molt més baix. Per tant, per tal de provar aquesta hipòtesi es va abordar l'eliminació de les albúmines del sèrum.

Dintre dels possibles mètodes per a l'eliminació de les albúmines^{177, 178} es va optar per fer-les precipitar mitjançant solvents orgànics. Es va decidir utilitzar EtOH, ja que té un gran rendiment en la precipitació de les proteïnes¹⁷⁹. A més, l'EtOH és miscible amb el tampó de PBS el que permetria agafar el sobrenedant, diluir-lo amb el tampó i mesurar-lo directament. El punt crític que s'havia de tenir en compte, era la tolerància de l'assaig a aquest dissolvent. Com es va comentar a l'**apartat 4.2.6**, l'EtOH empitjorava la detectabilitat de l'assaig a baixes concentracions. Com a resultat dels estudis previs vam arribar a un compromís que la concentració escollida per fer l'anàlisi seria d'un 10% d'EtOH en les mostres per analitzar.



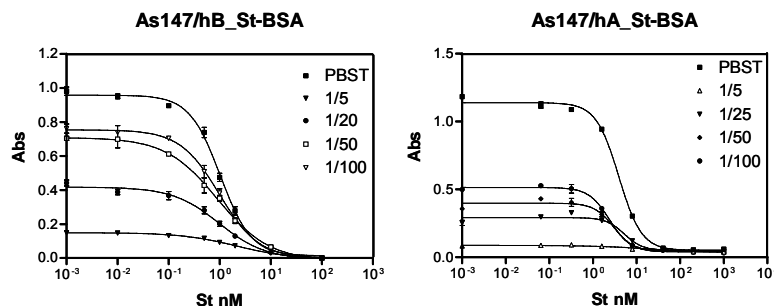
Gràfica 5.2 Efecte matriu del sèrum humà (esquerra), i l'efecte matriu després del tractament en EtOH. Es mostren la corba de referència i les corbes amb el factor de dilució de la mostra. Les corbes de referència amb el sèrum humà són en PBST i les corbes amb el tractament, contenen un 10% d'EtOH.

Tal i com es mostra a la **Gràfica 5.2**, el tractament amb EtOH va eliminar les interferències produïdes pel sèrum. El fet de precipitar les albúmines del sèrum amb EtOH ha suposat un tractament simple i eficaç per a la mesura directa d'estanozolol amb l'ELISA **As147/hB_St-BSA** i amb el **As147/hA_St-BSA** amb un 10% d'EtOH. D'aquesta manera es va aconseguir un LOD per a la determinació de St en sèrum humà de 0.18 $\mu\text{g/L}$ i 3.74 $\mu\text{g/L}$, pels assaigs **As147/hB_St-BSA** i **As147/hA_St-BSA**, respectivament. Per tal de realitzar les mesures de mostres de sèrum, es van dopar a diferents nivells de concentració d'estanozolol i es van mesurar aplicant el procediment de precipitació de les albúmines. Amb aquesta estratègia es va obtenir una quantificació que suposava una recuperació del $48 \pm 14 \%$. El fet de mesurar només la meitat del compost a determinar pot venir de que en el procediment de precipitació, l'altra meitat queda retinguda entre les proteïnes del sèrum, donada la seva naturalesa hidrofòbica.

5.1.2 Mostres d'orina humana

5.1.2.1 Avaluació de l'efecte matriu

Una altre matriu d'interès per la detecció d'estanozolol és l'orina humana. L'interès d'aquesta matriu rau en quan es pot obtenir en grans quantitats i de manera no invasiva. Per tant, a l'igual que amb el sèrum, varem procedir a avaluar les interferències no específiques que aquesta matriu podia produir sobre l'assaig **As147/hB_St-BSA** i a l'assaig **As147/hA_St-BSA**. Per tal d'obtenir una orina control humana, es va recollir orina de diferents individus (N=14), on hi havia igual quantitat d'homes que de dones, i es va mesclar a parts iguals. Es va treballar amb aquesta mostra com a orina control (vegeu **apartat 9.3.3.2**) partint de la base que els individus donants no havien pres anabolitzants. Per tal d'avaluar l'efecte d'aquesta orina sobre l'assaig es van preparar diferents dilucions en PBS, es va ajustar el pH i se li va afegir la quantitat corresponent de Tween 20. Els resultats d'aquest estudi es mostren a la **Gràfica 5.3**. Tal i com es pot observar, les interferències produïdes per la orina humana inhibeixen molt la senyal de l'assaig. Tot i que es va diluir l'orina unes 100 vegades, el senyal Amax es quedava al voltant del 80% de l'obtinguda amb PBS. Per tant, per la mesura directa del St en orina humana amb aquest assaig, estariem fora de les MRPLs establertes per la detecció d'aquest compost. Per la qual cosa s'hauria de pensar un mètode de preparació de la mostra per tal de minimitzar l'efecte matriu de l'orina humana en aquest assaig.

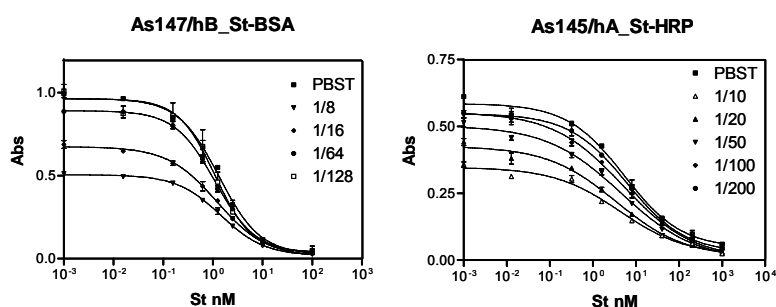


Gràfica 5.3 Efecte matriu produït per orina humana en els ELISAs per St **As147/hB_St-BSA** i **As147/hA_St-BSA**. S'indica a la dreta les dilucions de l'orina en PBS i la de referència.

5.1.3 Mostres d'orina bovina

5.1.3.1 Avaluació de l'efecte matriu

Com a matriu d'interès i com a part del projecte en el qual es va englobar la major part d'aquesta tesi doctoral, l'orina bovina ha estat un dels principals objectius. La importància ve de que aquest anabolitzant s'utilitza per augmentar el pes de l'animal, en aquest cas ramaderia bovina. Ja que l'ús fraudulent d'aquest compost s'ha de controlar, es va pensar a utilitzar els assaigs desenvolupats per la detecció d'aquest compost. Com anteriorment s'ha comentat, un primer pas va ser l'avaluació de l'efecte matriu dels assaigs **As147/hB_St-BSA** i **As145/hA_St-HRP** sobre orina control. L'orina control es va obtenir a partir d'animals no tractats (vegeu **apartat 9.3.3.2**). Els resultat de l'estudi de l'efecte matriu de orina bovina es mostra a la **Gràfica 5.4**. Segons es pot extreure dels resultats obtinguts, a l'igual que amb l'orina humana, es va observar un gran efecte matriu sobre l'assaig. En el cas de l'assaig **As147/hB_St-BSA**, calia realitzar una dilució de 128 vegades per tal d'eliminar l'efecte matriu. Per altra banda, per l'assaig **As145/hA_St-HRP**, calia diluir fins 200 vegades l'orina. Com anteriorment, ja que amb aquest factor de dilució el LOD de l'anàlisi queda per sobre de les MRPLs, feia que l'anàlisi directe de St en orina bovina mitjançant aquests assaigs no entrés dintre dels requeriments establerts pels organismes oficials. Per tant es va haver de considerar de fer una sèrie de tractaments de la mostra per tal de minimitzar aquest efecte (vegeu **apartat 5.1.3.2**).



Gràfica 5.4 Efecte matriu produït per orina bovina en els ELISAs per St **As147/hB_St-BSA** i **As145/hA_St-HRP**. S'indica a la dreta les dilucions de l'orina en PBS i la de referència.

5.1.3.2 Desenvolupament d'un SPE-ELISA per la detecció de St i metabòlits en mostres d'orina bovina.

Donat el gran efecte matriu provocat per l'orina bovina als assaigs **As147/hB_St-BSA** i **As145/hA_St-HRP**, es va decidir incloure una etapa prèvia de purificació de la mostra, per tal de minimitzar les interferències de la matriu. Prèviament, s'havien realitzat una sèrie d'experiments per tal d'eliminar possibles interferents que poguessin haver a l'orina, mitjançant l'addició d'agents, com ara la PVP (Polivinilpirrilon) o el PEG (Polietilenglicol) a l'etapa de competència. D'aquesta manera es volia facilitar la interacció entre Ag/Ac¹⁸⁰. Un altre additiu estudiat fou l'addició d'EDTA. Aquest eliminaria els cations bivalents que poguessin interferir en la interacció Ag/Ac. Un altre tractament fàcil que es va pensar, va ser l'extracció de molècules apolars amb pentà. Una altra hipòtesi de possibles interferents va ser la presència de proteïnes a l'orina. Tot i que la presència de proteïnes a l'orina no es gaire freqüent, com en el cas del sèrum humà aquestes produïen l'efecte matriu, per tant es va intentar d'eliminar les proteïnes mitjançant tractaments àcids, bàsics o amb EtOH. En tots els casos que es van provar, no es va observar una millora substancial respecte a la matriu (resultats no mostrats). Per tant, es va haver de pensar en un altre tipus de tractament.

Un dels tractaments més utilitzats per a la purificació i preconcentració de mostres és l'extracció en fase sòlida (SPE, *Solid Phase Extraction*). El protocol general de SPE consisteix bàsicament en quatre etapes: Condicionament de la fase, càrrega de la mostra, rentat i elució de l'analit. Existeixen diferents tipus de fases que depenen del tipus d'interacció que s'estableix entre la fase i l'analit. Segons el tipus de fase podem trobar, fases de tipus directe (DP), fase reversa (RP) i fases d'intercanvi iònic (SXE). La utilització d'un tipus de fase depèn del tipus d'analit i de les seves propietats, però són de caràcter general, és a dir, poden retenir un ampli ventall d'analits, tots aquells capaços d'interaccionar de la mateixa manera amb la fase. Per contra, existeixen altres tipus de fases SPE més específiques, com poden ser els immunosorbents (vegeu **apartat 1.2.1.2.2**) i els MIPs (vegeu **apartat 1.2.2.3**). Malgrat tot, la neteja de mostres biològiques per a la detecció d'anabolitzants es fa habitualment per fase reversa, concretament les de tipus C18. Per tant, es va seleccionar aquesta fase com a primera via per minimitzar

l'efecte matriu de l'orina bovina. Per l'optimització de les SPE per minimitzar l'efecte matriu, es va utilitzar l'assaig **As147/hB_St-BSA**.

5.1.3.2.1 Desenvolupament i avaluació d'un procediment RP-SPE-ELISA utilitzant cartutxos C₁₈ Set-Pak®

Per tal de saber les condicions de rentat i elució del St, es va dopar una mostra i es va carregar a la columna (c=10nM, 5mL). A continuació se li van aplicar diferents rentats amb PBS amb concentracions creixents de MeOH (en intervals de 10% i 5mL per rentat). Cada mostra eluïda es va diluir fins tenir un 5% de MeOH i es va mesurar amb l'ELISA-5%MeOH **As147/hB_St-BSA**. Com es pot veure a la **Figura 5.1**, l'estanozolol va sortir eluït al 80% de MeOH. Amb més detall, es va poder veure que la totalitat del St va eluir entre la segona i la quarta fracció al 80% de MeOH (fraccions de 1 mL). Amb la concentració total calculada per l'ELISA es va observar que la recuperació de l'analit era del 99.6%.

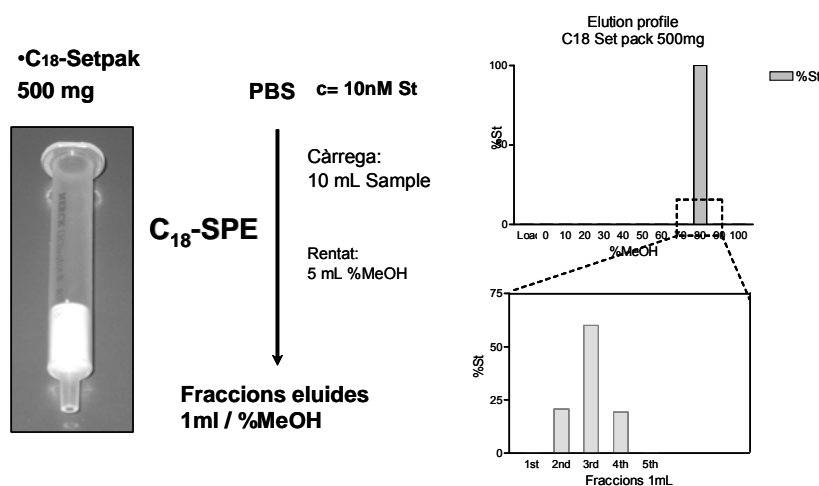


Figura 5.1 Protocol de l'avaluació de l'elució de St amb el C18 Set-Pak. Els valors de les gràfiques es mostren en % de recuperació de St

Amb aquestes dades es va establir que l'etapa de rentat seria al 40% de MeOH, per tal d'eliminar diferents compostos susceptibles de provocar interferències que poguessin inhibir l'assaig. Com etapa d'elució, es va decidir fer servir el 90% de MeOH, per tal que la mostra eluís en el mínim de fraccions possible.

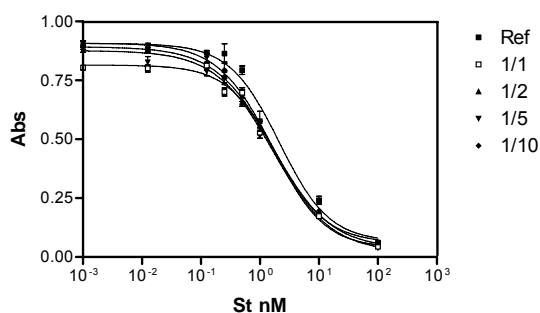
Determinació d'HA en mostres biològiques

Per tal de comprovar la validesa del mètode es van mesurar dues mostres dopades en PBS i es va calcular el percentatge de recuperació en la mesura de mostres. Com es pot veure a la **Taula 5.1**, la recuperació havia estat molt bona. S'hi pot observar una lleugera sobreestimació però es va considerar que no afectaria al resultat significativament.

Taula 5.1 Mesures de les mostres dopades en PBS amb el protocol C18 Set-Pak acoblat a ELISA.

Mostra dopada	Mesura SPE C18-ELISA	% Recup.
9 nM	9.59 nM	107
4 nM	4.28 nM	107

Les mostres d'orina bovina es van purificar seguint el protocol descrit anteriorment, i es va avaluar l'efecte matriu de les fraccions eluïdes amb l'ELISA **As147/hA_St-BSA** després de diluir-les fins a un 5% de MeOH. Segons es pot veure a la **Gràfica 5.5**, amb aquest tipus de tractament, es va eliminar l'efecte matriu, és a dir, es van eliminar una gran part de les interferències que contenia la matriu i que inhibien l'assaig. Per tant, el protocol RP-SPE-ELISA podia ser vàlid per a la detecció d'estanozolol en orina bovina. El LOD per determinar estanozolol en orina bovina era de 0.83 µg/L, per sota de les MRPLs establertes per la CE per la determinació de St (vegeu **apartat 1.1.8.2.2**).



Gràfica 5.5 Efecte matriu de l'orina bovina eluïda de C18 St-Pak al 90% de MeOH. Es mostren la corba de referència al 5% de MeOH, i les corbes de la mostra eluïda, aquestes van ser diluïdes fins al 5% (1/1), i aquest diluït a 1/i vegades.

Així, doncs, es va decidir aplicar aquest tipus de protocol per la detecció de St en mostres. Però, ja que el nombre de mostres podia ser molt gran (vegeu directiva 2002/657/EC ⁴⁴

relativa a la pauta i freqüència d'anàlisis a realitzar) i que el volum disponible de mostra requeria un volum inferior (0.5-1mL) es va proposar adaptar el mateix protocol a columnes amb un volum de fase menor (100mg, en comptes de 500 mg utilitzats en aquest protocol), i que permetessin el tractament simultani de mostres amb un sistema com ara el de Versaplate™ (Varian Inc.) que s'explicarà en el següent apartat.

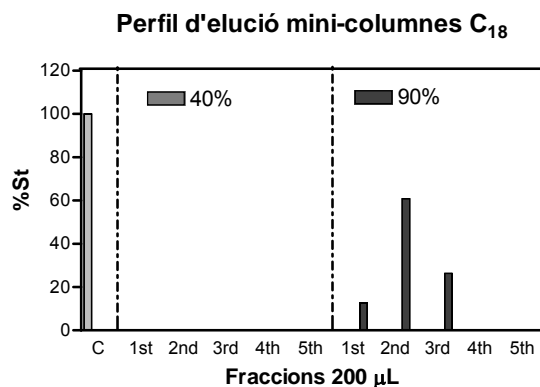
5.1.3.2 Establiment d'un protocol HTS-C18-SPE-ELISA per a l'anàlisi de St en mostres d'orina bovina

Com s'ha explicat anteriorment, donat el nombre elevat de mostres que s'han d'analitzar es va decidir fer servir el sistema Versaplate de Varian Inc, fent servir com a fase de SPE, C18 en cartutxos de 100 mg. El sistema Versaplate permet el tractament simultani de 96 mostres, mitjançant



96 mini-columnes. Es va emprar el sistema Versaplate amb mini-columnes de C18, el suport i un regulador de buit que ens va permetre controlar el fluxe de les diferents etapes del protocol d'extracció. Aquest sistema permetria un cribatge massiu de les mostres. De totes maneres, va caldre avaluar els diferents paràmetres involucrats en la elució de l'analit de les columnes i establir el nou protocol HTS-C18-ELISA (*High Throughput Screening on C18 phase coupled to ELISA*). Tot aquest desenvolupament es va realitzar mitjançant l'assaig **As147/hB_St-BSA**.

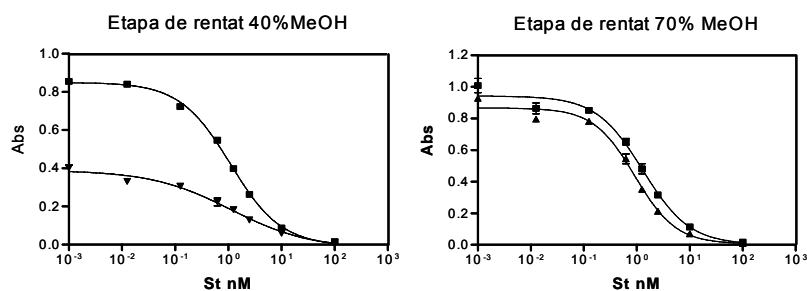
Es va aplicar el protocol avaluat anteriorment (**apartat 5.1.3.2.1**) amb lleugeres modificacions. Els volums de càrrega i dels diferents rentats, es van fixar a 1 mL. La mostra es va rentar amb un 40% de MeOH i l'elució es va fer a un 90% de MeOH. D'aquesta manera es va obtenir el perfil que es mostra a la **Gràfica 5.6**. Es va veure que l'analit eluïa als primers 600 µL de l'etapa d'elució.



Gràfica 5.6 Perfil d'elució de minicolumnnes amb un rentat del 40% i una elució al 90% de MeOH. Es mostren les fraccions de 200 µL de l'etapa d'elució. Mostra carregada C (c=20 nM, 100%).

Les fraccions d'elució es van ajuntar, es van diluir amb PBS fins a un 9% de MeOH i es van utilitzar per preparar les corbes de calibratge. Amb aquest protocol la mostra d'orina només es dilueix 5 vegades abans de fer l'anàlisi. Per fer aquest estudi també es va utilitzar orina bovina recollida d'animals control pel grup del Dr. Mark Crowe a l'UCD (*University College of Dublin*, vegeu **apartat 9.3.3.2**). Tal i com es mostra a la **Gràfica 5.7** (esquerra), tot i el tractament realitzat, encara es va observar que hi havia efecte matriu per part de l'orina bovina, si es compara amb la corba de calibrat preparada en tampó.

Per tal d'evitar aquest efecte matriu, es va augmentar la proporció de MeOH a l'etapa de rentat per tal d'arrossegar les possibles interferències que inhibeixen l'assaig. Prèviament, ja havíem comprovat que l'elució de l'estanozolol no té lloc al 70% de MeOH (vegeu **Figura 5.1**). Per tant, es va decidir aplicar aquest percentatge de MeOH per rentar i a continuació es va eluir al 90%. L'avaluació de l'efecte matriu va mostrar que desapareixia l'efecte matriu, essent la corba preparada amb les fraccions eluïdes i la de PBST, pràcticament iguals (vegeu **Gràfica 5.7**, dreta). Per tant, es va procedir a aplicar aquest nou protocol per a les mostres d'orina.



Gràfica 5.7 Efecte matriu de l'orina eluïda de la C18. A la esquerra es va utilitzar etapa de rentat al 40% i elució al 90% de MeOH. A la dreta etapa de rentat al 70% i elució al 90%. Corba de referència en tampó PBST amb 9% de MeOH (■), etapa de rentat 40% (▼) i etapa de rentat 70% (▲).

Amb els experiments realitzats anteriorment, es va establir el següent protocol (vegeu **Figura 5.2**): primera etapa de condicionament de les mini-columnnes amb PBS, tot seguit es va realitzar la càrrega de la mostra a la columna (1mL), després es realitza l'etapa de rentat que consisteix en 1mL de 70% MeOH, i, finalment, es va eluir la mostra amb 1mL al 90% de MeOH. Les fraccions eluïdes es van ajuntar i es van diluir amb PBS deu vegades. Finalment, es va realitzar la mesura amb l'ELISA **As147/hB_St-BSA** amb un 9% de MeOH.

HTS-C18-ELISA: protocol

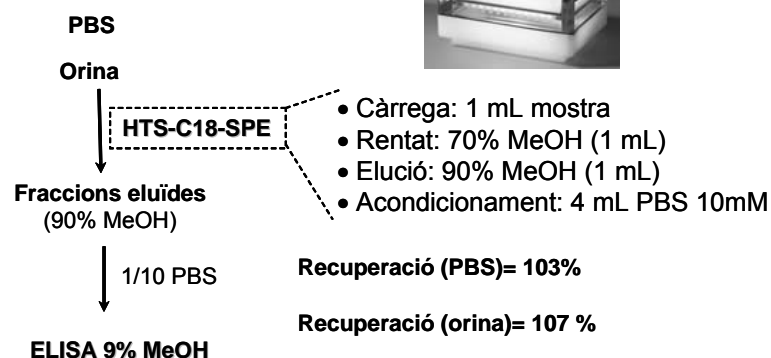


Figura 5.2 Protocol per al tractament de mostres d'orina amb el HTS-C18 de Versaplate™, abans de l'anàlisi de St per ELISA.

Amb aquest protocol es va poder determinar la quantitat de St lliure tan en PBS com en orina bovina. El LOD aconseguit per determinació de St lliure en orina bovina seguint

aquest protocol és de 0.75 µg/L, i el factor global de dilució de la mostra d'orina és de 10 vegades.

En el protocol anterior no es va tenir en compte que la gran majoria del St i els seus metabolits s'excreten en forma de conjugat a glucorònid i sulfat. Tal i com es mostra a la **Figura 5.3**, l'estanozolol es metabolitza dintre de l'organisme, en una primera fase per oxidació del compost en forma d'alcohol en determinats punts de la molècula (en aquesta figura es mostra el metabolisme que es produeix majoritàriament en animals bovins). Després, en una segona fase, es produeix la conjugació amb l'àcid glucorònid i amb sulfat, que és la millor forma d'excretar per l'orina aquest tipus de compostos tan hidrofòbics ²¹, ja que es transformen en compostos molt més polars.

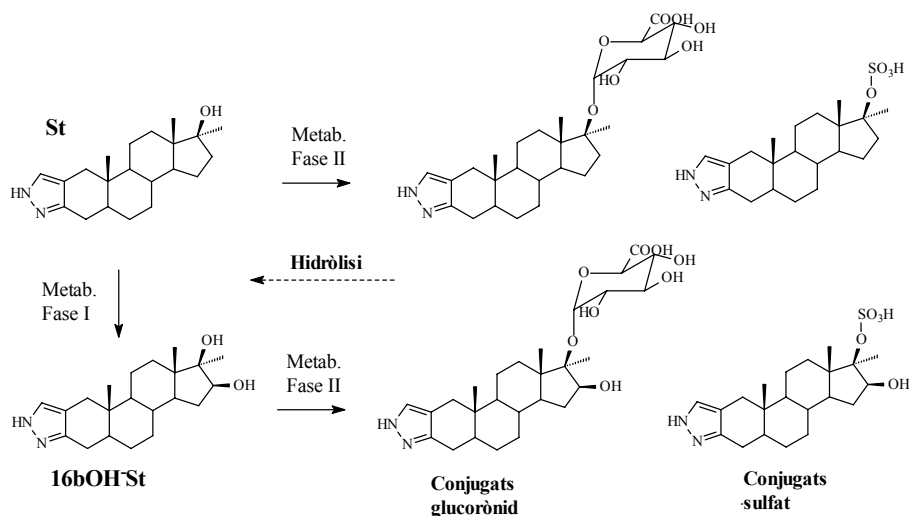
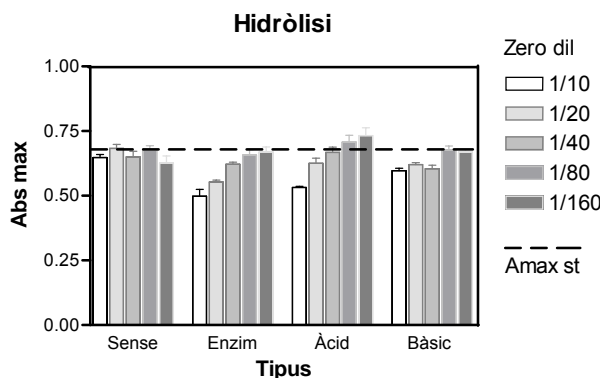


Figura 5.3 Metabolisme majoritari del St en animals bovins

Per aquest motiu es van avaluar diferents mètodes d'hidròlisi d'aquests conjugats. Es van estudiar procediments d'hidròlisi àcida, bàsica i enzimàtica, amb mostres d'orina control i seguidament es va aplicar a les mostres el protocol descrit anteriorment, per tal de veure l'efecte que aquests procediments podrien causar sobre la tècnica immunoquímica. A la **Gràfica 5.8**, es mostren els valors d'Amx obtinguts amb els eluats procedents de les diferents hidròlisis i després de dilucions successives.



Gràfica 5.8 Efecte matriu de les mostres d'orina a les que se'ls ha aplicat diferents tipus d'hidròlisi, i seguidament s'han purificat i analitzat amb el protocol HTS-C18-SPE-ELISA. Es mostren les Amax de la mostra eluïda i les seves diferents dilucions (respecte la mostra inicial).

Com es pot veure a la gràfica, independentment del mètode emprat per hidrolitzar, l'efecte matriu de l'orina hidrolitzada era superior a la de l'orina no hidrolitzada, tot i havent-se purificat per C18. En tots els casos, per tal d'eliminar aquestes interferències, s'havia de diluir l'eluat 8 vegades. Aquest factor de dilució, sumat al factor de dilució que s'empra al mètode de rentat de mostra amb C18, ens va quedar un factor de dilució de 80 vegades. Això, es va traduir en un empitjorament del LOD del protocol, que va quedar en aproximadament 6 µg/L. Aquest valor no complia els requeriments de qualsevol tècnica per a la mesura d'anabolitzants, que pel cas del St estava establert en 2 µg/L. Per tant, es va decidir estudiar un altra tipus de metodologia SPE per evitar les interferències produïdes per l'orina hidrolitzada.

5.1.3.2.3 Desenvolupament d'un protocol HTS-IS-SPE-ELISA per la detecció de St i metabòlits

La utilització d'anticossos com a fase d'extracció selectiva ha estat emprada amb diferents tipus de matrius, tant d'origen ambiental com d'origen biològic. Per tant, es va pensar en unir covalentment els anticossos específics contra estanozolol a un suport polimèric, i utilitzar-lo en forma de columna d'immunoafinitat. De la mateixa manera que anteriorment, donat el gran nombre de mostres a analitzar, es va pensar en un tipus de format que permetés el cribatge massiu de les mostres (HTS-IS-SPE), com ara el sistema

Versaplate descrit abans. Amb aquest objectiu ens vam proveir de mini-columnnes buides compatibles amb el Versaplate per omplir-les amb l'immunosorbent (IS).

A) Preparació de l'immunosorbent

Com a suport polimèric per HTS-IAC-SPE es va utilitzar la Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suècia) activada amb grups de N-hidroxisuccinimida (NHS). Per a la preparació del immunosorbent es va utilitzar la fracció d'IgG purificades per precipitació del **As145** (vegeu **Figura 5.4**) on els grups amino de les lisines lliures de l'anticòs reaccionaran amb el grups NHS per formar l'enllaç amida. L'elecció d'aquest antisèrum es va fer en base a la reactivitat mostrada per aquest anticòs respecte l'estanozolol, i el seu metabòlit majoritari en orina bovina, el 16 β -OHSt.

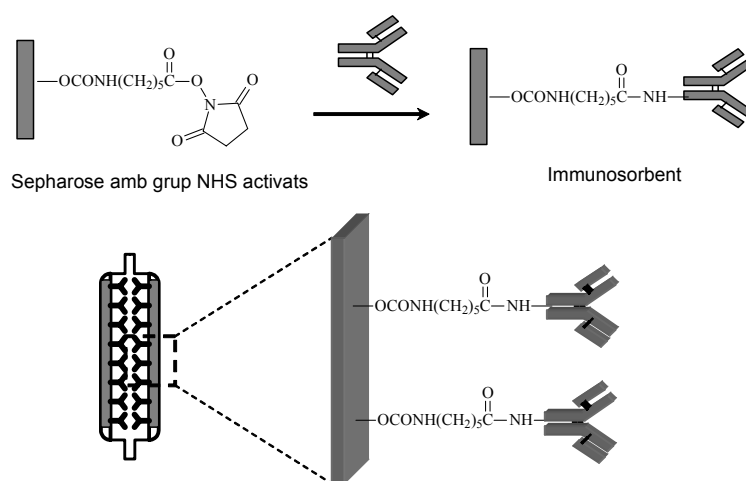
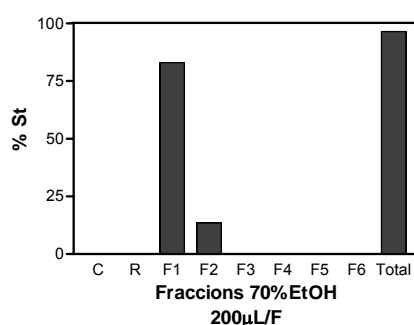


Figura 5.4 Representació esquemàtica de la preparació de immunosorbents

Així doncs, es va acoblar l'As145 purificat (26 mg) al suport de Sefarosa (5mL) amb un rendiment del 80%. Un cop obtingut l'immunosorbent en suspensió es va afegir sobre les mini-columnnes i es van empaquetar, de tal manera que va quedar llit de 0.2 mL (suposava uns 0.5mL de suspensió d'immunosorbent). Tenint en compte les IgG acoblades al suport (2.2 mg/columnna), que d'aquesta fracció d'IgG el 10% correspon a fracció específica, que l'anticòs té 2 punts d'unió amb l'analit, i que podríem fer una estimació que només el 50% de les IgGs estarien accessibles o amb una orientació adient per interaccionar amb l'analit, la capacitat teòrica de retenció seria de 0.48 μ g de St (1.45 nmols).

B) Avaluació de la retenció de les mini-IAC columnes

Estudis previs realitzats al laboratori sobre la millor forma d'eluir l'analit de les columnes d'immunoafinitat van donar com a resultat que la utilització d'un tant per cent d'etanol desorvia l'analit d'una manera neta i que l'eluat seria més fàcil de manipular^{171, 181, 182}. Només caldria una dilució en PBS per fer la mesura amb l'ELISA. Una altra avantatge seria l'estabilitat del suport polimèric amb l'etanol enfront de l'elució mitjançant un tampó àcid (segons el fabricant, l'estabilitat de la Sepharose només està garantitzada si es treballa entre pH 2 i 13). Així, doncs, varem optar per seguir un protocol emprat prèviament al laboratori i que consistia en una etapa de rentat amb PBS i l'elució amb un 70% d'etanol. Les mostres eluïdes es van mesurar amb l'assaig **As147/hB_St-BSA**, després de diluirles amb el PBS perquè el contingut d'etanol no superés el 10%.



Gràfica 5.9 Perfil d'elució d'una mostra de St en PBS a 10nM. Es mostren les fraccions de càrrega (C, 1mL), rentat (R, 1mL) i les fraccions d'elució (F, 200µL). Valors en % de St.

Així, es va preparar una solució de St en PBS (10 mM) i es va carregar a la mini-columna (1mL) amb un flux aproximat de 1 mL/min. Tal i com es mostra a la **Gràfica 5.9**, el St va eluir amb les dues primeres fraccions amb el tampó de elució (PBS al 70% d'EtOH). No es va observar que l'analit es desprengués de la mini-IAC ni en la etapa de càrrega i ni en la de rentat. La recuperació que es va obtenir amb aquest primer experiment va ser del 96.5%.

A continuació, es van fer passar per les mini-IAC, mostres dopades (1mL) amb nivells de concentració de St creixents (10nM, 100nM i 1µM). Les mini-IAC es van rentar amb PBS (1mL) i es van eluir amb 1mL de 70% d'EtOH. Els valors es mostren a la **Taula 5.2**.

Determinació d'HA en mostres biològiques

Es va observar un bona recuperació de cadascuna de les mostres als nivells fortificats, tot i a les concentracions més elevades.

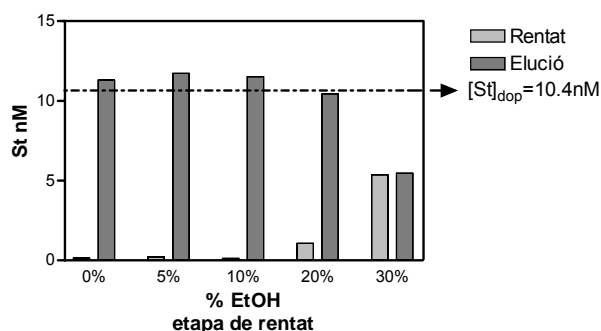
Taula 5.2 Mostres dopades tractades amb el mini-IAC i mesurades amb l'ELISA As147/hB St-BSA. Es mostren els % de recuperació.

Mostra dopada/ nM	Mesura mini- IAC-ELISA/ nM	% Recup.
10	10.0	100
100	120	120
1000	1178	117

D'aquestes dades també es pot extreure que la capacitat de la columna pot arribar fins al 1 nmol de St o més (recordem que el valor teòric va de de 1.4 nmol), i per tant el protocol immunoquímic podria analitzar mostres amb concentració de St al voltant de 0.91 µg/mL, una possibilitat molt superior a la que en un principi solen tenir aquestes mostres. Malgrat això, abans s'havia de comprovar que l'eficiència d'aquestes columnes es mantenia quan es passen mostres d'orina.

C) Avaluació de les etapes de rentat i elució

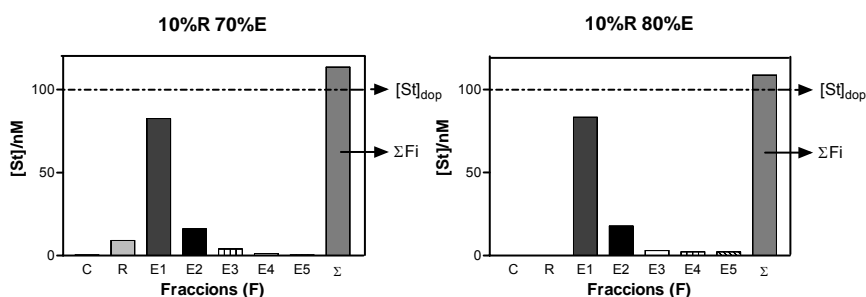
Donat que aquestes minicolumnes s'havien de fer servir per extreure St de mostres d'orina, semblava bastant obvi que seria necessari una etapa de rentat eficient per eliminar la majoria dels components de la matriu. Per aquest motiu es va avaluar el tan per cent d'EtOH màxim que es podria introduir a l'etapa de rentat sense que el St es desorvis. Per això, es va fixar l'etapa d'elució al 70% per extreure el St de diferents mostres dopades a una mateixa concentració (en aquest cas a 10nM, 1mL). A totes elles se'ls va aplicar el mateix procediment de purificació llevat de que l'etapa de rentat es va fer en cada cas amb un contingut diferent d'EtOH (0%, 5%, 10%, 20% i 30%). D'aquesta manera es van obtenir els valors que es representen a la **Gràfica 5.10**.



Gràfica 5.10 Elució de mostra de St a 10nM amb diferents % d'EtOH a l'etapa de rentat.

Tal i com es motra a la gràfica, les mini-IAC van retenir el St a la columna fins a un 10% d'EtOH a l'etapa de rentat. Quan es va pujar a un 20% d'EtOH, ja es va observar una certa desorció del St que corresponia a un 9% del que s'havia carregat. Aquesta pèrdua es podria assumir en cas que fos necessari l'ús d'aquesta proporció d'EtOH. També es va avaluar el 30% d'EtOH, però, en aquest cas, la desorció a l'etapa de rentat ja era del 50% del total de la càrrega. Arran d'aquests estudis, es va fixar inicialment l'etapa de rentat de la mostra amb un 10% d'EtOH.

Respecte de l'etapa d'elució, es va intentar concentrar l'elució del St augmentant el tant per cent d'EtOH. La raó d'aquest estudi era aprofitar les mini-IAC, no tan sols per la purificació de la mostra, sinó també com una manera de preconcentrar el St. Es va realitzar l'estudi, amb la càrrega d'unes mostres de St a 100nM (1mL), amb un rentat del 10% d'EtOH (1mL) i fent l'elució al 70 i al 80% d'EtOH. Les fraccions recollides van ser de 200 μ L i es van realitzar per ELISA, després de diluir-les 10 vegades amb PBS.

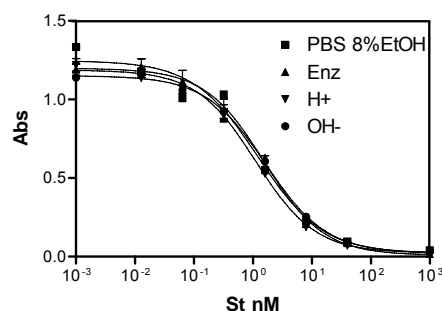


Gràfica 5.11 Perfils d'elució de la mostra de St(100nM, 1mL) variant el percentatge d'EtOH a l'etapa d'elució

A la **Gràfica 5.11**, es mostren els perfils d'elució a diferents percentatges d'EtOH. No es va observar una diferència apreciable en el comportament de la mini-IAC. Es va poder veure que a les primeres dos fraccions de 200 μ L, eluïa més del 90% de la mostra carregada, per tant es va fixar, com a volum de recollida de la mostra en 500 μ L, i com a tampó d'elució, el PBS amb un 80 % d'EtOH.

D) Efecte matriu de l'orina hidrolitzada bovina

Tal i com s'ha explicat amb anterioritat, l'estanozolol s'excreta en forma de glucorònid i/o sulfat, per tant, s'han d'hidrolitzar aquest tipus de compostos. Per tant, es van aplicar procediments d'hidròlisi àcida, bàsica i enzimàtica a diferents mostres d'orina obtinguda d'animals control. Un cop hidrolitzades les mostres, es van fer passar per les mini-columnes i es va aplicar el protocol anteriorment establert. Les fraccions d'elució es van diluir amb PBS 10 vegades i es van fer servir per estudiar l'efecte matriu en l'ELISA preparant corbes de calibratge i comparant-les amb la corba preparada en PBS-8% d'EtOH.



Gràfica 5.12 Efecte matriu de l'orina bovina hidrolitzada enzimàticament (\blacktriangle), àcida (\blacktriangledown) i bàsica (\bullet). Les corbes es van realitzar a partir de l'orina control eluïda al 80% i amb una etapa de rentat del 10% d'EtOH. Corbes realitzades al 8% d'EtOH amb l'assaig **As147/hB_St-BSA**.

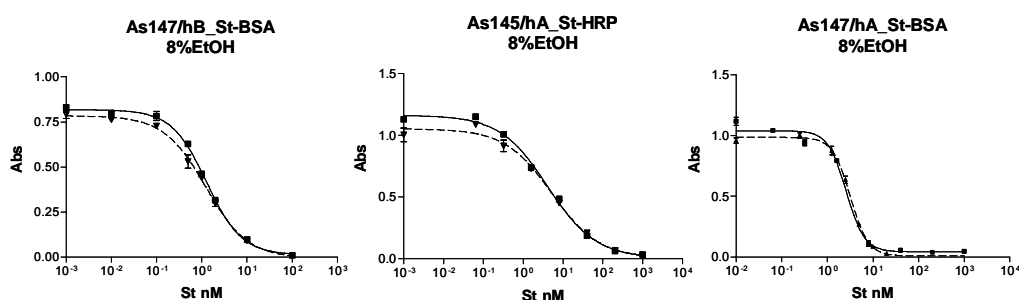
Independentment del mètode emprat per la hidròlisi no es va observar efecte matriu (vegeu **Gràfica 5.12**). Per tant, els immunosorbents han resultat ser excel·lents mètodes per extreure selectivament el St, completament lliure del components de la matriu que interferien amb l'ELISA. Per altra banda, qualsevol mètode d'hidròlisi dels conjugats semblava ser compatible amb el protocol establert.

Quan aquests protocols es van aplicar a mostres d'orina dopada (25 nM), es va observar que la mostra hidrolitzada enzimàticament es podia mesurar amb una bona recuperació (94 %), mentre que per les mostres que havien estat hidrolitzades en mitjà àcid o bàsic, no es va observar elució del St (vegeu **Taula 5.3**). L'explicació a aquest fet es podria trobar en la degradació del St en medis fortament àcids o bàsics. Així, en el cas de la hidròlisi àcida podríem pensar que hi hagués tingut lloc una eliminació de tipus E1 a C17. Respecte la hidròlisi bàsica, les condicions a les quals està sotmès el St podria haver produït algun tipus de reacció secundària que el fes irreconeixible per l'anticòs.

Taula 5.3 Mesura d'orines dopades amb St on es va aplicar el mètode d'hidròlisi corresponent i se li va aplicar el protocol de rentat de mostra mini-IAC-ELISA

Mètode d'hidròlisi	Orina dopada/ nM	Mesura mini-IAC-ELISA/ nM	
Enzimàtica		23.57	✓
Àcida	25	1.11	×
Bàsica		1.51	×

Així doncs, es va escollir la hidròlisi enzimàtica com la més convenient per realitzar l'anàlisi de l'estanozolol a l'orina amb el protocol immunoquímic establert. L'estudi de l'efecte matriu també es va realitzar en els altres assaigs desenvolupats per a la detecció de St. Segons es pot veure a la **Gràfica 5.13**, no es va observar efecte matriu apreciable provinent de l'eluat de les mostres eluïdes de les mini-IAC, en cap dels tres assaigs.



Gràfica 5.13 Efecte matriu de les mostres eluïdes amb el protocol mini-IAC, amb hidròlisi enzimàtica, amb els assaigs As17/hB_St-BSA, As145/hA_St-HRP i As147/hA_St-BSA. Les condicions de l'assaig van ser PBS 10mM, 0.005% de Tween 20, pH=7.5 i % d'EtOH 8%. Corba de referència (■, —), efecte matriu (▼, - - - - -).

E) Protocol general per a la determinació de St lliure i conjugat en orina bovina

Amb els experiments realitzats anteriorment, es va establir el protocol de determinació de l'estanozolol lliure i el conjugat en orina bovina (vegeu **Figura 5.5**). Per tal d'hidrolitzar els conjugats, les mostres (500µL) es dilueixen amb 500µL de tampó HAc/AcNa 0.1M pH=4.6 que proporciona el medi àcid necessari per realitzar la hidròlisi enzimàtica. S'afegeix l'enzim de β-glucoronidasa (2.5µL) i es deixa incubar a 37°C una nit. Les mostres hidrolitzades es carreguen a les mini-columnnes (condicionades amb 4mL de tampó PBS 10mM). Mitjançant el regulador de buit del sistema Versaplate, es regula un fluxe aproximat de 1mL/min. A continuació, es passa PBS amb un 10%EtOH (1 mL), com a etapa de rentat i tot seguit s'elueix amb PBS al 80% d'EtOH (1 mL). Els primers 500µL de l'etapa d'elució es recullen, i es dilueixen 10 vegades en PBS i s'afegeix la quantitat corresponent de Tween 20, fins a un 0.005% i es produeix a la mesura amb l'ELISA que correspongui.

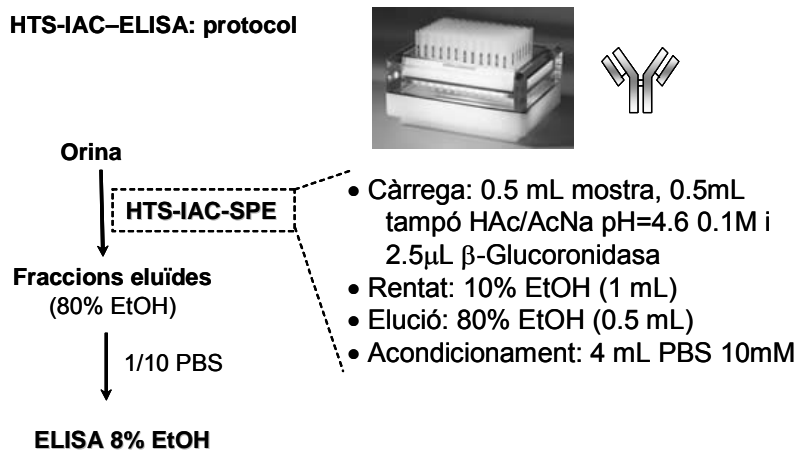


Figura 5.5 Protocol general per a la determinació de St lliure i conjugat en orina bovina

Amb aquest protocol és possible analitzar St amb tan sols 500 µL de mostra d'orina bovina. L'anàlisi es fa amb la mostra diluïda 10 vegades després de la purificació amb l'immunosorbent i respecte el volum d'orina inicial. Per tant els límits de detecció dels ELISAs són 10 vegades superiors als obtinguts en tampó. Els límits de detecció i l'interval de treball per mesurar estanozolol en orina bovina, per cadascun dels ELISAs desenvolupats es poden veure a la **Taula 5.4**. En tots els casos es va arribar a l'objectiu

necessari per tal de determinar el St segons les normatives de la UE, que estableix el MRPL per St a 2 µg/L.

Taula 5.4 Paràmetres característics del protocol de determinació de St mitjançant mini-IAC amb els diferents assaigs desenvolupats.

Orina bovina	As147/ hB St-BSA	As145/ hA St-HRP	As147/ hA St-BSA
LOD µg/L	0.19±0.06	1.26±0.48	0.50±0.33
Rang de treball µg/L	0.48±0.11	3.45±0.99	1.42±0.58
	11.68±1.7	110±13.11	38.28±5.67
IC₅₀ µg/L	2.36±0.41	19.70±3.60	7.42±1.07

F) Mesura de mostres reals d'orina bovina (“pool samples”)

Es va aplicar el protocol establert a les mesures de les mostres d'orina bovina amb els assaigs **As147/hB_St-BSA** i **As145/hA_St-HRP**. Per aquesta primera aplicació del mètode es van utilitzar les mostres anomenades “pool samples”, que eren mostres d'orina bovina provinents del tractament de vaques amb estanozolol. De 5 diferents punts de recollida de mostra després del tractament es va realitzar una mescla (pool) dels tres animals tractats (vegeu **apartat 9.3.3.2**). De la mateixa manera, s'havien preparat mescles de mostres d'orina d'animals control (P1-5), també mescla de tres animals no tractats als mateixos punts de recollida.

Taula 5.5 Resultat de l'anàlisi de mostres d'orina bovina (“Pool samples”) mesurades amb l'assaig **As147/hB_St-BSA** i **As145/hA_St-HRP**.

Mostra	Resultat* ²	As147/ hB St-BSA* ¹	As145/ hA St-HRP* ¹
P16	✓	1.180±0.61	16.14±2.78
P17	✓	2.31±0.26	24.39±3.21
P18	✓	0.82±0.20	17.84±2.29
P19	✓	0.42±0.11	4.06±0.97
P20	✓	0.43±0.26	8.30±2.22
P1-5	✗	-	-

*¹ Resultats en µg/L, valor mig i desviació de la mesura de tres rèpliques en diferents dies

*² Valoració qualitativa positiu(✓)/negatiu(✗) respecte l'absorbància al 90% d'inhibició (LOD)

Determinació d'HA en mostres biològiques

Segons les dades que es van obtenir i que es mostren a la **Taula 5.5**, les mostres P16-20 van donar positiu, amb una absorbància que estava per sota de la marcada per la IC₉₀, que és el LOD. Les mostres P1-5 van donar negatiu, és a dir, amb una absorbància superior o igual a la de la IC₉₀.

Segons es pot observar a la **Taula 5.5**, no hi ha correspondència entre els resultats de les anàlisis realitzades amb els assaigs **As147/hB_St-BSA** i **As145/hA_St-HRP**. Però, tenint en compte que l'estanozolol es metabolitza en fase I a l'espècie 16βOH-St, metabòlit majoritari en orina bovina, i sabent el valor de la reactivitat creuada d'aquest metabòlit en ambdós assaigs (2% per **As147/hB_St-BSA** i 53% per **As145/hA_St-HRP**) és possible corregir aquests valors i expressar-los com equivalents d'immunoreactivitat de 16βOH-St. Per realitzar aquest conversió, es va tenir en compte la reactivitat creuada del 16βOH-St en cadascun dels assaigs amb el 8% d'EtOH al tampó de competència (vegeu **apartat 4.2.6**). Per tant, corregint els valors obtinguts amb els assaigs en termes d'equivalents de 16βOH-St es van obtenir els valors que es mostren a la **Taula 5.6**.

Taula 5.6 Mesures de les mostres P16-20 amb els assaigs **As147/hB_St-BSA** i **As145/hA_St-HRP** expressades en equivalents d'immunoreactivitat de St i 16βOH-St

Mostra	As147/ hB_St-BSA* ¹		As145/ hA_St-HRP* ¹		GC-MS* ⁴	
	St	16βOH-St* ²	St	16βOH-St* ³	St	16βOH-St
P16	1.180±0.61	61.92±32.36	16.14±2.78	33.85±5.81	0.22	25
P17	2.31±0.26	121.518±13.98	24.39±3.21	51.17±6.75	0.46	93
P18	0.82±0.20	43.40±10.61	17.84±2.29	37.42±4.80	0.16	71
P19	0.42±0.11	22.18±5.81	4.06±0.97	8.52±2.04	-	9
P20	0.43±0.26	22.76±13.75	8.30±2.22	17.42±4.65	-	19
P1-5	-	-	-	-	-	-

*¹ Resultats en µg/L, valor mig i desviació de la mesura de tres rèpliques en diferents dies

*² Resultats en equivalents d'immunoreactivitat de 16βOH-St, basats en la reactivitat creuada de 16βOH-St en **As147/hB_St-BSA** amb 8%EtOH (2%).

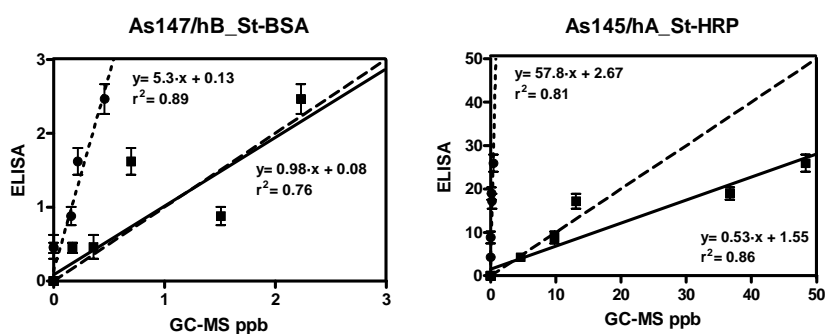
*³ Resultats en equivalents d'immunoreactivitat de 16βOH-St, basats en la reactivitat creuada de 16βOH-St en **As145/hA_St-HRP** amb 8%EtOH (50%).

*⁴ Resultats en µg/L, mostres realitzades pel laboratori de referència RIVM

Aquests valors van ser contrastats amb els valors obtinguts pel Laboratori de Referència de la UE (Institut RIVM, *Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu*, Bithoven,

Holanda) el qual va analitzar les mateixes mostres amb un mètode de referència validat, concretament per GC-MS. Les dades es poden observar a la **Taula 5.6**.

Una anàlisi més acurada de les dades obtingudes mostren un millor quantificació de l'assaig As147/hB_St-BSA respecte l'assaig As145/hA_St-HRP. Un cop que les dades obtingudes a partir del GC-MS i transformades en valors d'immunoreactivitat d'estanozolol (vegeu **Gràfica 5.14**), es va observar que l'assaig As147/hB_St-BSA millorava la seva correlació entre les dades obtingudes per GC-MS i les mesurades amb l'ELISA (pendent de 0.98). Per altra banda, en el cas de l'assaig As145/hA_St-HRP, la correlació no era tan bona (pendent de 0.56). Però, en ambdós casos es veu una gran diferència quan només es té en compte el St a quan es considera que hi ha 16bOH-St. En ambdós casos, es va observar un error que es reflecteix en el valor de la r^2 , però, s'ha de tenir en compte que només es disposava de cinc punts per realitzar aquest estudi. Actualment s'està realitzant el perfil d'excreció dels animals tractats amb St i la seva validació per LC-MS-MS, que ens proporcionarà informació addicional respecte l'exactitud i la precisió del mètode.



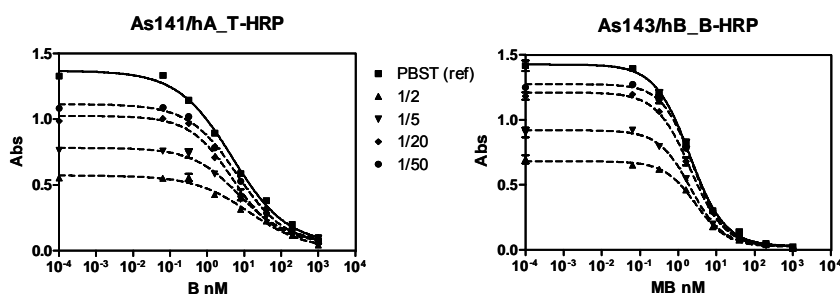
Gràfica 5.14 Correlació entre mesures de GC-MS i ELISA, tenint en compte només el St (●) i la suma de St i 16bOH-St (■).

5.2 Determinació de B i MB en mostres d'orina bovina mitjançant IAC

5.2.1 Avaluació de la matriu

Es va avaluar l'efecte que produiria l'orina bovina als assaigs optimitzats **As141/hA_T-HRP** per B, i **As143/hB_B-HRP** per MB.

De la mateixa manera que passa amb l'estanozolol, la B i la MB s'excreten majoritàriament en forma de glucorònid i/o sulfat ⁵⁶. Per tant, calia una etapa prèvia d'hidròlisi d'aquests conjugats per a la determinació total dels anabolitzants. Per aquest motiu, es va avaluar directament l'orina hidrolitzada als assaigs per a la determinació de B i MB. Aprofitant l'experiència acumulada amb l'estudi dels mètodes d'hidròlisi de l'orina bovina per la determinació de St (vegeu **apartat 5.1.3.2.2**), es va decidir emprar una hidròlisi de tipus enzimàtica mitjançant la β -glucuronidasa.



Gràfica 5.15 Efecte matriu de l'orina bovina hidrolitzada enzimàticament a l'assaig As141/hA_T-HRP per B, i l'assaig As143/hB_B-HRP per MB. Es mostra la corba de referència en PBST i l'orina amb el seu corresponent factor de dilució (1/i).

Com en els anterior casos que es va avaluar l'efecte matriu de les orines, i es va observar un gran efecte matriu (vegeu **Gràfica 5.15**). El factor de dilució que s'hauria d'aplicar per evitar l'efecte matriu produït per l'orina seria superior a 50. Amb aquest factor de dilució, el LOD per la detecció de B i MB en orina bovina hidrolitzada seria de 7.5 i 3.75 $\mu\text{g/L}$, respectivament, i per tant l'assaig no compliria amb els requeriments estipulats per la CE. Recordeu que tal com s'ha mencionat a la introducció (vegeu **apartat 1.1.8.2.2**) la CE exigeix que per aquests compostos prohibits les tècniques analítiques deuen tenir uns

nivells de detectabilitat mínims definits com MRPLs. Així, doncs, a l'igual que per St s'hauria de pensar en una etapa prèvia de purificació de mostra per tal de minimitzar l'efecte matriu de la mostra i així complir la normativa establerta per la CE. Degut als bons resultats que en el cas del St van donar les columnes d'immunoafinitat, es va proposar aquest procediment com a SPE per rentar la mostra i minimitzar l'efecte matriu.

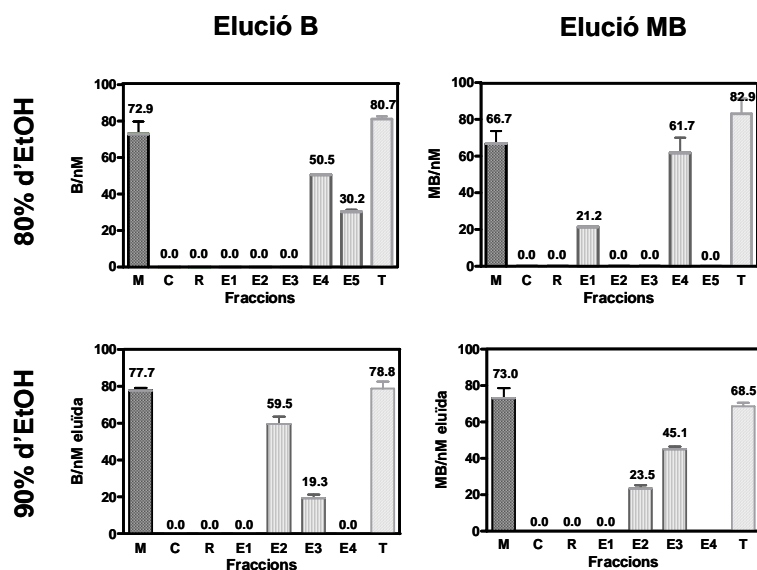
5.2.2 Preparació de l'immunosorbent

Per a la preparació de l'immunosorbent es van seleccionar els antisèrums heteròlegs As140 i As141 ja que reconeixien tant la B com la MB. Ja s'ha comentat amb anterioritat el comportament dual d'aquest antisèrums. En un primer pas es va purificar l'As141 per precipitació amb $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ per tal d'eliminar les albúmines del sèrum. Com a suport sòlid per l'immobilització de les IgG es va fer servir una columna de Sepharosa™ HiTrap activada amb grups NHS (lilit de 1 mL). L'immobilització de les IgG a la sefarosa es va realitzar per enllaç covalent entre les lisines lliures de les IgGs amb els grups NHS del suport polimèric. L'acoblament es va realitzar segons les instruccions del subministrador, aconseguint una eficiència d'acoblament del 70%.

5.2.3 Caracterització dels IS. Optimització, de IS-SPE mitjançant mostres de PBS.

Per tal d'obtenir el perfil d'elució es van dopar mostres, tant de B com de MB, en PBS i se'ls hi va aplicar un protocol que consistia en una càrrega de 1 mL de mostra, seguit d'un rentat amb 1 mL al 10% d'EtOH. Inicialment es va estudiar quina proporció d'EtOH era la més adient per l'elució de B i de MB. Un cop eluïdes les mostres dopades es van diluir 10 vegades en PBS, i es van mesurar amb l'ELISA corresponent per B i per MB. Tal com es pot observar a la **Gràfica 5.16**, amb un 80% d'EtOH l'elució de la B es produïa entre E4 i E5 (fraccions de 0.5 mL), mentre que per la MB sortia majoritàriament en la fracció E4. Es va considerar que feia falta un volum massa gran d'EtOH/PBS al 80% per eluir la B i la MB. Per tant, es va provar d'augmentar el percentatge d'EtOH fins al 90%. D'aquesta manera es va aconseguir l'elució de la B i de la MB entre les fraccions

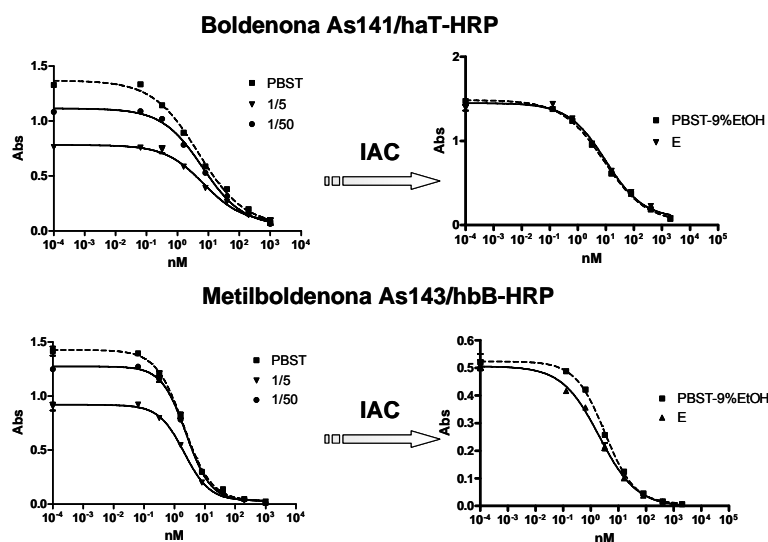
E2 i E3, i per la MB entre les fraccions E2 i E3. D'aquesta manera, es va obtenir un percentatge de recuperació per la B 101 ± 2.5 i per la MB de 94 ± 4.3 .



Gràfica 5.16 Perfil d'elució de B i MB (1 mL de càrrega a 70 nM en PBS) amb la columna d'As141.

5.2.4 Efecte matriu de l'orina hidrolitzada per SPE-IS-ELISA per B i MB

En aquest cas a 1 mL d'orina, se li va afegir 1 mL de tampó acetat i 5 μ L de β -glucuronidasa i es va deixar incubar a 37°C durant tota la nit. A continuació es va aplicar el protocol anteriorment descrit, però amb la diferència que la càrrega era de 2 mL. La recollida de mostra va ser de 1mL al 90% d'EtOH, que correspon a la segona i tercera fracció. Amb aquestes fraccions, un cop eluïdes, es va avaluar l'efecte matriu de l'orina hidrolitzada en els corresponents assaigs per B i MB.



Gràfica 5.17 Efecte matriu de l'orina hidrolitzada quan es realitza la purificació per IAC As141. La corba Ref, és la realitzada en PBST/9%EtOH. E es considera la mostra eluïda diluïda 10 vegades en PBS. 1/i dilució de l'orina en PBS.

Tal i com es mostra a la **Gràfica 5.17**, l'efecte matriu produït per l'orina a l'assaig s'ha eliminat totalment, després de passar la mostra per l'IS As141. Aquests resultats indiquen que es pot utilitzar els IS per purificar les orines hidrolitzades abans de mesurar B i MB per ELISA.

5.2.5 Protocol general per a la determinació de B i MB mitjançant IS-ELISA

El protocol general, tal i com es mostra a la **Figura 5.6**, utilitza 1 mL d'orina al que se li afegeix 1 mL de tampó acetat (0.1M, pH=4.6) més 5 µL de β-glucuronidasa. Aquesta mescla es deixa incubar durant tota la nit a 37°C. Al dia següent es porta la mescla a pH=7.5, i es carrega a la columna IS As 141. Les etapes de càrrega, rentat i elució es van realitzar amb un flux constant de 1mL/min aproximadament. Després de la càrrega, es procedeix amb una etapa de rentat de la mostra amb un 10% d'EtOH en PBS. Es recullen les fraccions segona i tercera, de 0.5 mL cadascuna, eluïdes amb el 90% d'EtOH en PBS. Les mostres eluïdes es van diluir 10 vegades amb PBS i es van mesurar mitjançant els corresponent ELISAs per B i MB.

Boldenona-Metilboldenona

SPE-IAC-ELISA: protocol

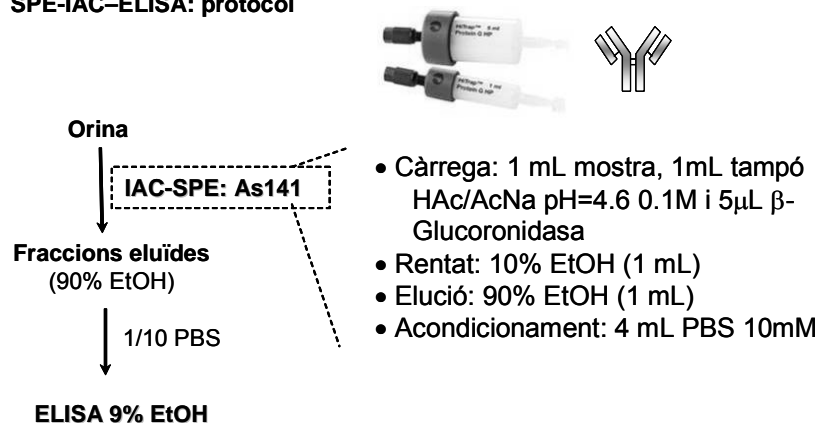
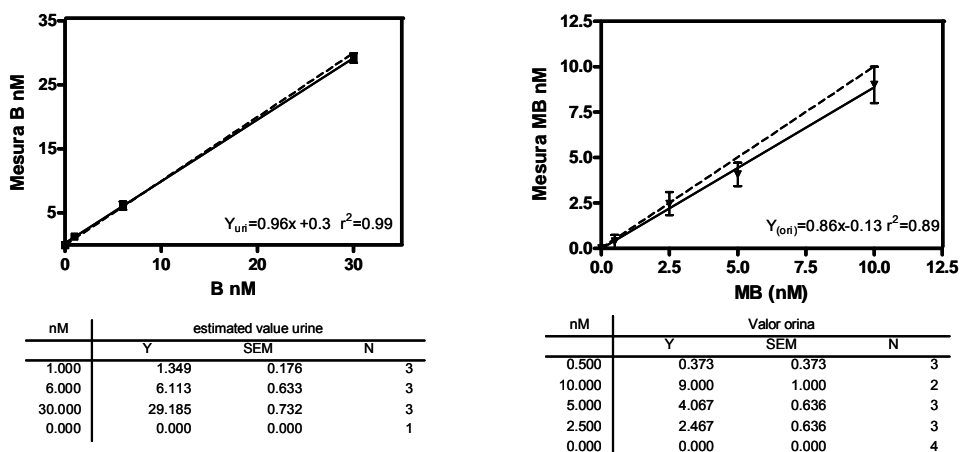


Figura 5.6 Protocol general per a la determinació de B i MB en orina bovina.

D'acord amb els resultats de l'estudi de l'efecte matriu, i tenint en compte el factor de dilució aplicat per mesurar les fraccions eluïdes per ELISA, es van aconseguir els següents límits de detecció en orina bovina hidrolitzada de $2.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ per la B, i de $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; per la MB.

5.2.6 Estudis d'exactitud per B i MB en orina amb el protocol SPE-IS-ELISA

Es van dopar diferents orines com si es tractessin de mostres cegues. Les mostres les va preparar una persona aliena a l'experiment. Un cop dopades se'ls hi va aplicar el protocol anteriorment descrit, obtenint els resultats que es veuen a la **Gràfica 5.18**.

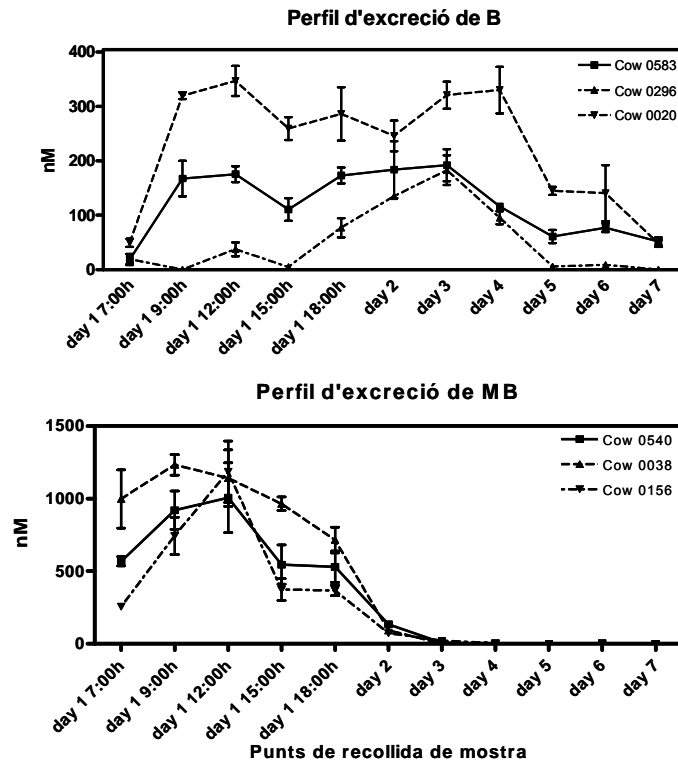


Gràfica 5.18 Estudi d'exactitud del protocol per a la purificació per IAC de l'orina hidrolitzada per a la detecció de B i MB.

Tal i com es pot observar, en el cas de la B es va veure una bona correlació entre la concentració dopada i la mesura de després d'aplicar el protocol de purificació amb una r^2 de 0.99 i un pendent de 0.96. En el cas de la MB, es va observar una lleugera subestimació amb un pendent de 0.86 i la correlació no va ser tant bona, amb una r^2 de 0.89. En qualsevol cas, aquests resultats indicaven que el procediment IS-SPE-ELISA per la MB tenia una recuperació superior al 80%, pel que es va considerar que era apte per mesurar aquest analit en mostres d'orina bovina.

5.2.7 Mesura de mostres reals de B i MB

Un cop establert el protocol per a l'anàlisi immunoquímic tant per B com per MB en orines d'origen boví mitjançant SPE-IS-ELISA, es va procedir a la mesura de mostres reals procedents d'animals tractats amb B i MB. En aquest cas l'objectiu era veure el perfil d'excreció d'aquests anabolitzants un cop tractat l'animal. Es van mesurar mostres d'orina de tres animals diferents (vegeu **apartat 9.3.3.2**). Les anàlisis es van fer per triplicat. Per donar validesa a l'anàlisi, es va incloure una sèrie de *controls* d'orina dopats amb una concentració coneguda, i uns *blancs*, que correspondrien a animals no tractats.



Gràfica 5.19 Perfil d'excreció de B i MB mesurat amb IAC-ELISA

Els resultats que es van obtenir van ser els que es mostren a la **Gràfica 5.19**. Tal i com es pot observar, la boldenona va ser excretada, des del primer moment (dia 1 7:00h) i al llarg de 4 dies, majoritàriament. Aquest comportament es va observar en dues de les vaques (*cow* 0583 i 0020) que van ser tractades amb boldenona, en canvi, una d'elles (*cow* 0296) va excretar nivells molt baixos durant les primeres hores, començant a augmentar al final del dia 1 i arribant al màxim d'excreció el dia 3.

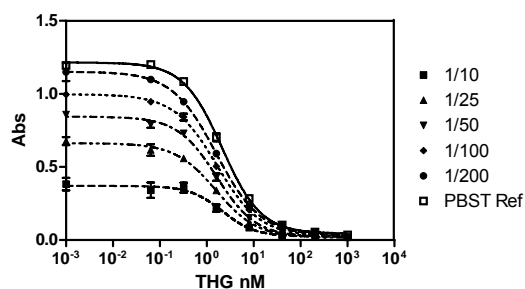
Respecte al perfil d'excreció de la MB, es va poder observar un comportament diferent al de la boldenona. Durant el primer dia després de la inoculació de la MB, aquest anabolitzant es va eliminar de l'hoste d'una manera molt ràpida, trobant-se altes concentracions de MB, entre les 7:00 i les 12:00 h. La davallada durant la resta d'hores va ser força important, de tal manera que els nivells d'excreció el dia 2 són només aproximadament un 3% del que s'havia excretat durant les primeres hores del dia. Al cap de quatre dies no es van trobar concentracions que estiguessin dintre del nostre interval de

treball. En aquest cas totes tres vaques es van comportar d'una manera molt similar. Actualment aquests resultats estan pendents de ser validats mitjançant cromatografia de gasos acoblada a un espectròmetre de masses.

5.3 Determinació de THG en mostres d'orina humana

5.3.1 Avaluació de l'efecte matriu

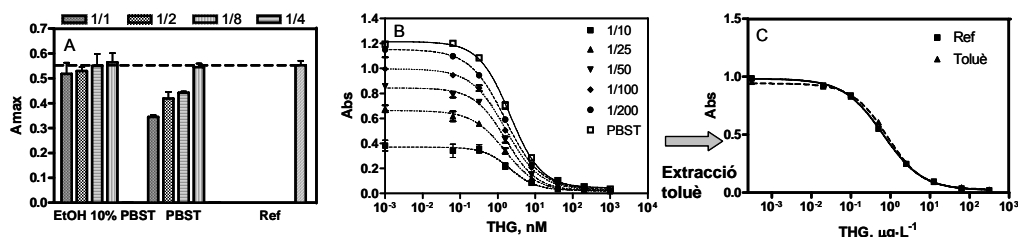
Una possible aplicació de l'assaig és la mesura de la THG en mostres d'orina humana. Tal i com s'ha comentat anteriorment a la introducció, la THG és un anabolitzant esteroïdal, que com a tal, s'analitza normalment a l'orina. Per tant, es va decidir en una primera instància, avaluar les possibles interferències d'una matriu com l'orina humana a l'assaig. Es va preparar una orina representativa barrejant mostres de diferents persones (amb una quantitat equivalent d'homes i dones) que no haguessin estat en contacte amb aquest esteroide. Es van preparar les corbes de calibratge de la THG amb aquesta matriu i també amb diferents dilucions de l'orina, i es va dur a terme l'assaig. Tal i com es pot observar a la **Gràfica 5.20**, a l'igual que amb els altres assaigs, l'orina humana afecta significativament a l'assaig. Per realitzar una mesura directe de la THG en orina humana, sense cap tipus de tractament, s'hauria de diluir unes 200 vegades en PBS per tal d'obtenir una mesura fiable. Per tant, el LOD associat a la detecció de THG mitjançant aquest assaig en orina humana estaria al voltant de 10 ppb, i per tant aquest mètode resultaria inviable per poder realitzar control de dopatge.



Gràfica 5.20 Efecte matriu produït per orina humana en l'ELISA per THG **As170/hG-BSA**. S'indica a la dreta les dilucions de l'orina en PBS i la de referència.

5.3.2 Avaluació d'un procediment d'extracció per eliminar l'efecte matriu

Donat l'important efecte matriu que produïa l'orina humana a l'assaig As170/hG-BSA, es va pensar en un tractament fàcil i ràpid per eliminar les interferències de l'orina. L'experiència acumulada amb la mesura de St, B i MB en orines, ja sigui d'origen boví o humà, suggeria una extracció en fase sòlida, com podien ser la fase reversa o els immunosorbents. Però, en aquest cas, es va pensar en una estratègia alternativa. Aquesta consistia en l'extracció amb toluè de la THG. Després d'una etapa d'assecat, es resuspendria el residu en tampó per a la mesura directa amb l'ELISA desenvolupat. Així doncs es va procedir a avaluar aquest procediment. L'extracció es va realitzar sobre 1 mL d'orina control humana (orina recollida com a l'**apartat 5.1.2**) a la qual se li va afegir 0.5 mL de toluè. Aquesta operació es va repetir dues vegades per tal d'assegurar el màxim de recuperació possible. A continuació, es van ajuntar les fraccions orgàniques i es van evaporar per corrent de nitrogen. La reconstitució de la mostra extreta es va provar amb el tampó de l'assaig (afegint 0.5 mL de PBST) o bé amb 0.5 mL d'EtOH i diluint-la 10 vegades amb PBS, per a continuació afegir la quantitat corresponent de Tween 20 i mesurar. Tal i com es pot observar a la **Gràfica 5.21**, l'Amax es va fer servir per recollir informació sobre l'efecte matriu que produïa l'extracció i la reconstitució. Es va veure que hi havia efecte matriu quan es reconstituïa amb PBST i no quan primer es redissolia en EtOH i després es diluïa 10 vegades en PBS. Per tant, es va escollir aquest últim com a mètode per extreure la THG. També es va comprovar que l'efecte matriu no variava la detectabilitat de l'assaig (vegeu **Gràfica 5.21, C**). Tal i com es pot observar a la gràfica hi ha hagut una total eliminació de l'efecte matriu amb aquest simple procediment d'extracció i sense cap etapa de purificació.



Gràfica 5.21 A) Representació de l'efecte matriu respecte a Amax amb el diferents tipus de reconstitució. B) Efecte matriu observat en diluir la mostra en PBS. C) Efecte matriu observat després de l'extracció amb toluè i posterior reconstitució en EtOH i dilució en PBS.

Per tal d'avaluar l'extracció amb toluè, es van dopar mostres a diferents nivells de concentració i se'ls va aplicar el protocol anteriorment descrit. D'aquesta manera es va poder calcular la recuperació de la THG mitjançant l'ELISA **As170/hG-BSA** amb un 10% d'EtOH. Segons es pot veure a la **Taula 5.7**, es va obtenir una recuperació del 87.1 ± 0.2 , que va ser considerat vàlid per continuar endavant amb l'extracció.

Taula 5.7 Mostres dopades de THG en PBS, s'indica la recuperació del protocol d'extracció amb toluè.

THG nM	Mesura THG nM* ¹	% Recup.
10 nM	8.76 ± 2.78	87.6
50 nM	43.33 ± 2.11	86.7
100 nM	87.16 ± 2.02	87.2
Total		87.1 ± 0.2

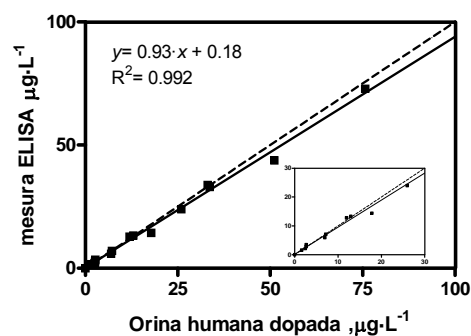
*¹ N=3

5.3.3 Estudis d'exactitud per la determinació de THG en orina humana

Un cop que es va eliminar l'efecte matriu i que es va avaluar la recuperació, es va procedir a la determinació de l'exactitud. Tres persones alienes a l'experiment van dopar mostres d'orina humana control a diferents nivells de concentració. A aquestes mostres se'ls va aplicar el protocol d'extracció amb toluè, i a continuació les mostres es van mesurar amb l'assaig **As170/hG-BSA** amb un tampó que contenia el 10% d'EtOH. A la **Gràfica 5.22**, es mostren els resultats obtinguts per la determinació de THG en aquestes mostres d'orina humana. Tal i com es pot veure, es va observar una bona correlació entre els valors mesurats i els valors dopats, amb un pendent de 0.93 amb un error R² de 0.992.

Determinació d'HA en mostres biològiques

Per tant, podem concloure que el mètode immunoquímic desenvolupat pot ser útil pel cribatge de mostres d'orina humana provinents d'esportistes que potencialment hagin pogut utilitzar aquesta hormona.



Gràfica 5.22 Mesura de les mostres d'orina humana amb l'ELISA As170/hG-BSA (N=14).

5.3.3.1 Protocol general per a la determinació de THG en orina humana

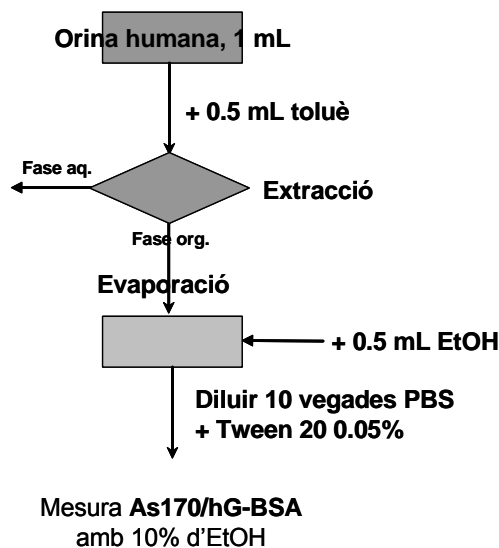


Figura 5.7 Protocol general per a la determinació de THG en orina humana.

D'aquesta manera es va establir un protocol general per a la determinació de THG en orina humana. El protocol general, tal i com es pot veure a la **Figura 5.7**, utilitza 1 mL d'orina humana a la que se li fa una extracció amb 0.5 mL de toluè. S'agita i es centrifuga. Un cop ben separades les fases, es torna a repetir l'extracció anterior. S'ajunten les fases orgàniques i s'evaporen sota un corrent de nitrogen. Quan s'ha assecat l'extracte, es redissolte en 0.5 mL d'EtOH i es dilueix 10 vegades en PBS. Se li afegeix la quantitat corresponent de Tween 20 i es mesura amb l'assaig As170/hG-BSA

amb un 10% d'EtOH. Aquest protocol permet la determinació de THG amb un considerable augment de la detectabilitat. El LOD establert en aquest assaig per l'anàlisi de THG en orina humana és de $0.25 \pm 0.14 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, un valor que està per sota de les exigències de la WADA. Estudis posteriors hauran d'anar adreçats a comprobar si aquest mètode també és útil per l'anàlisi de mostres d'orina un cop hidrolitzada.

6 Disseny racional, preparació i avaluació de polímers d'empremta molecular per testosterona i boldenona

En aquest capítol s'abordan noves estratègies per a la producció racional de polímers d'empremta molecular (*MIP, Molecular Imprinted Polymer*) pel reconeixement específic d'hormones esteroidals com la testosterona i la boldenona. Per tal de dissenyar racionalment els MIPs es van emprar mètodes computacionals per poder establir la millor interacció entre potencials monòmers i la molècula motlle, que en aquest cas va ser la testosterona. A més, per tal d'establir el clúster del conjunt de monòmers i molècula motlle es van utilitzar valoracions per RMN, les quals ens poden donar informació sobre la constant d'associació i l'estequiometria del complex format a través del canvi en el desplaçament químic dels àtoms involucrats en la interacció monòmer:molècula motlle.

En base als resultats obtinguts amb el disseny racional es van preparar els MIPs i la seva avaluació es va realitzar mitjançant anàlisis cromatogràfic, és a dir, utilitzant el polímer preparat com a fase estacionària i acoblat a un sistema cromatogràfic com l'HPLC. La

diferència a la retenció dels diversos compostos entre el polímer amb empremta i el polímer blanc ens va donar l'especificitat d'aquest tipus de fase.

6.1 Modelatge molecular i càlculs teòrics

Es van emprar eines de modelatge molecular assistides per ordinador, per obtenir informació sobre la geometria molecular i la naturalesa de la interacció entre la molècula motlle i els potencials monòmers. Així, doncs, es va calcular la conformació de mínima energia per a la molècula motlle, la testosterona, i per als diferents grups funcionals que interaccionaran amb la testosterona. Un cop obtingudes les conformacions de mínima energia es van calcular les entalpies de formació dels diferents complexos (ΔH_{Tm}), resultants de la interacció entre els monòmers amb diferents grups funcionals i la testosterona. Si s'exclouen les interaccions hidrofòbiques, la testosterona només presenta dos funcionalitats capaces d'interaccionar amb altres compostos, com ara el grup hidroxil 17 que pot actuar com acceptor i donador d'hidrogen, i el grup cetònic α,β -insaturat que actua com a fort donador d'hidrogen i presenta una forta polarització permanent i induïda.

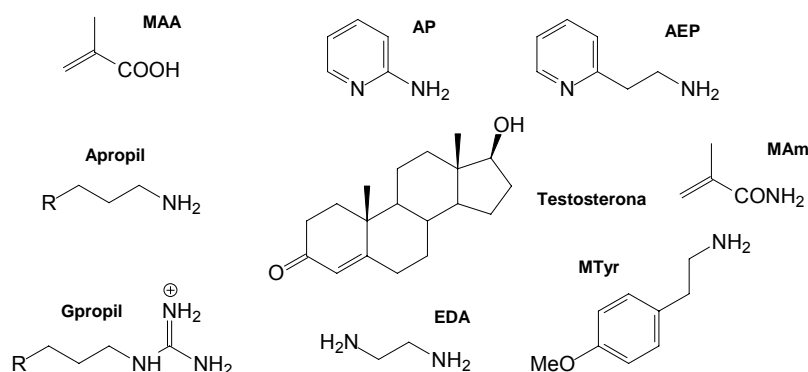


Figura 6.1 Estructures químiques de la testosterona i dels monòmers model utilitzats

Ja que els monòmers han de presentar unes funcionalitats complementàries a les de la molècula motlle es van escollir substàncies amb un grup àcid (àcid metacrílic, MAA) i altres compostos amb grups amino amb diferents graus de basicitat (2-aminopiridina, AP; 2-(2-aminoetil)-piridina, AEP; etilendiamina, EDA; metoxitiramina, MTyr; 3-aminopropil grup, Apropil i 3-guanidinopropil grup, Gpropil; vegeu **Figura 6.1**).

Entre els possibles models computacionals utilitzats per estudiar diferents compostos químics, es va decidir emprar els models semiempírics, ja que en considerar explícitament els electrons de valència de cada àtom, aquest permeten descriure amb gran aproximació les interaccions dipolar, els ponts d'hidrogen i els dipols induïts al apropar dos molècules a distància atòmica.

Existeixen diferents aproximacions semiempíriques possibles, de les quals es va escollir el model PM3, desenvolupat per Stewart ¹⁸³, que, bàsicament, consisteix en la reparametrització de les funcions del nucli respecte al model AM1 desenvolupat per M.J.S. Dewar ^{184, 185}, i que descriuen millor els sistemes amb ponts d'hidrogen i sistemes amb nuclis no enllaçats però que es troben a curta distància, com passa quan s'estudien agregats moleculars.

Pel que fa a l'estratègia de càlcul emprada, es va decidir de considerar que les molècules es trobaven al buit, ja que suposaria una complicació en el càlcul el fet de considerar un medi amb unes propietats determinades. En tots els casos es van prendre els valors corresponents a la conformació de mínima energia, la qual es va determinar mitjançant una recerca sistemàtica per a la localització de les zones i dirigida per la definició precisa del mínim.

El paràmetre que es va utilitzar per l'estudi de la interacció dels monòmers amb la testosterona va ser l'entalpia de reacció de formació de l'agregat molecular que es calcula a partir de les entalpies de formació dels reactius (testosterona, ΔH_T , i dels monòmers, ΔH_m) i de l'agregat format (ΔH_{Tm}), segons la reacció:

$$\Delta\Delta H_r = \Delta H_{Tm} - (\Delta H_T + \Delta H_m)$$

La testosterona, com es pot observar a la **Figura 6.1**, és una estructura relativament senzilla respecte les seves propietats geomètriques i electròniques, i, tal i com es podia preveure, només es va observar interacció entre els monòmers i la testosterona en les dues posicions més característiques de la testosterona, com són el grup cetònic de la posició 3 (T-O³) i el grup hidroxil de la posició 17 (T-OH¹⁷).

Taula 6.1 Valor de l'entalpia de reacció (ΔH°_r) entre les diferents posicions de la testosterona (OH^{17} i O^3) amb els diferents grups funcionals.

Compost	$\Delta H^{\circ}_r(\text{T-OH}^{17})$ Kcal/mol	$\Delta H^{\circ}_r(\text{T-O}^3)$ Kcal/mol
MAA	-2.60	-3.80
Apyr	-4.76	-1.01
AEPyr	-5.83	-2.91
EDA	-7.38	-2.52
MTyr	-7.82	-3.25
Apropil	-7.47	-3.62
Gpropil	-6.23	-7.20

Els valors trobats respecte a la interacció entre cada monòmer amb els diferents grups funcionals de la testosterona es troben a la **Taula 6.1**. Aquests valors mostren que la interacció més forta es va establir amb el grup hidroxil a C-17 ($\text{OH}(17)$) amb les substàncies que contenen grups amino, sent la MTyr la que va establir una interacció més forta. Les diferències no van ser prou significatives respecte de les interaccions entre els compostos model de monòmer amb el grup cetònic de la posició 3 ($\text{CO}(3)$, vegeu **Figura 6.2** un exemple de la interacció que s'estableix entre monòmer:testosterona), excepte pel grup funcional guanidil que va mostrar un valor de ΔH_r molt superior.

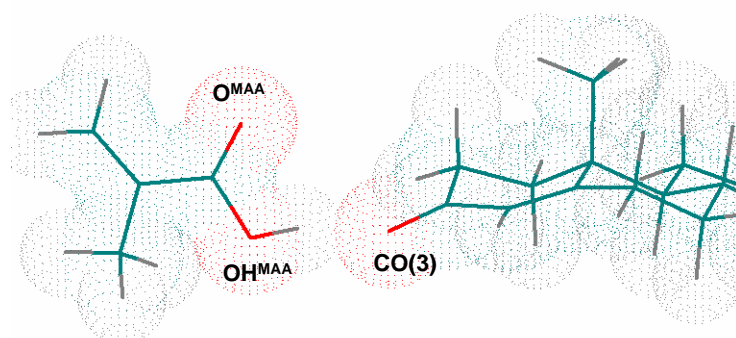


Figura 6.2 Zona d'interacció entre MAA i el grup cetònic 3 ($\text{CO}(3)$) a partir dels càlculs teòrics.

Tot i que es van trobar aquests valors, no s'haurien de considerar d'una manera absoluta, ja que els càlculs es van realitzar en el buit, això vol dir que altres molècules com ara el dissolvent no interfereixen en la interacció. Aquesta situació no és real ja que aquests

tipus de molècules han d'interactuar amb el medi d'interacció, com ara el dissolvent. Per aquest motiu aquest tipus d'estudis teòrics no són del tot complets, per tant, i amb l'objectiu de completar la informació, es van realitzar una sèrie d'experiments per tal d'avaluar la interacció d'aquests monòmers en solució. Això va poder ser possible mitjançant experiments de valoració per ressonància magnètica nuclear (RMN).

6.2 Estudis Experimentals per RMN

La utilització de la ressonància magnètica nuclear esdevé una poderosa eina per a l'estudi de les interaccions entre compostos químics en solució. Els desplaçaments químics (i altres paràmetres com ara la constant d'acoblament), dels àtoms d'hidrogen i carboni de la molècula depenen de l'entorn i les condicions on es realitza la mesura com ara la naturalesa del solvent, la concentració de la mostra i l'estat d'agregació molecular. Degut a que els senyals de RMN, en un sistema en ràpid intercanvi respecte al temps d'observació de la RMN, són una mitjana ponderada per la fracció molar entre totes les espècies intercanviables de la mostra, es pot extreure informació sobre aspectes termodinàmics i cinètics dependent de l'entorn de la molècula analit. Emprant metodologies estàndard de RMN, es pot avaluar l'afinitat relativa entre la molècula motlle i els monòmers (experiments de valoració per RMN), definir la zona de interacció i l'estequiometria de l'agregat molecular final (Job's plot per RMN)^{186, 187}. D'aquesta manera ens pot donar una idea de les proporcions relatives i la naturalesa dels reactius per tal d'obtenir el complex més estable.

6.2.1 Experiments de valoració per RMN

A la **Figura 6.3** es mostren les zones d'interacció de la testosterona amb els potencials monòmers, de manera que a través de la RMN es poden observar variacions dels desplaçaments químics ($\Delta\delta$) dels àtoms involucrats en la interacció. Els àtoms amb els quals es va monitoritzar la interacció amb la testosterona van ser el H4, el qual ens donarà un idea com interacciona el grup CO(3), i el H17 ja que aquest es veurà afectat d'una manera significativa amb la interacció dels monòmers amb el grup OH(17).

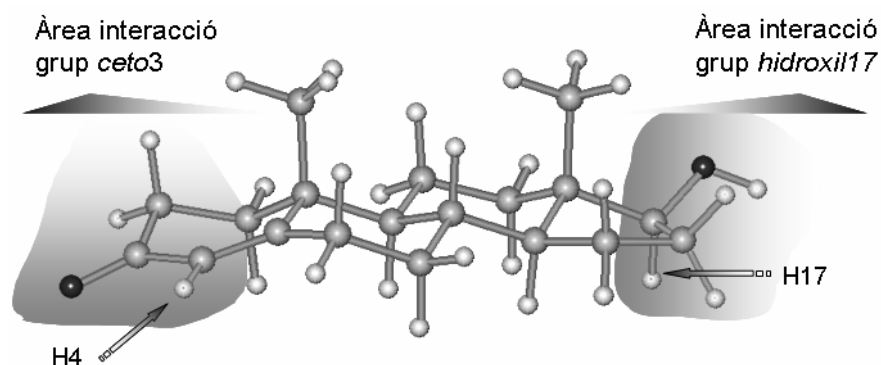
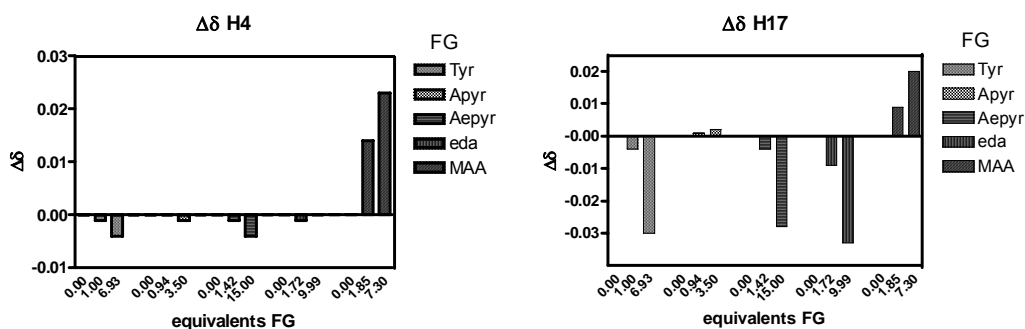


Figura 6.3 Estructura de la testosterona on s'indica l'àrea que es veurà afectada quan el monòmer interaccioni amb la testosterona i els àtoms amb els quals es monitoritzarà el canvi de desplaçament químic.

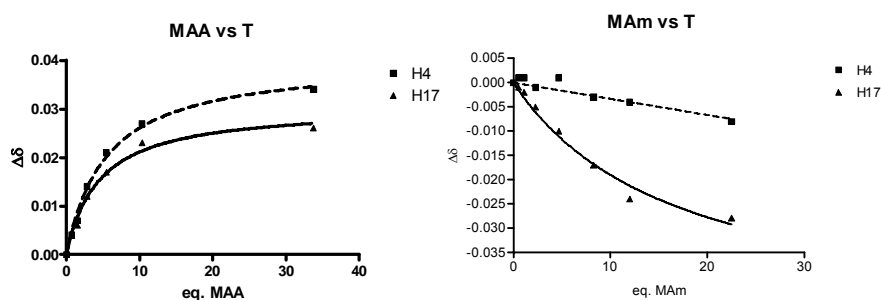
Per tal de realitzar un primer cribatge de com afecta cadascun dels monòmers model sobre la molècula motlle, es van mesurar el canvi de desplaçament químic dels àtoms involucrats en la interacció monòmer:testosterona, fent servir dues concentracions diferents de monòmer en presència de la testosterona. El solvent escollit per a la realització dels experiments va ser el CDCl_3 , solvent apròtic apolar que facilita la solubilització dels compostos a estudiar i que pot millorar les interaccions monòmer:testosterona que es poden establir.

Tal i com es pot observar a la **Gràfica 6.1**, els monòmers models els quals estaven funcionalitzats amb un grup amino van donar un baix efecte a la zona de CO(3), en canvi, al contrari del que s'havia vist amb els càlculs teòrics, es va veure una bona interacció del MAA amb aquesta zona. Per altra banda, el MAA va donar una resposta similar amb l'hidrogen 17, el qual ens donava la informació de la interacció entre monòmer i molècula motlle amb OH(17). Es va poder observar també, l'efecte que produïen amb els monòmers amb grups amino, molt més significatiu en el cas d'amines unides a una cadena saturada.



Gràfica 6.1 Variació dels desplaçaments químics ($\Delta\delta$) dels hidrogens en posició 4 (H4) i 17 (H17) de la testosterona front dels monòmers model.

Una anàlisi més acurada de la interacció entre la testosterona i els monòmers que es podrien utilitzar (un d'àcid, MAA; i un bon acceptor-donador d'hidrogen, metacrilamida, MAm) va resultar de les isoterms que es poden veure a la **Gràfica 6.2**. Tal i com es va poder comprovar anteriorment, el grup amida només té un efecte sobre el grup OH(17), mentre que CO(3) no es va veure afectat pel aquest grup funcional. Per altra banda, en el cas de MAA, tant en el grup OH(17) com pel grup CO(3) es va observar una isoterma tipus Langmuir. Donat aquest tipus de comportament es va escollir el MAA com a monòmer de reconeixement per la T.



Gràfica 6.2 Isoterms corresponents a la valoració per RMN de la testosterona (T) amb el MAA (esquerra) i la MAm (dreta). Els valors de $\Delta\delta$ corresponen a H4 (■) i H17 (▲) en ppm.

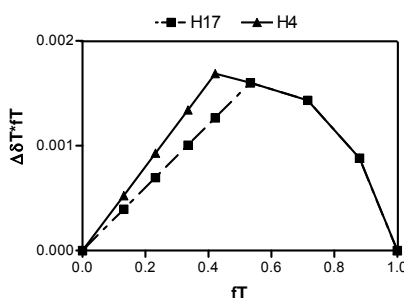
Com es pot observar a la **Gràfica 6.2**, va ser possible ajustar una isoterma de formació del complex a partir de les dades experimentals obtingudes, en la qual el MAA interacciona amb la testosterona. A partir d'aquestes dades es pot obtenir la concentració de monòmer requerit per obtenir el complex molecular més adient. Per trobar aquesta

concentració es va fixar que el complex més estable estaria sobre el 66% de la saturació de la isoterma, valor que correspon a la K_d , que surt de l'ajust de les dades experimentals a una corba de isoterma d'adsorció. En aquest punt s'igualen l'increment al complex format amb un increment de concentració del monòmer, per tant, a partir d'aquest punt queda una proporció més gran d'excés de monòmer lliure que només contribuirà a augmentar el nombre de grups funcionals lliure no organitzats i en conseqüència de interaccions no específiques. Per tant a partir d'aquest valor es va trobar que per H4 eren necessaris 8 equivalents de MAA pel grup CO(3). De la mateixa manera, per H17 es va trobar que el nombre d'equivalents necessaris per a la formació del complex en aquesta part de la molècula, era de 6. Així, doncs, es va poder saber la quantitat de monòmer mínim necessari per a la formació del complex MAA-Testosterona. Per tant, es va escollir una proporció de 1:8, T:MAA, per a la preparació del MIP.

6.2.2 Ajust de Job per RMN

Així com els experiments de valoració ens van donar informació sobre la interacció entre els monòmers i la molècula motlle, de manera que es pot deduir els grups funcionals que intervenen en la interacció i l'afinitat entre ambdós compostos, i, de manera quantitativa, l'excés de monòmer que es requereix per tal que es formi el complex. Aquest tipus d'experiment no proporciona cap informació sobre l'estequiometria de l'agregat format. Per aquest propòsit es va decidir dur a terme l'ajust de Job per RMN, metodologia emprada per determinar l'estequiometria de complexos moleculars. En aquest tipus de experiments es representa la fracció molar d'un dels compostos mantenint constant la concentració molar total de les espècies involucrades. D'aquesta manera es troba un màxim a la corba obtinguda, el qual correspon a l'estequiometria del complex format.

En aquest cas, tal i com es pot veure a la **Gràfica 6.3**, la resposta màxima va ser a 0.5 de fracció molar, que vol dir que existeix una estequiometria entre T i MAA 1:1.



Gràfica 6.3 Ajust de Plot per a la Testosterona i MAA

6.3 Preparació del MIP per testosterona

Amb els resultats obtinguts a través dels càlculs teòrics i amb els experiments de RMN es va poder establir la concentració més adient per a la preparació de MIPs per testosterona. La proporció escollida per a la formació del complex va ser de 1:8, T:MAA. En paral·lel es va preparar el polímer blanc o NIP (*non-imprinted polymer*), que consisteix a realitzar el polímer en les mateixes condicions que el MIP, però en absència de la molècula motlle i que s'utilitza com a referència, ja que presenta les mateixes propietats com a material, excepte en les generades per la presència de la molècula motlle. Per tant, és de suposar que les interaccions no específiques seran similars i les diferències observades entre els dos polímers es poden atribuir a un fenomen de reconeixement específic.

Com a agent reticulant per a la construcció de la xarxa tridimensional que rigidificarà i fixarà el complex format entre T i MAA, es va escollir l'EGDMA (dimetacrilat d'etilenglicol). La proporció d'aquest agent reticulant es va fixar en 24 equivalents, donat que és una proporció suficient per a la construcció de la xarxa tridimensional i que pugui englobar tot el complex format entre T i MAA. Aquest valor s'obté a partir de la geometria prevista pels models computacionals de l'agregat molecular i de l'agent reticulant. Com que es pretén congelar l'estructura de l'agregat molecular dins d'una xarxa polimèrica formada per l'agent reticulant, seria necessari, com a mínim una quantitat capaç d'envoltar tota la superfície de l'agregat molecular. La proporció necessària es pot avaluar a partir de la comparació entre la superfície exposada a l'agregat respecte la superfície de contacte del reticulant. Una forma d'aproximar aquests valors consisteix a considerar com a superfície de contacte, la superfície de la caixa que inclou l'agregat

molecular. Com que l'agent reticulant pot recobrir l'agregat per qualsevol de les cares de la caixa es considera la superfície promig per cara i es compara amb la de l'agregat, resultant una proporció de 1 a 24, aproximadament.

A través dels estudis per RMN es va poder veure que hi havia una bona interacció entre T i MAA quan el medi era CDCl_3 . Per tant, per tal de mimetitzar els estudis realitzats per RMN es va decidir utilitzar com a porogen el CHCl_3 . Estudis realitzats anteriorment al laboratori van aconsellar que el volum per a la realització de la polimerització era de 2mL per gram de mescla de prepolímer. Això suposa que al polímer final el volum dels porus formats seran aproximadament del 66% del volum total. Aquest volum buit és suficient per assegurar una gran superfície de contacte entre el material i el medi, i al mateix temps, rigidesa suficient per a ser utilitzat com a fase estacionaria en sistemes cromatogràfics.

En aquest cas es va realitzar una polimerització tèrmica utilitzant com a iniciador, un reactiu estàndard com és l'AIBN (2,2'-azobisisobutironitril). Les condicions de polimerització van ser de 60°C durant 24h, temperatura i temps suficient perquè tingui lloc la polimerització i la formació d'un polímer cuit i rígid (vegeu **Figura 6.4**). La polimerització es va realitzar en absència de O_2 , el qual interfereix en el procés de polimerització radicalària.

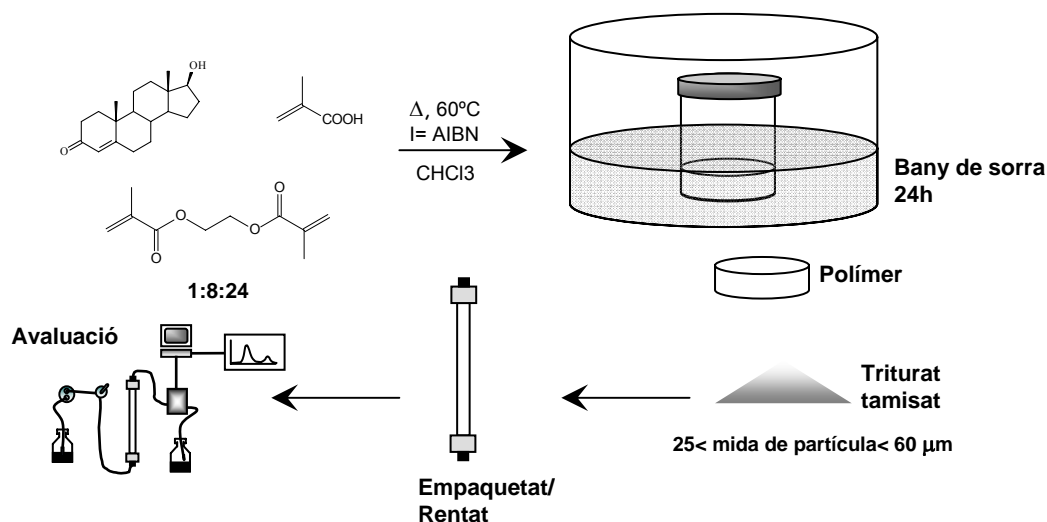


Figura 6.4 Representació esquemàtica de la preparació dels polímers d'empremta molecular per testosterona.

Un cop obtinguda una massa compacta es va triturar i tamisar fins a obtenir una pols homogènia de polímer amb partícules d'entre 25-60 μm , mida adient per a la realització de l'avaluació del polímer en columna. Per tant, es van empaquetar els polímers en columnes de vidre Ommifit®, per al seu posterior rentat i avaluació.

Per tal d'obtenir les cavitats de reconeixement específic per la testosterona, era necessari el rentat de la fase selectiva que encara incloïa la molècula motlle. Per aquest propòsit es van realitzar una sèrie de rentats amb ACN, MeOH i MeOH:HAc 80:20, per tal d'assegurar la completa eliminació de la molècula motlle del polímer. De totes maneres l'absència de sangrat de la T es va comprovar per HPLC-UV. Un cop rentat i empaquetat el polímer es va procedir a la seva avaluació.

6.4 Avaluació del MIP per testosterona

Existeixen diferents metodologies per a l'avaluació dels MIPs com ara la determinació de la constant d'afinitat (K_a), la utilització com a fase d'extracció selectiva o com a fase cromatogràfica. La K_a es pot calcular a través d'una sèrie d'experiments, que poden ser estàtics o dinàmics. Respecte als tipus d'experiments estàtics, es mesura la quantitat de molècula motlle que s'uneix al MIP en condicions d'incubació, és a dir, la molècula

motlle dissolta en un solvent i posada en contacte directe amb el MIP. Per altra banda, estan els assaigs dinàmics, que majoritàriament es realitzen a través de cromatografia frontal, en la qual s'utilitza el MIP com una columna i se li van passant solucions de concentració constant de la molècula motlle. D'aquesta manera es poden obtenir perfils d'elució de la molècula motlle depenent de la concentració que s'injecta. Respecte els assaigs basats en l'extracció selectiva, es carreguen diferents concentracions de la molècula motlle i a través d'una etapa de rentat i una altre d'elució, es mesura la quantitat recuperada a l'etapa d'elució. En quan a la utilització dels MIPs com a fase cromatogràfica, el MIP s'empaqueta dins d'una columna cromatogràfica i un cop condicionada amb el solvent més adient, se li injecta la molècula motlle i es mesura el seu temps de retenció.

Aquesta última estratègia, per la seva simplicitat, va ser escollida per a l'avaluació del polímers preparats. Per tant, per simple comparació entre el temps de retenció obtingut entre la injecció en la columna MIP i NIP es podria observar si hi ha una retenció específica per part del MIP respecte a la molècula motlle, el que indicaria que hi ha una interacció específica entre l'analit i la cavitat produïda per la molècula motlle. El factor de capacitat (K_i) es va utilitzar com a paràmetre indicatiu de l'afinitat del polímer i es va calcular utilitzant el temps de retenció de l'acetona, marcador del volum mort de la columna. El ACN va ser escollit com a fase mòbil per a l'avaluació cromatogràfica.

Segons es pot observar a la **Figura 6.5**, es va veure un comportament diferencial quan injectaven la molècula motlle al MIP o al NIP. El fet que quan es va injectar la testosterona al MIP tingués un temps de retenció més gran que al NIP, indicava que hi havia un reconeixement específic de la testosterona per part del MIP.

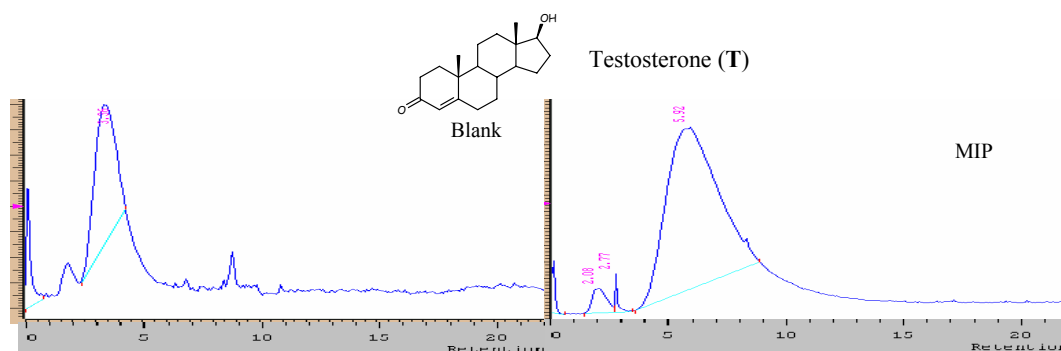


Figura 6.5 Cromatogrames corresponents a la injecció de testosterona al MIP i NIP.

Durant repetides injeccions el polímer es va seguir comportant de la mateixa manera. Segons es pot veure a la **Taula 6.2**, el temps de retenció de la testosterona va romandre constant.

Taula 6.2 Factor de capacitat (K_i) i el factor de selectivitat (α) pels diferents esteroids injectats al MIP/NIP preparats.

Compound	MIP		NIP		K_{iT}/K_{iN}^*
	K_i	α	K_i	α	
Testosterona	2.74±0.14	1	1.03±0.03	1	2.66
Boldenona	3.11±0.08	1.03	1.27±0.05	1.23	2.45
Progesterona	0.80±0.02	0.25	0.45±0.02	0.43	1.96
Estrona	0.69±0.02	0.17	0.38±0.02	0.31	1.82
Estanozolol	0.22±0.03	0.04	0.35±0.03	0.34	0.63

* K_{iT} , K_i de la testosterona, K_{iN} , K_i dels altres esteroids
N=30 injeccions

Per a l'estudi de la selectivitat del polímer es van injectar una sèrie d'estructures esteroidals relacionades amb la testosterona, com ara altres anabolitzants com la boldenona (B) i l'estanozolol (St). Tal i com es pot veure a la Figura 6.6, la boldenona és un compost molt similar a la testosterona excepte que té un doble enllaç adicional a $\Delta^{1,2}$. En el cas de l'estanozolol, a part de l'anell de pirazole A', conté un grup metil a C17 α . També es va injectar un progestagen, com la progesterona (P), on aquest compost conté la mateixa estructura a l'anell A, però amb la diferència que en comptes del grup OH(17) de la T, la P té un grup metilcetona. Un altre estructura esteroidal injectada va ser l'estrone (E1), compost estrogènic on la seva estructura es pot veure a la **Figura 6.6**.

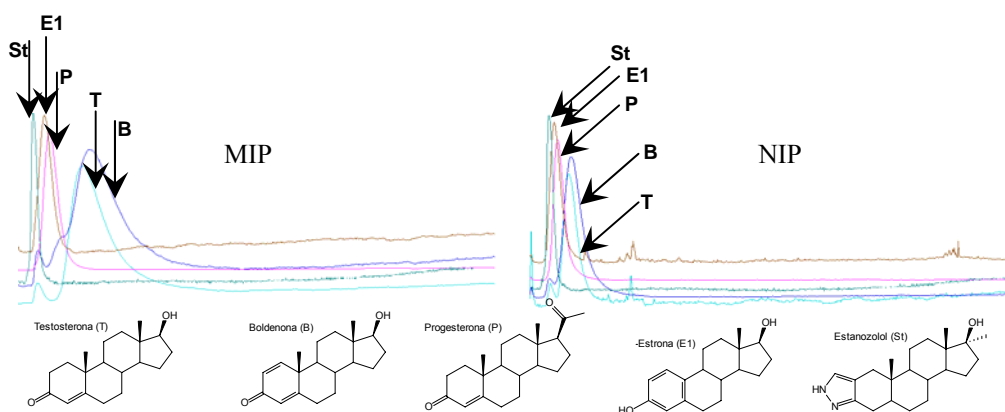


Figura 6.6 Cromatogrames superposats corresponents a l'injecció dels diferents esteroides al MIP i NIP. Es mostren les estructures químiques de la T, B, P, E1 i St

Segons es pot observar de la **Figura 6.6**, els esteroides St, E1 i P tenen un comportament similar tant en el MIP com el NIP. Per altra banda, el reconeixement de la boldenona per part del MIP va ser molt similar al de la testosterona. No és sorprenent, si tenim en compte que la B i la T només es diferencien en l'enllaç $\Delta^{1,2}$ addicional. Els punts d'interacció que s'estableixen entre la B i la cavitat específica són gairebé similars a la de la T, el que explica el reconeixement de la B pel polímer preparat amb T com a molècula motlle.

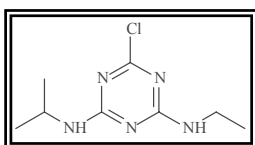
El comportament d'aquests compostos va ser reproduïble tal i com s'observa a la **Taula 6.2**, on es poden apreciar la mitjana i la desviació estàndard dels valor de K_i de 30 injeccions. Aquestes dades indiquen que el polímer preparat és robust. Respecte de la selectivitat, es va veure un reconeixement específic de la T i B, respecte dels altres esteroides injectats.

7 Apèndix I: Aproximació al desenvolupament d'un Microarray per a la detecció d'Atrazina.

En aquest apèndix es descriu el treball realitzat durant una estada de tres mesos al grup de treball de Biotecnologia Evolutiva del Departament de Biologia Cel·lular de la Universitat Tècnica de Munich, a Freising, Alemanya (*Arbeitsgruppe Evolutionäre Biotechnologie, Lehrstuhl für Zellbiologie, Technische Universität München*), grup dirigit pel Prof. Berthold Hock i el Dr. Karl Kramer. L'objectiu últim era poder arribar a contruir un microarray per la detecció d'hormones anabolitzants basada en l'ús d'anticossos recombinants. Però, donat les dificultats que aquest objectiu planteja si es parteix de zero, varem proposar que el treball a realitzar durant la meua estància es basaria en fer una primera aproximació a aquest sistema però utilitzant anticossos recombinants d'atrazina, amb el quals el grup ja tenia experiència. En aquest cas s'utilitzarien anticossos recombinants expressats amb un marcador d'histidina (*His-tag*).

7.1 Introducció

7.1.1 Utilització i problemàtica de l'Atrazina



L'atrazina és un herbicida de la família de les triazines, les quals s'han emprat indiscriminadament durant les últimes dècades. La seva activitat és la d'inhibir la fotosíntesi de les anomenades males herbes. Donada la seva persistència al mediambient, aquest tipus de compostos es poden acumular tant en aigües subterrànies com en sediments, aigües superficials i inclús arrossegades per l'aigua de pluja. Per aquest motiu, tant als EEUU com a la CE es consideren indicadors primaris de contaminació d'aigües. Per aquest motiu es van regular la concentració d'aquest compostos a l'aigua de consum, per exemple la CE a través de la [Directiva 98/83/EC](#) s'estableix un límit de $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, mentre que la [EPA](#) als EEUU, la fixa en 3 ppb ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Els mètodes més utilitzats per a la detecció d'aquest compost són les tècniques cromatogràfiques, ja sigui GC a amb detector de nitrogen i fòsfor (GC-NPD) o espectrometria de masses (GC-MS), com per HPLC-MS¹⁸⁹⁻¹⁹¹.

7.1.2 Microarray amb anticossos

La tecnologia microarray permet l'anàlisi simultània de diferents paràmetres en un sol experiment. Els paràmetres que es poden arribar a mesurar poden ser a milers. Aquesta tecnologia consisteix en la immobilització de microtaques organitzades en columnes i files sobre una superfície sòlida que s'exposarà contra les mostres que tenen l'analit i l'element de reconeixement biològic. Els sistemes de detecció poden estar basats en fluorescència, quimioluminescència o electrocoquímica. Històricament aquest tipus de tecnologia s'ha emprat en genòmica, on els microarray de DNA s'han convertit en una eina essencial en la interpretació de seqüències de DNA involucrades en l'expressió gènica^{192, 193}.

Els desenvolupament de microarrays basats en proteïnes, i concretament utilitzant anticossos, han crescut darrerament tant en l'àrea de la proteòmica com de diagnosi¹⁹⁴⁻¹⁹⁶.

Molts dels microarrays basats en anticossos aprofiten els avantatges que s'obtenien amb l'ELISA però sobre suport sòlid.

7.1.3 Estudis previs del grup

En treballs anteriors realitzats al laboratori s'havien preparat anticossos recombinants contra l'atrazina, un herbicida freqüentment utilitzat. Els anticossos recombinants consistien en fragments Fab expressats amb un fragment Strep-tag II a l'àcid carboxílic terminal del domini constant (vegeu **Figura 7.1**).

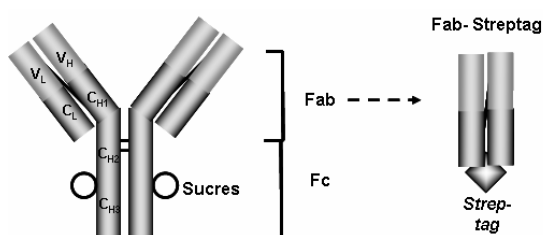


Figura 7.1 Representació d'un anticòs, i del correponent fragment Fab, el qual s'ha expressat amb un fragment de Strep-tag II

La preparació d'aquests anticossos provenia d'una estratègia *phage-display* on a partir del vector fagèmid pCANTAB 5E es va arribar al vector pASK99¹⁸⁸, el qual expressava els anticossos recombinants Fab contra l'atrazina. A través d'aquest vector es va produir l'anticòs recombinant IPR-7. Els anticossos IPR-23 i IPR-53 provenen de l'evolució molecular induïda al IPR-7. Com a resultat de la producció d'aquests anticossos i la seva posterior avaluació per ELISA, es van obtenir unes corbes de competència amb valors de compressos entre 2 i 60 µg/L (vegeu **Figura 7.2** i la taula inclosa) i amb perfils de reactivitat creuada definits, tal i com es pot observar a la gràfica de barres que es mostra a la **Figura 7.2**. Els valors de IC₅₀ obtinguts per IPR23 i IPR53 donaven a entendre que l'evolució molecular induïda havia produït anticossos amb un major afinitat per l'analit.

Apèndix I

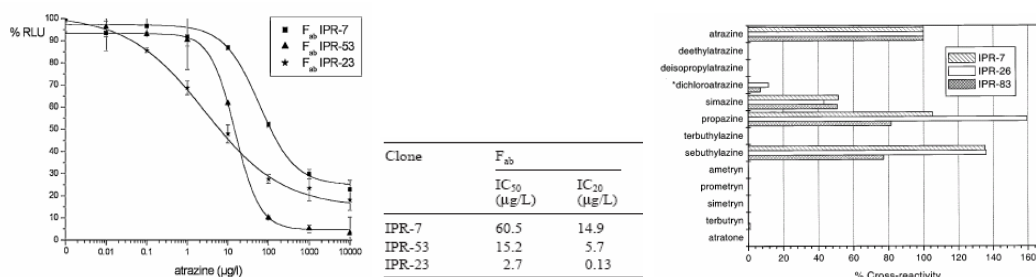


Figura 7.2 A l'esquerra, corbes de competència dels anticossos recombinants produïts IPR-7, IPR-23 i IPR-53. A la part central s'indiquen la detectabilitat dels assaigs obtinguts amb la figura de l'atrazina. A la dreta, el perfil de reactivitat creuada dels assaigs.

La constant d'afinitat determinada pel sistema BIAcore 2000, va proporcionar uns valors de K_D de $1.12 \cdot 10^{-9}$ M per IPR-23, i de $2.73 \cdot 10^{-8}$ M per IPR-7, el que va corroborar la millora obtinguda mitjançant inducció evolutiva.

7.1.4 Objectius

L'objectiu que es pretenia aconseguir era el d'arribar a construir una plataforma capaç de detectar simultàniament diversos pesticides, en una primera instància herbicides de la família de les triazines, però sabent que es podria expandir a d'altres pesticides. Amb aquest objectiu general, es varen proposar, per la meua estància, els següents objectius específics:

- La producció d'anticossos recombinants marcats amb His-tag.
- La preparació de derivats d'atrazina fluorescents.
- La immobilització dels immunoreactius generats a una superfície sòlida per tal de construir el microarray.

7.2 Producció d'anticossos recombinants anti-Atrazina amb His₆-tag

Per a tal fi es va partir dels següents plàsmids que es mostren a la **Figura 7.3**. El plàsmid pASK99-IPR_i és l'utilitzat per l'expressió dels Fab IPR 7, 23 i 53 amb un *Strep*-tag. El plàsmid pASK85 K411B conté la fracció de DNA corresponent a l'expressió de l'*His*-

tag. Finalment, el plàsmid pJuKa1 és el que expressa els Fab His-tag per IPR7, 23 i 53. Tots els plàsmid contenen els següents vectors comuns: *ColE1*, indica el començament de la replicació de la *E. Coli*; *Omp*, seqüència de proteïna que indica el començament del Fab; *f1ori*, origen de la replicació per a la producció del *single-stranded DNA* (ssDNA); *Bla*, gen que codifica la resistència a la ampicil·lina; *tetR*, tetraciclina repressor, reconeix la tetraciclina amb gran afinitat, en el moment que s'afegeix la tetraciclina, la proteïna inhibeix la replicació de DNA produint la proteïna, en aquest cas Fab. Com a element diferenciador està el plàsmid pJuKa1, està el que conté les seqüències proA i proB, que codifiquen els enzims responsables de la biosíntesi de la prolina.

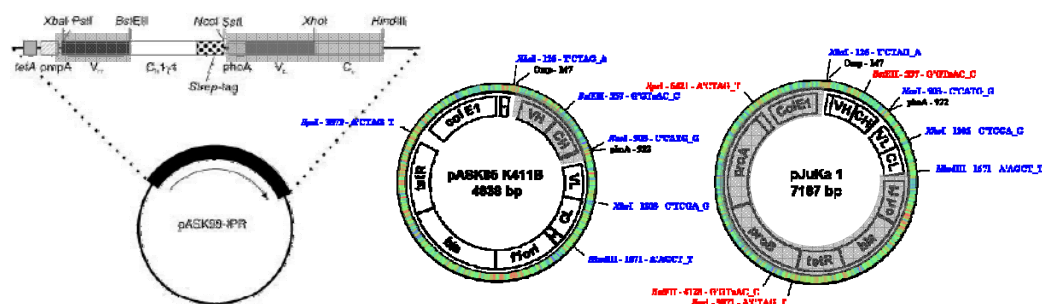


Figura 7.3 Plàsmids utilitzats per l'expressió del Fab-IPR 7, 23 i 53 amb *His-tag*. Les seqüències ombrejades corresponen als fragments que ens interessen.

L'estratègia que es va seguir es pot veure a la **Figura 7.4**. Mitjançant els enzims de restricció *BstEII* i *NcoI* es tallaria la seqüència de DNA que codifica l'expressió de la fracció CH del Fab amb *Strep-tag*, pel cas de pASK99, i *His-tag*, pel pASK85. El fragment obtingut de pASK85 s'uniria mitjançant una ligasa als diferents plàsmids pASK99 que codifiquen l'expressió dels Fab IPR7, 23 i 53. A continuació es tallaria mitjançant els enzims *XbaI* i *HindIII*, la seqüència corresponent a l'expressió del Fab dels diferents IPR amb l'*His-tag*, per unir-lo al vector de transcripció pJuKa1.

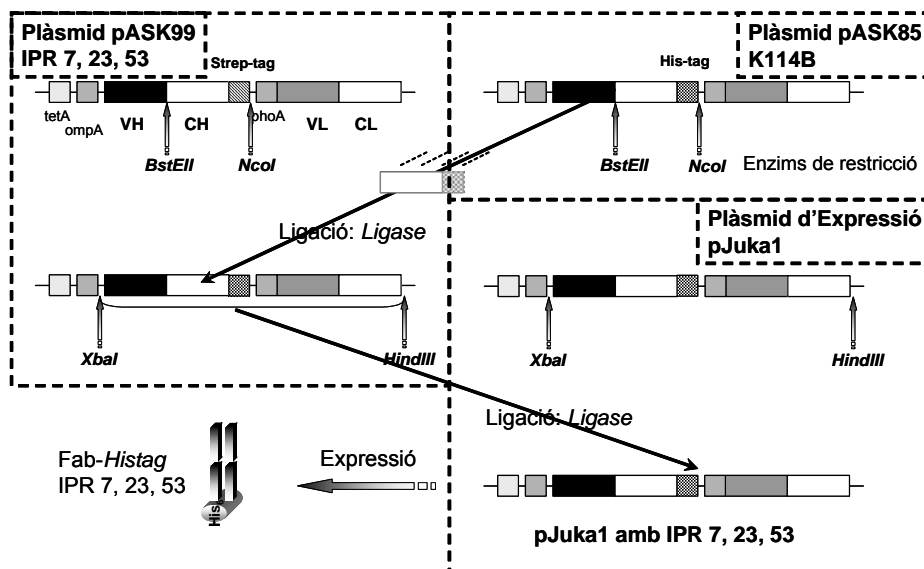


Figura 7.4 Esquema de producció de Fab IPR 7, 23 i 53 amb His-tag.

7.2.1 Obtenció dels plàsmids

L'obtenció dels plàsmids es va fer a partir d'unes bacteris stock que contenen el plàsmid d'interès i que estaven emmagatzemades a -80°C . Per aquest propòsit es van colonitzar amb els diferents bacteris sobre càpsules de Petri amb medi LB-A i es van incubar a 30°C durant tota la nit. En una primera instància, es va seleccionar una de les colònies obtingudes per posteriorment fer-la créixer i obtenir més quantitat. Per l'obtenció del plàsmid que hi havia al bacteri es va emprar un kit comercial (QIAprep® Miniprep Handbook, QIAGEN), el qual extreu i purifica l'informació genètica continguda als bacteris. D'aquesta manera es van obtenir els plàsmids d'interès que es van poder veure per electroforesis amb un gel d'agarosa (veure **Figura 7.5**). Tal i com es pot observar en un dels carrils del gel es va sembla una mostra de marcadors de pes molecular el qual ens dona la informació de la quantitat aproximada de kilobases (Kbp) que conté el plàsmid. Segons es pot veure, semblava que havíem obtingut un plàsmid amb un pes molecular més gran del que s'hauria esperat, però aquest és un comportament normal dels plàsmids que agafen una conformació superenrollada (*supercoiled DNA*) que fan que no migri com ho hauria de fer.

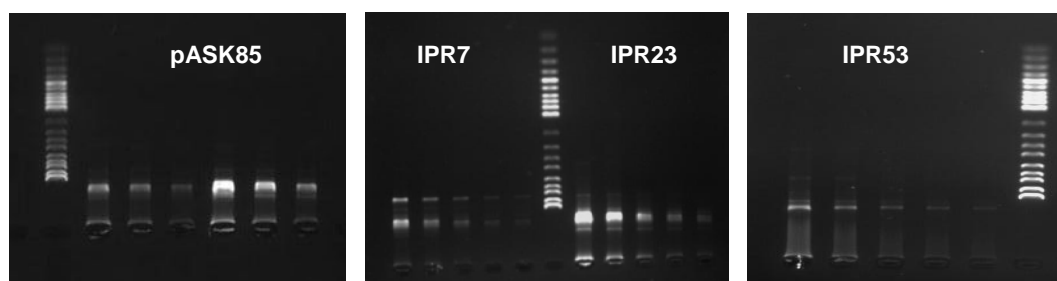


Figura 7.5 Gel d'agarosa després de l'obtenció del plàsmid de pASK85 i pASK99 IPR 7, 23 i 53. S'observa les dilucions dels plàsmids obtinguts.

7.2.2 Digestió dels plàsmids amb *BstEII* i *NcoI*

La digestió es va realitzar per tal d'obtenir els fragments de DNA d'interès. En el cas del pASK85 va ser la font de subministrament del fragment que expressa l'*His-tag*. Per altra banda el fragment que ens interessava del pASK99 IPRi era el fragment que codifica el Fab però sense el *Strep-tag*. La digestió amb els enzims de restricció *BstEII* i *NcoI*, ens van donar els fragments d'interès. La digestió es va realitzar segons les indicacions del subministrador. Finalment, per tal d'observar si la digestió havia tingut èxit, es va realitzar una electroforesis en gel d'agarosa (vegeu **Figura 7.6**).

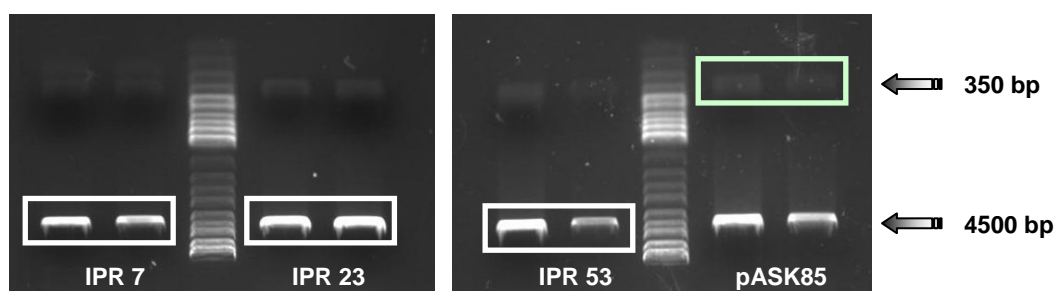


Figura 7.6 Digestió mitjançant *BstEII* i *NcoI* de pASK99 IPR7, 23 i 53 i pASK85. Es remarquen els fragments d'interès i el pes molecular de cada fragment.

Un cop que es va comprovar que la digestió havia anat bé, es va procedir a l'aïllament de cadascun dels fragments a mida preparativa mitjançant una electroforesis gel d'agarosa preparativa. Un cop separats i extrets del gel es va procedir a la seva purificació i quantificació. La purificació es va fer mitjançant un kit comercial (*Qiaquick Gel Extraction kit* de Qiagen) i seguint les especificacions del subministrador. Seguidament

es va quantificar mitjançant espectroscopia UV. A la **Taula 7.1** es poden veure els resultats obtinguts. Aquestes dades són útils pels posteriors experiments de lligació.

Taula 7.1 Concentració dels fragments obtinguts mesurats per UV (a 260 nm).

Fragment	Concentració ng·mL⁻¹
His-tag	1.7
IPR7	3.8
IPR23	7.5
IPR53	3.2

7.2.3 Lligació i electroporació del His-tag als IPRi

Un cop obtinguts els fragments, es va procedir a la lligació del fragment His-tag als esquelets de IPR7, 23 i 53. La proporció entre ambdós fragments va ser de 1:1. La lligació es va realitzar mitjançant una T4-DNA Ligasa (Fermentas EL0335), la qual uneix enzimàticament els dos fragments. Un cop purificats (vegeu **apartat 9.5.1.7**), es va procedir a la inserció del nou plàsmid preparat a un bacteri electrocompetent (*E. Coli* JM83). Aquest bacteri, té la particularitat que està preparat per a la introducció de plàsmids a través de l'aplicació d'una diferència de potencial (temps de pols, 4.534 µs) la qual produeix que s'obrin porus al bacteri perquè s'introdueixi el plàsmid.

Per tal de saber si la lligació i l'electroporació ha tingut èxit es va fer créixer aquest bacteri preparat sobre plaques de LB-A. Els resultats que es van obtenir van ser negatius. Per tant, es va procedir a investigar, amb diferents controls, aquesta etapa.

Es va augmentar la proporció de His_{tag} respecte l'esquelet de IPRi, així com la concentració de DNA per la lligació. Es va passar d'una proporció de 1:1 His_{tag}:esquelet IPRi a 1:3 i 1:6, però sense cap tipus de resultat. També es van avaluar els processos d'extracció del plàsmid format i l'electroporació. Aquest estudi es va realitzar amb un plàsmid complet el qual es va sotmetre a l'extracció i a l'electroporació. Aquests resultats van ser positius, però el rendiment no va ser l'adient. Si s'havia d'obtenir una població de colònies de bacteris de l'ordre de 10⁷-10⁸ colònies/µg DNA, es van obtenir un 1.4·10⁶

colònies/ μg DNA, un rendiment considerat baix. De totes maneres, el factor crític seguia sent la lligació.

D'acord amb els estudis anteriors, es van substituir la DNA T4 Ligasa de Fermentas per un altre equivalent DNA T3 Ligasa però en aquest cas subministrada per New England Biolabs. També es van produir una tanda nova de bacteris electrocompetents, però, en ambdós casos el resultat va ser negatiu. Com a control de lligació també es va realitzar la lligació entre el Strep_{tag} de l'IPR₂₃, amb l'esquelet de l'IPR₂₃, però no va donar resultats positius. En cap cas, es va aconseguir realitzar la lligació del fragment His_{tag} amb els esquelets de IPRi. Per tant es va decidir aparcar aquest tema i continuar amb la síntesi dels derivats fluorescents d'atrazina.

7.3 Síntesi del derivat fluorescent: Cy3-EDA-Atr. (29)

Tal i com s'ha comentat anteriorment, com a antigen de competició s'utilitzarà el mateix haptè emprat en el desenvolupament dels ELISAs ja existents per a la determinació d'atrazina¹⁸⁸. L'haptè en qüestió és el que té el braç espaiador a la posició del grup etil de l'atrazina (vegeu **Figura 7.7**). Però en aquest cas, l'haptè s'hauria d'unir a un fluoròfor per tal de desenvolupar el microarray. Es va escollir com a fluoròfor el Cy3 freqüentment (vegeu **Figura 7.7**) emprat en proteòmica i genòmica¹⁹⁷. Aquest compost s'ha utilitzat com a marcador en el desenvolupament de microarrays tant proteics com de DNA. La particularitat d'aquest compost són les seves longituds d'ona d'excitació a 550 nm, i d'emissió a 570 nm, amb unes bandes d'absorció molt estretes.

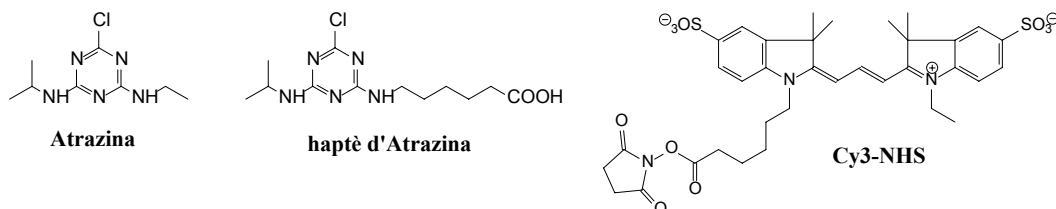


Figura 7.7 Estructures químiques de l'Atrazina, l'haptè d'Atrazina emprat com a competidor, i el Cy3 activat en forma de N-hidroxisucciniimida (Cy3-NHS).

Per tal de sintetitzar l'haptè de competició conjugat al Cy3, es va seguir l'esquema retrosintètic que es pot veure a la **Figura 7.8**. Segons es pot observar, primer s'hauria

d'introduir una funcionalitat NH_2 amb etilendiamina (EDA), ja que el Cy3 només està disponible en forma d'àcid activat amb NHS, i donat que el nostre haptè té un grup àcid, aquest dos grups funcionals no són ortogonals, és a dir, no podríem formar un enllaç estable entre aquest dos compostos. D'aquí la necessitat d'introduir EDA, per fer que aquests compostos siguin ortogonals. Per tant, es va decidir canviar la funcionalitat de l'èster actiu del Cy3, per obtenir la corresponent amina. Llavors, un cop format l'èster actiu del nostre haptè aquest reaccionaria amb el Cy3-EDA per obtenir el Cy3-EDA-Atr.

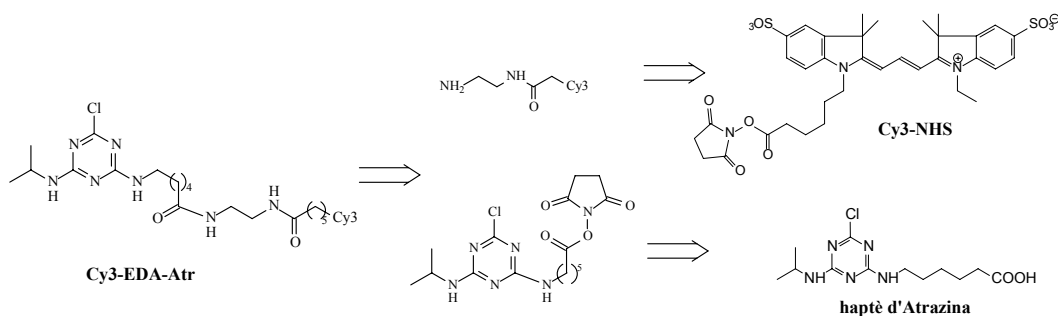


Figura 7.8 Esquema retrosintètic pel derivat fluorescent d'atrazina (Cy3-EDA-Atr).

7.3.1 Síntesi de Cy3-EDA

La síntesi d'aquest compost es va realitzar amb un lleuger excés d'EDA (1.1 equivalents) respecte el Cy3-NHS. La reacció va transcórrer en DMF anhidre i a temperatura ambient. Per tal de seguir la reacció es va utilitzar un HPLC-UV, fixant la detecció a λ 550 nm (correspon a λ_{max} de Cy3) i a λ 245 nm (correspon a λ pròxima a la λ_{max} de l'atrazina). Al cap de 20 minuts es va considerar que la reacció havia finalitzat. Tal i com es pot veure als cromatogrames (vegeu **Figura 7.9**) del pic inicial de Cy3-NHS a $t_{\text{R}}=9.2$ min es va convertir en un nou pic a $t_{\text{R}}=7.5$ min, que correspon al derivat Cy3-EDA (**27**).

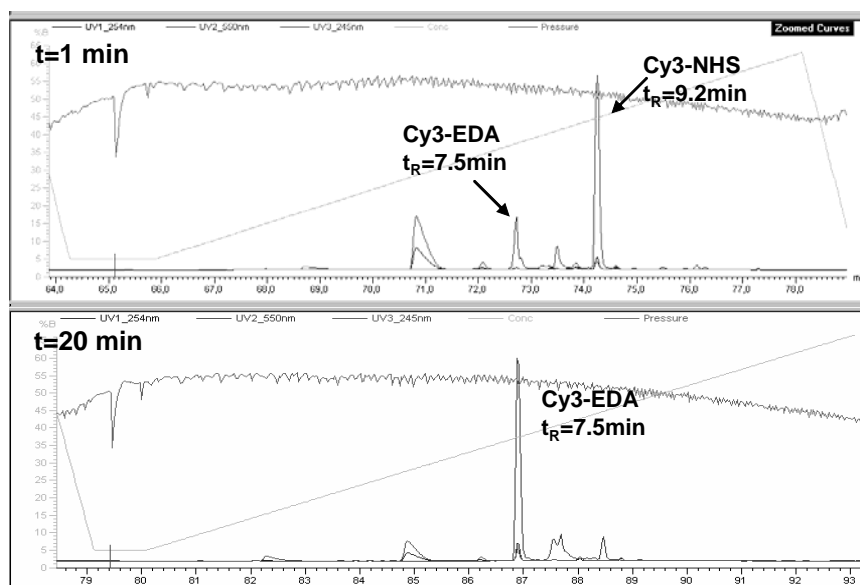


Figura 7.9 Cromatogrames corresponents al seguiment de la reacció de formació del derivat Cy3-EDA a $t=1\text{ min}$ i a $t=20\text{ min}$.

Un cop finalitzada la reacció, el cru de reacció es va purificar per HPLC semipreparatiu, per tal d'obtenir el producte de reacció **27** amb un 84% de rendiment.

7.3.2 Síntesi del Cy3-EDA-Atr.

Per aquest propòsit, es va dissoldre el compost **27**, anteriorment sintetitzat, en DMF anhidre. Paral·lelament, es va preparar l'ester actiu de l'haptè d'atrazina. Es va preparar de la mateixa manera com s'ha explicat anteriorment (vegeu **apartat 3.2**). Un cop es va observar el precipitat blanc, donant a entendre que l'activació de l'haptè havia tingut èxit, es va centrifugar, i el sobrenedant es va addicionar sobre la solució de Cy3-EDA (amb una relació molar d'haptè: Cy3-EDA, 6:1). Igualment, aquesta reacció de formació del Cy3-EDA-Atr es va seguir per HPLC-UV, a les mateixes longituds d'ona que l'apartat anterior (vegeu **Figura 7.10**). Es van poder observar els pics corresponents a Cy3-EDA ($t_R=7.5\text{ min}$) i a l'haptè d'atrazina en la forma d'ester actiu ($t_R=14.2\text{ min}$). A mesura que anava avançant la reacció es va veure l'aparició d'un nou pic que corresponia al Cy3-EDA-Atr. ($t_R=9.8\text{ min}$). El fet que el Cy3-EDA-Atr absorbís a 245 nm i 550 nm, confirmava que era el producte d'interès.

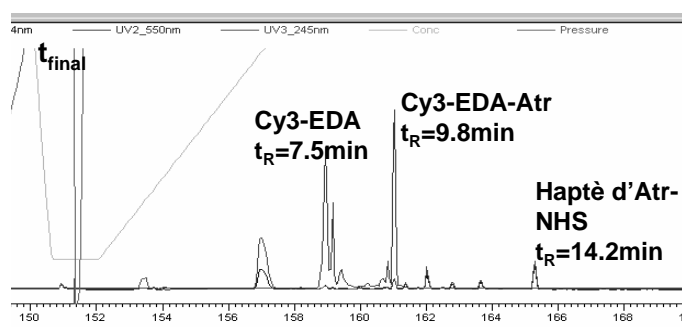


Figura 7.10 Cromatograma corresponent a temps final de la reacció de formació del derivat Cy3-EDA-Atr.

Un cop que es va veure que la reacció no avançava més, es va aturar la reacció. El cru de reacció es va purificar per HPLC semipreparatiu per tal d'obtenir el producte Cy3-EDA-Atr amb un rendiment del 45%.

Aquest compost sintetitzat es va caracteritzar per MALDI-TOF. El pes molecular previst pel Cy3-EDA-Atr és de 956.7 m/z, [M+1]. Tal i com es pot observar a l'espectre de masses (vegeu **Figura 7.11**), es va veure que el pic molecular corresponia a una massa de 956.74 m/z, per tant, aquesta dada era una confirmació que la síntesi havia funcionat.

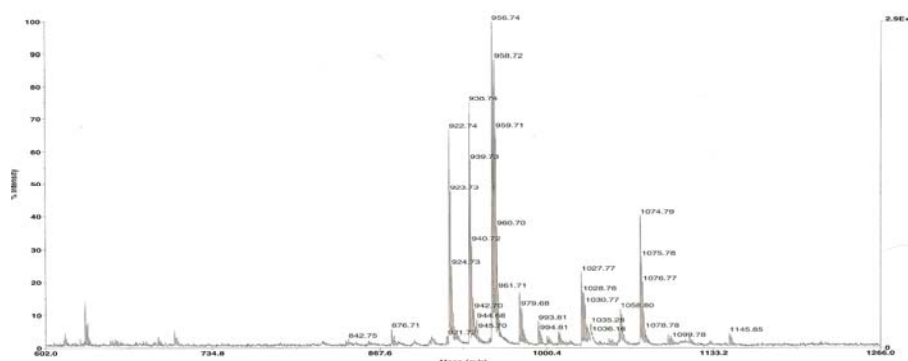


Figura 7.11 Espectre de masses del compost Cy3-EDA-Atr per MALDI-TOF

7.4 Immobilització dels Fab a un suport de vidre

La immobilització dels Fab sobre vidre es va realitzar a través d'un braç espaiador el qual contenia uns grups àcids que després de l'addició de Ni^{2+} , s'autoorganitzava obtenint una esfera de coordinació octaèdrica, la qual deixava lliure dos dels seus lligands. Aquests lligands lliures, després de la incubació del fragment Fab, es coordinen amb el Ni^{2+} a

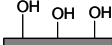
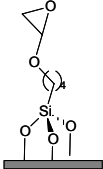
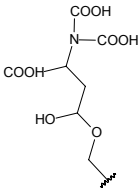
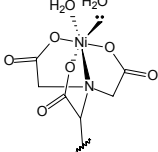
través de les His₆. Aquest tipus d'estratègies s'han utilitzat per a la purificació de proteïnes que tinguin expressat aquest fragment amb His₆¹⁹⁸. Però, també s'han emprat per a la immobilització sobre or^{199,200}.

A partir d'un protocol inicial i tenint en compte les recomanacions trobades a la bibliografia, es va optimitzar un nou protocol que no fos tan llarg. Existeixen a la literatura nombroses publicacions de com optimitzar les diferents etapes involucrades per a la immobilització de Fab sobre vidre²⁰¹⁻²⁰⁵.

7.4.1 Optimització dels paràmetres de immobilització

La **Taula 7.2** es mostra les etapes per a la derivatització del vidre, per tal d'immobilitzar el fragment Fab. Tal i com es pot observar a la taula, el temps per a la preparació dels vidres s'ha reduït substancialment, de dos dies en el protocol inicial a un dia en el nou protocol. Les diferències més importants són el pretractament de vidre pel que fa al seu rentat. En el nou protocol, el rentat és molt més exhaustiu per tal d'eliminar possibles interferents de naturalesa orgànica, com parafines, greix o proteïnes d'assaigs anteriors. Una altre diferència és la forma d'incubació de l'agent sililant a la superfície de vidre. Els reactius sililants són molt reactius, per tant, no caldria una temperatura tan alta perquè reaccionin amb la superfície de vidre. Per últim, la coordinació del Ni²⁺ amb l'agent quelant és molt ràpida, i, no cal una incubació de 12h. Per tant, el protocol de derivatització va quedar com es mostra a la **Taula 7.2**.

Taula 7.2 Protocol inicial i final per a la derivatització de les superfícies de vidre.

Etapa	Protocol inicial	Protocol final
 <p style="text-align: center;">Rentat de les superfícies</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Rentar amb EtOH • Submergir 1h en NaOH 10% • Sonicar 15 min • Rentar amb H₂O • Rentar amb EtOH 	<ul style="list-style-type: none"> • Submergir en MeOH:HCl 1:1, 30 min. • Rentar amb H₂O • Submergir en H₂SO₄conc, 30 min. • Rentar amb H₂O • Submergir 1h en NaOH 10% • Rentar amb H₂O • Rentar amb EtOH
 <p style="text-align: center;">Derivatització de les superfícies</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Incubar solució de GPTS*¹ (2.5%) en EtOH amb 0.01% d'HAc a 90°C 3h • Rentar amb EtOH • Assecar 	<ul style="list-style-type: none"> • Incubar solució de GPTS*¹ (2.5%) en EtOH amb 10 mM d'HAc a Tamb 3h • Rentar amb EtOH • Assecar
 <p style="text-align: center;">Formació de l'agent quelant</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar una solució de NTA*² 0.15 g/mL en tampó NaHCO₃ 0.5 M • Afegir sobre el vidre, deixar tota la nit incubant a Tamb • Rentar amb H₂O 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar una solució de NTA*² 0.15 g/mL en tampó NaHCO₃ 0.5 M • Afegir sobre el vidre, deixar tota la nit incubant a Tamb • Rentar amb H₂O
 <p style="text-align: center;">Formació de l'esfera de coordinació</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Incubar una solució de NiSO₄ 10 mM en tampó Glicina 5 mM (pH=8) durant tota la nit • Rentar amb H₂O 	<ul style="list-style-type: none"> • Incubar una solució de NiSO₄ 10 mM en tampó Glicina 5 mM (pH=8) 1h a Tamb • Rentar amb H₂O

*¹, Glicidoxipropiltrimetilsilà, GPTS; *², àcid nitrilotriacètic (NTA)

7.4.2 Estudis preliminars per desenvolupar un microarray

Per tal d'avaluar si els Fab quedarien immobilitzats sobre la superfície de vidre, es va realitzar un assaig immunoenzimàtic utilitzant un Fab que contenia un His-tag i que tenia afinitat amb el nostre haptè. Aquest fragment formava part d'una bateria disponible de fragments els quals tenien expressat el fragment d'histidina i que tenien afinitat per l'atrazina. Un altre tema que s'havia de tenir en compte era que l'haptè estava marcat amb HRP, per tant l'avaluació de la immobilització es realitzaria colorimètricament. Un cop derivatitzada la superfície es va realitzar el següent assaig:

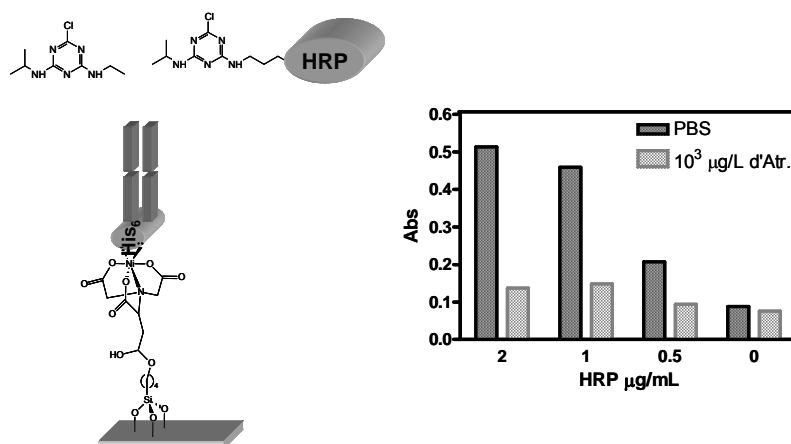
- Es va preparar una solució de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Fab-His_{tag} en tampó PBS i es va deixar incubar a Tamb durant 3h. A continuació es va rentar amb PBST.
- Mitjançant una màscara de silicona es va plantejar el següent experiment (vegeu **Figura 7.12**). Per columnes, es van preparar diferents solucions de Atr-HRP en tampó PBS (2, 1 i 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Per files, a la primera fila es va afegir una quantitat alta de Atrazina (10^3 $\mu\text{g}/\text{L}$ en PBS), i a la segona fila només PBS. L'última columna era el blanc d'adsorció no específica. L'etapa de competència era de 30 min.



Figura 7.12 Experiment plantejat per a la immobilització de Fab per a la determinació de Atrazina

- Rentat amb PBST, quatre cops.
- Addició del substrat.
- Addició del H_2SO_4 4N
- Lectura a 450 nm.

La lectura es va fer en una placa de 96 pous, ja que la reacció enzimàtica va tenir lloc a la superfície de vidre. Per tant es va agafar el volum que hi havia a cada pou de la màscara de vidre i es va traspasar a la placa.



Gràfica 7.1 Esquema representatiu de l'immunoassaig realitzat (dreta). Resultats de l'assaig immunoenzimàtic en vidre (esquerra).

Tal i com es mostra a la **Gràfica 7.1**, es pot observar que la immobilització del Fab al vidre va tenir èxit. També és de remarcar el baix soroll de fons que es va obtenir a l'assaig. Un altre punt a tenir en compte, és que en totes les combinacions d'Atr-HRP amb el Fab va competir l'atrazina, per tant és un bon indicatiu de que l'assaig funciona sobre el vidre, amb aquest mètode d'immobilització.

Amb aquest resultat va finalitzar la meua estància al grup de Biotecnologia Evolutiva de la TUM. Faltava per resoldre la producció dels fragments Fab-Histag per IPR7, 23 i 53 i comprovar el reconeixement del derivat Cy3-EDA-Atr. Subseqüentment, els fragments s'immobilitzarien a les superfícies de vidre amb un *microspotter* per així contruir el microarray.

8 Apèndix II: Anàlisi cromatogràfic dels anabolitzants esteroidals.

En aquest apèndix es detallen els estudis de l'anàlisi per cromatografia líquida amb detecció per espectrometria de masses en tàndem (LC-MS-MS) que es va realitzar per tal d'avaluar l'especificitat de les columnes d'immunoafinitat preparades per l'anàlisi de St (minicolumnes amb l'immunosorbent As145), o per la validació del mètode SPE-IS-ELISA d'orina desenvolupat a l'apartat 5.1.3.2.3. Aquests treballs es van realitzar a l'Agència de Salut Pública de Barcelona. Per tant, s'havia de desenvolupar un protocol d'anàlisi per LC per l'estanozolol i els altres compostos d'interès.

8.1 Condicions del LC-MS-MS

8.1.1 Ionització dels compostos

En una primera instància, s'havia d'avaluar el comportament en el detector de masses de l'equip. Per aquest motiu, es va voler saber la fragmentació d'aquest compostos al espectròmetre de masses. Per això, es van preparar unes solucions patró dels compostos

esteroidals (St, 16 β OH-St, 3'OH-St, NorSt, MB, T, T-3D, B i α -B), a una concentració de 1 μ M en MeOH. Aquests es van injectar al detector amb una fase mòbil de H₂O:ACN 50:50, i a un flux de 0.05 mL/min amb ionització en ESI+. Aquest tipus d'experiment, ens va permetre saber les condicions d'ionització i les masses dels ions adients per la identificació de les molècules estudiades.

Els resultats obtinguts d'aquest estudi estan recopilats a la **Taula 8.1**. Es pot observar que tots els esteroides es van ionitzar en mode positiu. Per al posterior anàlisi per LC-MS-MS es van escollir els ions fills del ió molecular més abundant (vegeu **Taula 8.1**). Com es pot veure, hi ha coincidències depenent del tipus de compost a analitzar. Així, els compostos que contenen l'anell de pirazole (St, 16 β OH-St, 3'OH-St i NorSt) mostren l'ió majoritari corresponent a l'anell de pirazole. Respecte els compostos amb insaturacions a $\Delta^{1,2}$ i $\Delta^{4,5}$ (MB, B i α -B), mostren un fragment majoritari amb l'anell A de l'estructura esteroidal. Mentre que en el cas de la T i la T-d3, s'observà un fragment majoritari, també relacionat amb l'anell A. Aquest comportament també va ser observat per van Poucke *et al.* ²⁰⁶.

Taula 8.1 Condicions optimitzades del detector MS/MS ESI+

Compost	Ió molecular, m/z	Ions fills, m/z	Voltatge de con, V	Energia de col·lisió, V
St	329.5	80.6*, 95.2	50	40
NorSt	315.2	80.7*, 94.7	55	50
16 β OH-St	345.3	80.9*, 94.4	70	50
3'OH-St	345.3	97.0*, 80.9	65	50
T-d3	292.4	96.6*, 109.2	30	30
T	289.0	96.4*, 109.0	30	25
B	287.5	120.8*, 134.8	30	30
a-B	287.5	120.8*, 134.8	30	20
MB	301.5	120.9*, 149.0	30	30

* Ió majoritari

8.1.2 Comportament cromatogràfic

Les condicions utilitzades per a la cromatografia d'aquests compostos es van fer servir en base a l'experiència acumulada del personal de l'Agència de Salut Pública de Barcelona.

Taula 8.2 Mètode cromatogràfic per a la determinació dels AAS

Paràmetre	Descripció		
LC	Waters 2695 LC		
MS/MS	Micromass Quattro Micro API		
Volumen d'injecció	10 µL		
Flux	0.4 mL/min		
Temp	40°C		
	t, min	H2O	ACN
	0	75	25
	8	50	50
Gradient	9.3	50	50
	11.3	5	95
	11.4	75	25
	17.0	75	25
Columna	XTerra MS C ₁₈ 2.5 µm, 21x50 mm		

Amb les condicions que es veuen a la **Taula 8.2**, es van injectar el compostos patrons a una concentració de 25 µg/L. D'aquesta manera es van obtenir els cromatogrames que es poden veure a la **Figura 8.1** amb els temps de retenció indicats a la **Taula 8.3**.

Apèndix II

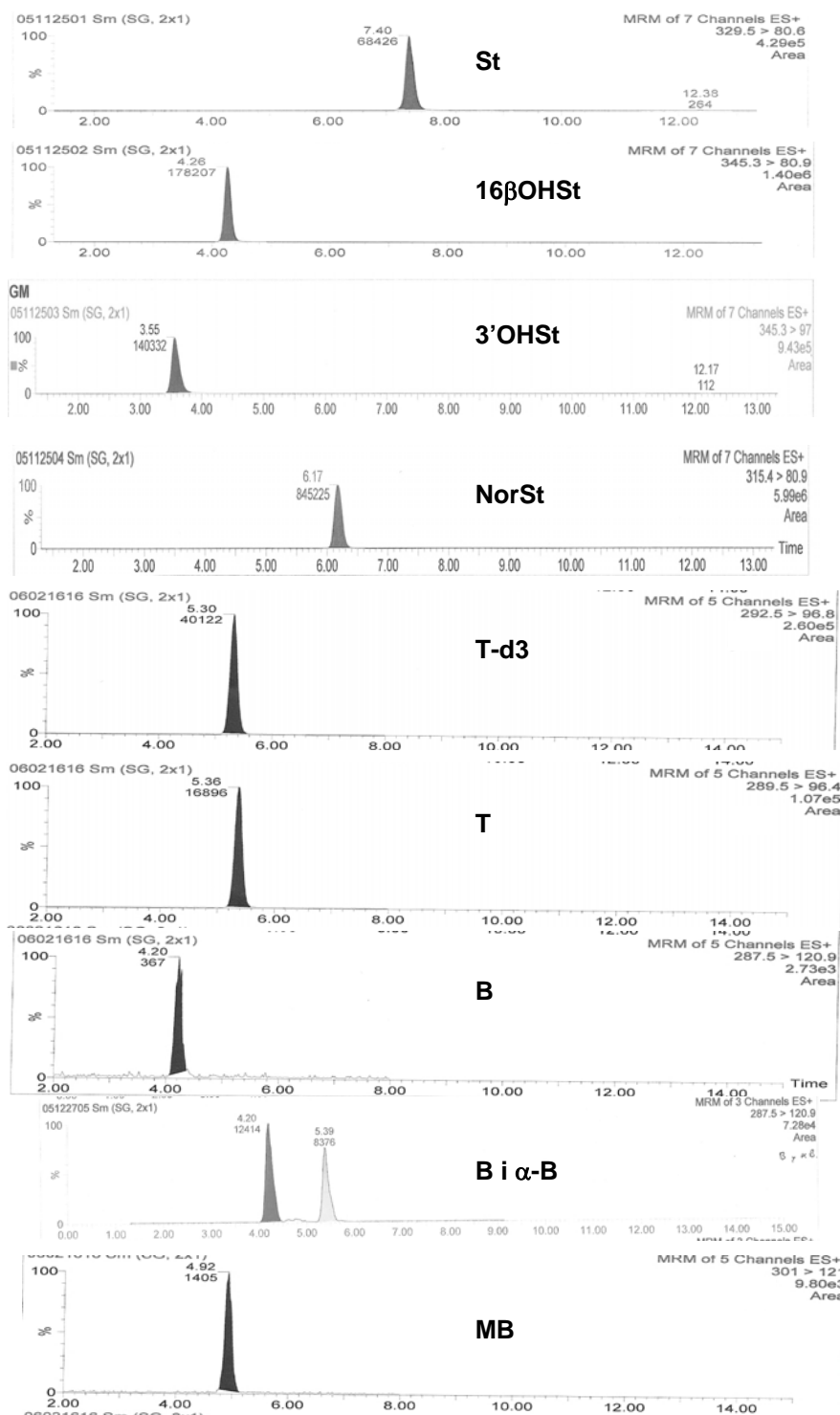


Figura 8.1 Cromatogrames dels compostos St, 16βOH-St, 3'OH-St, NorSt, T-d3d, T, B, α-B i MB.

Taula 8.3 Temps de retenció dels compostos injectats al LC-MS-MS

Compost	t _R , min	Compost	t _R , min
St	7.40	T	5.32
NorSt	6.17	B	4.20
16bOH-St	4.26	α-B	5.39
3'OH-St	3.55	MB	4.92
T-d3	5.30		

Amb el mètode emprat tots els compostos queden diferenciats tant pel seu temps de retenció com per la seva massa característica. Només pot existir una certa confusió entre la T, la T-d3 i la α-B, ja que tenen un t_R gairebé igual, però, si es té en compte la seva massa i els seus ions fills queden totalment diferenciats.

8.1.3 Recta de calibratge

Per tal de realitzar la quantificació de l'estanozolol i els compostos relacionats, es van preparar rectes de calibratge. Com a patró intern es va utilitzar un compost deuterat de la testosterona, la 16,16,17-d3-testosterona (T-d3). Es va agafar un compost deuterat per assegurar el caràcter exogen d'aquest producte, que la diferenciació amb altres compostos esteroidals que hi puguin haver a la matriu. A més, la presència d'un patró intern minimitza les possibles interferències que puguin provenir de l'elució de la mostra. Els resultats de les rectes de calibratge obtingudes es mostren a la **Taula 8.4**.

Taula 8.4 Paràmetres de la regressió lineal dels compostos analitzats per LC-MS-MS

y= a·x + b	St	16bOH-St	3'OH-St	NorSt
a*	2.28±0.04	1.67 ± 0.04	0.39 ± 0.01	0.077 ± 0.002
b*	-2.13±0.86	-2.54 ± 1.01	-0.39 ± 0.26	0.014 ± 0.068
R²	0.998	0.997	0.997	0.997

* (N=3)

Es va obtenir una bona correlació entre els patrons injectats i el senyal que donaven al LC-MS-MS, però malgrat això, es va decidir comprovar l'exactitud del mètode analític a través de la injecció de mostres amb concentració coneguda. Segons es pot observar a la

Taula 8.5, la quantificació va ser bona. Per tant, el mètode podia ser útil pels objectius que ens havíem marcat.

Taula 8.5 Resultat de l'estudi d'exactitud emprant el LC-MS-MS (A, mostra dopada; B, mostra mesurada)

Mostra	St		16bOH-St		3'OH-St		NorSt	
	A	B	A	B	A	B	A	B
M1	16.4	18	50	49	-	-	-	-
M2	-	-	-	-	50	44.5	15.7	17.5
M3	8.2	8.1	25	20.8	25	18.2	7.8	8.6

8.2 Avaluació de la reactivitat creuada de l'IS As145

Per aquesta finalitat, es van dopar mostres de 1 mL de PBS amb els compostos esteroidals d'interès, el St, el 16bOH-St, el 3'OH-St, el NorSt, la MB, la B i la T a una concentració de 100 nM. A aquestes mostres se'ls va aplicar el protocol SPE-IS, vist a l'apartat 5.1.3.2.3. Els eluats es van assecat, i es van reconstituir en una mescla H₂O:ACN per a la seva posterior injecció al LC-MS-MS. Els resultats obtinguts es poden veure a la **Taula 8.6**.

Taula 8.6 Avaluació dels diferents compostos avaluats al IS As145 per LC-MS-MS

Compost	Conc. Dopada, nM	Conc. Mesurada, nM	% Recup.	% RC
St	400	393.5	98	100
16bOH-St	400	376.1	94	95
3'OH-St	400	318.9	80	81
NorSt	400	376.3	94	95
MB	400	203.0	51	52
B	400	192.0	48	49
T	400	380.5	95	97

Amb aquests experiments, es va poder mesurar la quantitat recuperada dels compostos sotmesos al protocol de l'IS, i prenent com a 100% la quantitat recuperada de St, també es va poder extreure els valors de reactivitat creuada que es mostren a la **Taula 8.6**, i que

només és una estimació relativa de la retenció d'aquests esteroides respecte l'estanozolol. Dels resultats obtinguts en aquest experiment, s'ha de ressaltar les reactivitats creuades mostrades pels compostos relacionats al St. Si comparem aquesta taula a la mostrada a l'assaig As145/hA_St-HRP (vegeu **Taula 4.8, apartat 4.2.4**), no tenen res a veure. La diferència està a que en que l'assaig As145/hA_St-HRP els compostos competien amb l'antigen de competició, d'aquí que l'especificitat sigui superior. Per tant, quan els anticossos no estan sota aquest règim, com als IS, el reconeixement d'aquest compostos sembla millor.

Es pot veure, que el 16bOH-St i el NorSt es retenen molt bé (94% de recuperació). Això és important, ja que a les orines d'origen boví, el metabòlit majoritari és el 16bOH-St. Pel que fa a l'altre metabòlit del St, la 3'OH-St, la recuperació és del 80%. En quant als altres compostos, s'ha de destacar l'elevada recuperació de la T, pròxima al 100%, mentre que la MB i la B, ho estan al voltant del 50%.

8.3 Avaluació de l'efecte matriu de l'orina bovina aplicant el protocol SPE-IS amb el LC-MS-MS

Com s'ha comentat anteriorment, un dels altres objectius d'aquest apèndix, era l'avaluació del protocol SPE-IS-ELISA amb el LC-MS-MS. Per tant, s'havia d'avaluar el comportament que tindrien els eluats dels IS per al posterior anàlisi per LC-MS-MS.

Es va aplicar el protocol que es pot veure a la **Figura 8.2**. El tractament que se li va fer a la mostra, un cop eluïda, va ser l'evaporació del solvent d'elució amb un evaporador al buit. Un cop assecat, es va reconstituir amb una mescla de H₂O:ACN 50:50 (250 µL) per tal d'injectar al LC-MS-MS, però abans d'injectar es va afegir el patró intern T-d3 (5 µL d'una solució de 1 mg·L⁻¹).

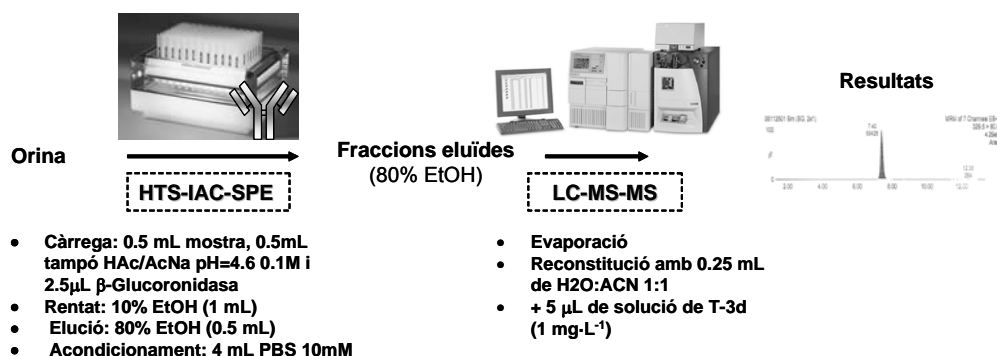


Figura 8.2 Protocol de tractament de mostra un cop eluida del HTS-IAC-SPE per analitzar amb LC-MS_MS.

D'aquesta manera, en un primer moment, es va injectar l'orina control per saber si aquesta mostra estava contaminada amb el St o els seus metabòlits. Així doncs, l'orina control es va sotmetre al protocol de la **Figura 8.2**, i tal i com es pot observar a la **Figura 8.3**, el resultat va ser negatiu pels compostos a estudiar..

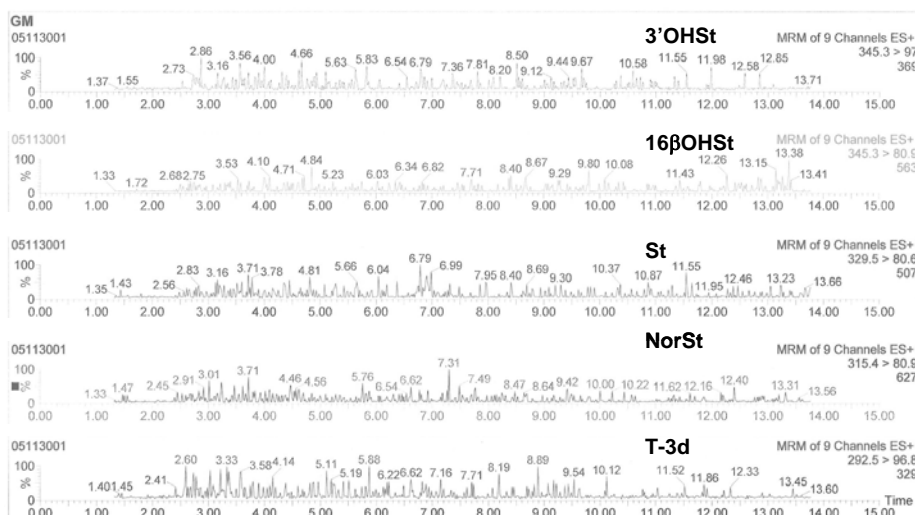


Figura 8.3 Cromatogrames corresponents a la monitorització de la massa del 3'OH-St, el 16βOH-St, el St, el NorSt i la T-3d d'una mostra d'orina la qual se li va aplicar el protocol SPE-IS per orina bovina.

Un aspecte que no es va considerar al principi d'establir el protocol, era la disminució del senyal que s'observava quan s'injectava una mostra de St en PBS tal i com succeix després del protocol HTS-IS, respecte de la mateixa mostra en MeOH. Aquest fet, es va agreujar si la mostra procedia d'una orina control sotmesa al protocol HTS-IS i es dopada

amb St. La sensibilitat de la tècnica es veia afectada per l'extracte que sortia de la HTS-IS. Per tal de minimitzar aquest efecte, en les etapes de rentat i elució del protocol HTS-IS es va substituir el PBS per H₂O. Tal i com es pot observar per les àrees a la **Figura 8.4**, la sensibilitat del LC-MS-MS va millorar substancialment, quan es van dopar, un cop eluïdes, diferents mostres blanc. La mostra blanc PBS correspon a una mostra de PBS rentada i eluïda amb 10% i 80% d'EtOH en PBS, respectivament. La d'orina, correspon a una mostra d'orina, igual que l'anterior. Es pot observar la davallada de senyal respecte la mostra dopada en MeOH. Es veu que si es renta i elueix amb 10% i 80% d'EtOH en aigua el valor de l'àrea s'aproxima a quan es dopa la mostra en MeOH.

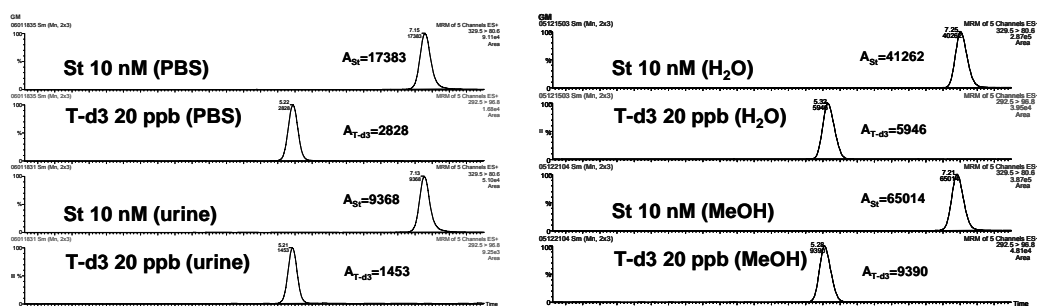


Figura 8.4 Cromatogrames corresponents a diferents injeccions al LC-MS-MS. Mostres dopades després de passar les mostres blanc.

Per tant, el protocol establert podria ser vàlid per la futura validació del protocol SPE-IS-ELISA establert per St per a la mesura de mostres d'orina bovina.

9 Materials i mètodes

9.1 Síntesi

9.1.1 *Materials i instrumentació*

Durant la síntesi dels haptens, la cromatografia en capa fina (CCF) es va dur a terme en làmines d'alúmina recobertes de 0.25 mm de sílica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Germany). Els espectres de Ressonància Magnètica Nuclear d'hidrogen (^1H -RMN) i carboni (^{13}C -RMN) es van realitzar amb un espectròmetre Varian Unity-300 (300 MHz per ^1H i 75 MHz for ^{13}C) o en un espectròmetre Varian Inova 500 (500 MHz per ^1H i 125 MHz per ^{13}C) (Varian Inc. Palo Alto, CA, USA). Els espectres d'infraroig (IR) es mesuraren en un espectrofotòmetre Bomem MB 120 FTIR (Hartmann & Braun, Quebec, Canadà).

L'anàlisi per HPLC es va realitzar amb un equip Merck Hitachi, que consta de: bomba Merck Hitachi L-7100, detector *diode array* L-7455, injector automàtic L-7200 (Merck,

Darmstadt, Germany). Els cromatogrames es van processar mitjançant el programa HSM (Merck, Darmstadt, Germany). La columna que es va fer servir va ser una Lichospher 100 RP-18 125x4 (5mm; Merck, Darmstadt, Germany). Per a l'anàlisi per HPLC de la reacció d'hidrogenació es va emprar un sistema isocràtic 60%ACN:40%H₂O a un flux de 1.0 mL/min. La reacció es va monitoritzar a tres longituds d'ona: 350, 310 i 254 nm.

Per la separació i purificació dels productes d'hidrogenació de la gestrinona es va fer servir un HPLC preparatiu. El sistema consisteix en una bomba Waters Prep LC4000 (Millipore Corp., Milford, MA), un mòdul de pressió Waters Prepack 1000, amb un distribuïdor de flux on el 2% de la mostra va a un detector Merck Hitachi L-4000 (Merck, Darmstadt, Germany). La columna emprada va ser una Perkin Elmer Preparative C18 Flow (30 x 1 cm, 10 µm). El gradient que es va emprar va ser: 53%ACN (5min), 0.6%ACN/min, 73%ACN; a un flux de 12mL/min. La purificació es va monitoritzar a 350nm.

Els dissolvents emprats a la síntesis van ser de qualitat de síntesis. Els esteroides St i DHT van ser subministrats per Sequoia Research Products, Ltd (Oxford, UK). La resta d'esteroides, així com els reactius emprats a la síntesi, foren adquirits a Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA).

9.1.1.1 Cromatografia de gasos amb detector d'ionització de flama (GC-FID).

Les punxades (1 µL, splitless) es van realitzar en un equip de Trace™GC ThermoFinnigan (ThermoQuest Italia S.p.a, Rodano, Milan, Italy) amb injector automàtic AS2000. Les dades es van processar amb el programa Atlas 2001 versió 5.39, de Thermo Labsystem. La columna capilar BPX35 (35% Fenil(equiv.) Polisililfenilen-siloxà) (SGE Europe Ltd, UK) va ser de 25 m x 0.22 mm i.d. x 0.25 µm (film thickness). La temperatura d'injecció va ser de 280°C. El detector emprat va ser un FID (Flame Ionization Detector) i la temperatura va ser de 280°C. El gas portador emprat va ser He(4.6) a 130KPa (20cm/s). El *make up* va ser N₂.

9.1.1.2 Espectrometria de masses

Els espectres de masses d'alta resolució (HRMS, *High Resolution Mass Spectrometry*) van ser realitzats per la Unitat d'Espectrometria de Masses de Santiago de Compostela. Pels haptens, la massa es determinà per espectrometria de masses per impacte electrònic (EI-MS, *Electronic Impact Mass Spectrometry*) en un espectròmetre Micromass Autospec.

9.1.1.3 Càlculs teòrics i modelatge molecular.

Els càlculs teòrics dels log P dels haptens es van realitzar mitjançant el programa ACD/ChemSketch 3.0 Software Package (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada). Els estudis de modelatge molecular es dugueren a terme amb el software Hyperchem 6.0 (Hypercube Inc, Gainesville, FL, USA). Les geometries teòriques i la distribució electrònica s'avaluà pels anabolitzants del nostre interès (T, B, MB i St) i pels haptens corresponents (en forma d'amida) emprant models de mecànica quàntica semiempírica MNDO i PM3. Els càlculs es feren emprant criteris de química computacional estàndard.

9.1.1.4 Caracterització.

La caracterització dels compostos es va realitzar per RMN de ¹H i ¹³C, HRMS, HPLC-MS i IR. Les dades dels compostos sintetitzats estan a l'annex inclòs al capítol 10 que es troba en aquesta tesi.

9.1.2 Mètodes

9.1.2.1 Síntesi dels haptens d'anabolitzants

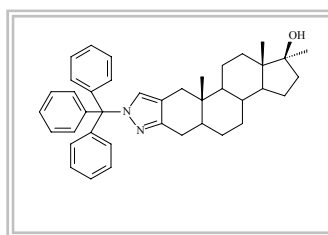
Es van sintetitzar dos tipus d'haptens segons la posició del braç espaiador a l'estructura esteroidal. En haptens de tipus A, el braç espaiador està enllaçat covalentment sobre l'anell D de l'estructura esteroidal. D'altra banda, els haptens tipus B estan enllaçats per l'anell A, o pel A' en el cas de l'estanozolol.

9.1.2.1.1 Haptens per Estanazolol

Haptè tipus A (hA_St, 7).

2'-trítíl-androst-2-eno-[3,2-c]pirazol-17 α -metil-17 β -ol (Tr-St, 2).

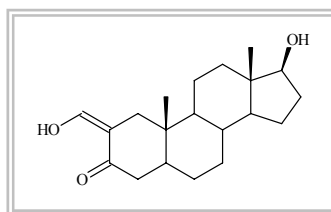
Es va dissoldre St (**1**, 0.5 g, 1.5 mmol) en dioxà anhidre (15 mL) i es va addicionar clorur de trítíl (0.42 g, 1.5 mmol). La solució resultant es va posar sota atmosfera de nitrogen i a continuació se li va abocar NEt₃ (0.25 mL, 1.8 mmol). La mescla de reacció es va agitar a 90°C durant 12 hores.



La reacció es va seguir per CCF (hexà:AcOEt, 1:1). La solució obtinguda es va rotavaporar fins sequedat i a continuació el residu es va redissoldre en AcOEt (20 mL) i es va rentar amb aigua (2 x 10 mL). La fase orgànica es va rotavaporar de nou fins sequedat i el cru de reacció obtingut es va purificar en columna de sílica gel amb un sistema isocràtic d'hexà:AcOEt 3:1 per tal d'aïllar el producte que ens interessava. Les fraccions es van rotavaporar per obtenir 0.6 g (1.03 mmol) del producte **2**, amb un 68% de rendiment.

2-hidroximetileneandrostan-17 β -ol-3-one (2-HM-DHT, 4)

A una solució de DHT (**3**) (1.5 g, 5.16 mmol) en piridina anhidre (30 mL), sota atmosfera de nitrogen, se li va abocar formiat d'etil (2.76 mL) i tot seguit se li van afegir metòxid de sodi (0.56 g, 10.3 mmol). La solució es va mantenir a temperatura ambient 12 hores amb agitació

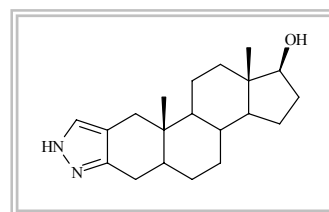


força ja que la solució era molt viscosa. La reacció va ser seguida per GC-FID. Després de 12 hores, la mescla de reacció es va abocar a una solució freda d'àcid acètic glacial (15 mL) en aigua (150 mL). El precipitat es va extreure amb CH₂Cl₂. La fase orgànica es va rentar amb 2x25 mL d'aigua. Després, es va extreure amb una solució d'hidroxid de potasi al 2% (3x30 mL). Els diferents extractes bàsics es van rentar amb dietil èter i es va acidificar amb àcid acètic glacial (6 mL). A continuació, la solució aquosa es va extreure amb CH₂Cl₂ (3x25 mL) i es va tornar a rentar amb aigua (2x25 mL). La fase orgànica es

va assecar amb MgSO_4 anhidre, es va filtrar i evaporar fins a sequedat per obtenir el producte d'alquilació desitjat **4** (1.14 g) amb un 70% de rendiment.

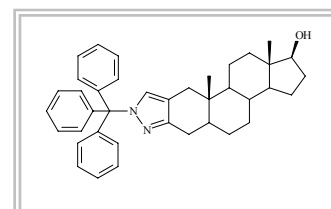
2'H-androt-2-eno-[3,2-c]pirazol-17 β -ol (Norestanazolol, 5).

Hidrazina hidratada (0.35 mL, 7.2 mmol) es va abocar a una solució que contenia de **4** (1.1 g, 3.5 mmol) en etanol a un 0.5% d'àcid acètic glacial (35 mL). La mescla es va portar a reflux durant 2 hores. La reacció va ser seguida per CCF (hexà:AcOEt, 1:1). Quan vam donar per acabada la reacció, es va eliminar el dissolvent fins a sequedat. El sòlid que es va obtenir es va redissoldre amb CHCl_3 (30 mL) i es va rentar amb aigua (2x20 mL). La fase orgànica es va assecar amb MgSO_4 anhidre, es va filtrar i evaporar fins a sequedat per obtenir el producte desitjat **5** (1.1 g, 3.5 mmol) amb un 95% de rendiment



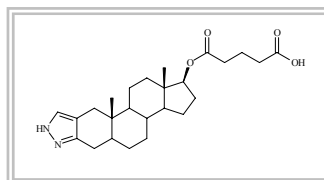
2'-tritol-androst-2-eno-[3,2-c]pirazol-17 β -ol (6).

Es va dissoldre NorSt (0.5 g, 1.6 mmol) en dioxà anhidre (15 mL) i es va addicionar clorur de tritol (0.45 g, 1.6 mmol). La solució resultant es va posar sota atmosfera de nitrogen i a continuació se li va abocar NEt_3 (0.25 mL, 1.8 mmol). La mescla de reacció es va agitar a 90°C durant 12 hores. La reacció es va seguir per CCF (hexà:AcOEt, 1:1). La solució obtinguda es va rotavaporar fins a sequedat i a continuació el residu es va redissoldre en AcOEt (20 mL) i es va rentar amb aigua (2x10 mL). La fase orgànica es va rotavaporar de nou fins a sequedat i el cru de reacció obtingut es va purificar en columna de sílica gel amb un sistema isocràtic d'hexà:AcOEt 3:1 per tal d'aïllar el producte que ens interessava. Les fraccions es van rotavaporar per obtenir 0.5 g (0.89 mmol) del producte **6**, amb un 58% de rendiment.



Àcid 2'H-androst-2-eno-[3,2-c]pirazol-17β-hemiglutàric (7, hA_St).

El norestanazolol protegit (0.5 g, 0.89 mmol) es va dissoldre en THF anhidre (6 mL) i tot seguit es va afegir una solució d'anhidrid glutàric (0.22g, 1.92 mmol), piridina (2.5 mL) i DMAP (0.25 g, 2 mmol) en THF



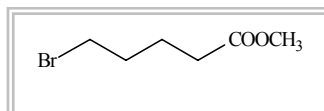
anhidre (1 mL). La solució es va mantenir en refluxe durant tota la nit. La reacció es va seguir per CCF (hexà:AcOEt, 1:1), i es va aturar quan no avançava més. El volum de dissolvent del cru de reacció es va rotavaporar fins a sequedat.

Per tal d'hidrolitzar el grup protector, el producte anterior es va dissoldre en un medi HCl/acetona (1 mL/8 mL, 1.5 mM HCl_{conc} en acetona). La reacció es va deixar a temperatura de reflux durant 3 hores i es va seguir per CCF (hexà:AcOEt, 1:1). Un cop finalitzada la reacció, es va rotavaporar el dissolvent, es va redissoldre en CH₂Cl₂ (20 mL) i es va rentar amb aigua (3 x 10 mL). Es va tornar a rotavaporar i el cru es va purificar per sílica gel amb un sistema isocràtic d'hexà:AcOEt 1:2. Les fraccions a les quals elueix el producte d'interès es van rotavaporar per obtenir el producte desitjat **7** (15 mg) amb un 22% de rendiment.

Haptè tipus B (11, hB_St).

Bromovalerat de metil (8)

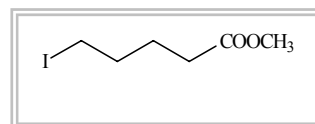
Una solució que contenia àcid bromovalèric (4 g, 22.1 mmol) en metanol (50 mL) amb unes gotes de H₂SO_{4conc} es va deixar a reflux fins que la reacció va quedar



finalitzada. El control de reacció es va realitzar mitjançant GC-FID (60°C (5min), 7°C/min, 300°C (10min)). El metanol es va rotavaporar i el cru de reacció es va redissoldre en AcOEt. Es va rentar amb aigua, i la fase orgànica es va rotavaporar per obtenir un producte oliós corresponent a bromovalerat de metil (4.2 g, 21.5 mmol) amb un rendiment del 95%.

Iodovalerat de metil (9)

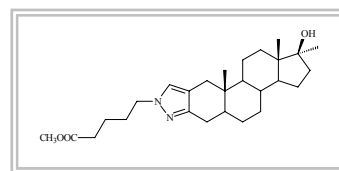
Es va dissoldre el bromovalerat de metil (1 g, 5.13 mmol) en acetona (12 mL). A continuació es va afegir NaI (3.9 g, 25.6 mmol) i es va portar la solució a temperatura de reflux. El



control de reacció es va fer mitjançant GC-FID (50°C (2min), 10°C/min, 300°C (10min)). Al cap de 15 min la reacció estava finalitzada. Es va rotavaporar l'acetona, es va redissoldre el cru de reacció en AcOEt (20 mL) i es van fer una sèrie de rentats amb NaCl_{sat} (2 x 10 mL) i H₂O (2 x 10 mL). La fracció orgànica es va assecar amb MgSO₄ anhidre, filtrar i rotavaporar. Al final es va obtenir el producte desitjat **9** (1.24g, 5.12 mmol) amb un rendiment del 99.8%.

N2'-[5-valerat de metil]-androst-2-eno-[3,2-c]-pirazol-17α-metil-17β-ol (10a)

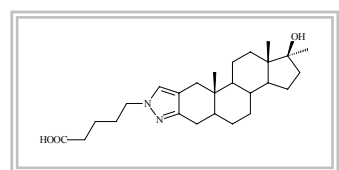
A una solució d'estanozolol (**1**, 0.40 g, 1.21 mmol) en dioxà anhidre (5 mL), se li va afegir iodovalerat de metil (0.35g, 1.4 mmol) i NEt₃ (0.2mL, 1.4 mmol). La solució es va portar a 60°C i es va mantenir a aquesta temperatura,



i amb agitació, durant tota la nit. Passat aquest temps es va rotavaporar i el cru obtingut es va purificar mitjançant CCF preparativa (hexà:AcOEt: NEt₃, 40:60:0.1). D'aquesta manera el dos isòmers identificats com N1'-[5-valerat de metil]-androst-2-eno-[3,2-c]-pirazol-17α-metil-17β-ol (**10b**, **IRf**, 0.05 g, 0.11 mmol, amb un rendiment del 10%) i N2'-[5-valerat de metil]-androst-2-eno-[3,2-c]-pirazol-17α-metil-17β-ol (**10a**, **hRf**, 0.1 g, 0.22 mmol, i amb un rendiment del 20%), van ser aïllats.

N2'-[5-valeric àcid]-androst-2-eno-[3,2-c]-pirazol-17α-metil-17β-ol (11, hB_St)

L'ester **10a**, obtingut anteriorment (0.1 g, 0.22 mmol) es va hidrolitzar amb KOH 1N en una mescla d'aigua/metanol (2 mL). La solució es va agitar a reflux durant tota la nit a temperatura ambient. La reacció, un



cop finalitzada, es va neutralitzar amb HCl_{conc}, i es va abocar a sobre d'una solució de HCl 1N (10mL) per posteriorment extreure amb CH₂Cl₂ (2 x 10 mL). Les fases

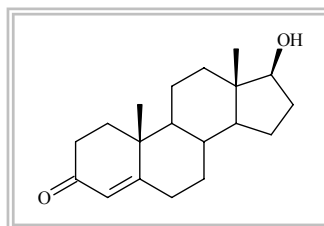
orgàniques combinades es van assecar amb MgSO_4 anhidre. Després de filtrar i rotavaporar es va obtenir el producte desitjat **11** (0.09 g, 0.22 mmol) amb un rendiment del 100%.

9.1.2.1.2 Haptè per testosterona

Haptè tipus A (14, hA_T)

Testosterona (13)

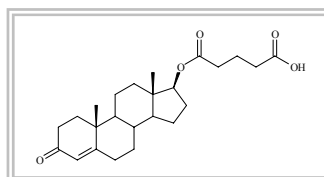
Es va dissoldre l'androstenediona (**12**, 1 g, 3.5 mmol) en metanol (20 mL). A continuació es va afegir, gota a gota, una solució de NaBH_4 (0.2 g, 5.2 mmol) en metanol (10mL). La reacció es va agitar a 0°C durant 30 minuts. El control de la reacció es va realitzar mitjançant CCF



(hexà:Et₂O, 1:1). Un cop finalitzada la reacció es va rotavaporar el metanol, el residu es va redissoldre en CH_2Cl_2 (20mL) i es va rentar amb aigua (2 x 10 mL). La fase orgànica es va assecar amb MgSO_4 anhidre, filtrar i rotavaporar per obtenir la testosterona (0.72 g, 2.48 mmol) amb un rendiment del 71%.

Àcid 17β-hemiglutàric-testosterona (14)

La testosterona (0.5 g, 1.7 mmol) es va dissoldre en THF anhidre (5 mL) i se li va afegir anhídrid glutàric (0.2 g, 1.7 mmol), DMAP (0.2 g, 1.7 mmol) i piridina (1mL). La reacció es va portar a reflux i es va mantenir amb agitació



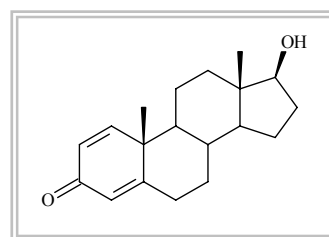
durant tota la nit. La reacció es va seguir per CCF (hexà:Et₂O, 1:1) i quan no va avançar més, es va decidir parar-la. Es va rotavaporar el dissolvent i el cru de reacció es va purificar per columna de sílica gel amb un sistema isocràtic de hexà:AcOEt:HAc_{glacial}, 40:60:0.1. Les fraccions corresponents a l'àcid es van rotavaporar per obtenir el producte desitjat **14** (220 mg, 0.54 mmol) amb un rendiment del 30%.

9.1.2.1.3 Haptens per Boldenona i Metilboldenona

Haptens tipus A (17, hA_B)

Boldenona (16)

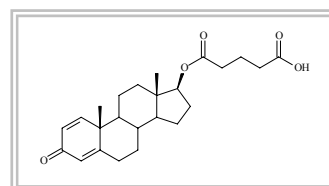
Es van dissoldre l'androstandiendiona (**15**, 1 g, 3.5 mmol) en metanol (20 mL). A continuació es va afegir, gota a gota, una solució de NaBH₄ (0.2 g, 5.2 mmol) en metanol (10 mL). La reacció es va agitar a 0°C durant 30 minuts. El control de la reacció es va realitzar mitjançant CCF



(hexà:Et₂O, 1:1). Un cop finalitzada la reacció es va rotavaporar el metanol, el residu es va redissoldre en CH₂Cl₂ (20 mL) i es va rentar amb aigua (2 x 10mL). La fase orgànica es va assecar amb MgSO₄ anhidre, filtrar i rotavaporar per obtenir la boldenona (0.75 g, 2.6 mmol) amb un rendiment del 75%.

Àcid 17β-hemiglutàric-boldenona (17, hA_B)

La boldenona (0.5 g, 1.7 mmol) es va dissoldre en THF anhidre (5 mL) i se li va afegir anhídrid glutàric (0.2 g, 1.7 mmol), DMAP (0.2 g, 1.7 mmol) i piridina (1 mL). La reacció es va portar a reflux i es va agitar durant tota la nit.

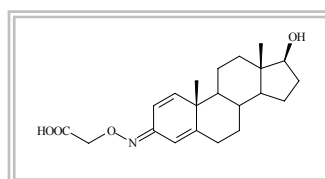


La reacció es va seguir per CCF (hexà:Et₂O, 1:1) i quan no va avançar més, es va decidir parar-la. Es va rotavaporar el dissolvent i el cru de reacció es va purificar en columna de sílica gel amb un sistema isocràtic de hexà:AcOEt:HAc_{glacial}, 40:60:0.1. Les fraccions corresponents a l'àcid es van rotavaporar per obtenir el producte desitjat **17** (270 mg, 0.67 mmol) amb un rendiment del 40%.

Haptens tipus B

3-(carboximetoxiloxima)-boldenona (18, hB_B)

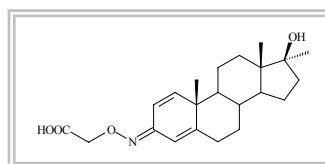
Es va dissoldre la boldenona (0.25 g, 0.87 mmol) en etanol anhidre (30mL). A aquesta solució se li van afegir l'hemihidroclorur de carboximetoxilamina (0.26 g, 1.4 mmol), i NaOH 1N en EtOH (3ml). La reacció es va



desenvolupar a temperatura de reflux durant 5 hores. La reacció es va seguir per CCF (hexà:Et₂O, 1:1). Quan es va donar per finalitzada, es va acidificar amb HCl_{conc} i es va rotavaporar fins a arribar a un 10% del volum inicial. Tot seguit es va abocar el cru de reacció sobre HCl 1N (20 mL) i es va extreure amb Et₂O (2 x 20 mL). La fase orgànica es va rentar amb aigua, i es va assecar amb MgSO₄ anhidre, filtrar i rotavaporar. Per tal de purificar el cru de reacció es va utilitzar una columna sobre sílica gel amb un isocràtic hexà:AcOEt:HAc_{glacial}, 40:60:0.1. Les fraccions corresponents a l'àcid es van rotavaporar per obtenir el producte desitjat **18** (280 mg, 0.78 mmol) amb un rendiment del 90%.

3-(carboximetoxiloxima)-metilboldenona (20, hB_MB)

Es va dissoldre la metilboldenona (**19**, 0.25 g, 0.83 mmol) en etanol anhidre (30mL). A aquesta solució se li van afegir l'hemihidroclorur de carboximetoxilamina (0.24 g, 1.3 mmol), i NaOH 1N en EtOH (3ml). La reacció es va



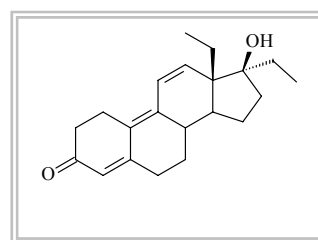
desenvolupar a temperatura de reflux durant 5 hores. La reacció es va seguir per CCF (hexà:Et₂O, 1:1). Quan es va donar per finalitzada, es va acidificar amb HCl_{conc} i es va rotavaporar fins a arribar a un 10% del volum inicial. Tot seguit es va abocar el cru de reacció sobre HCl 1N (20 mL) i es va extreure amb Et₂O (2 x 20 mL). La fase orgànica es va rentar amb aigua, i es va assecar amb MgSO₄ anhidre, filtrar i rotavaporar. Per tal de purificar el cru de reacció es va utilitzar una columna de sílica gel amb un sistema isocràtic hexà:AcOEt:HAc_{glacial}, 40:60:0.1. Les fraccions corresponents a l'àcid es van rotavaporar per obtenir el producte desitjat **19** (260 mg, 0.70 mmol) amb un rendiment del 84%.

9.1.2.1.4 Haptens per Tetrahidrogestrinona

Haptè tipus B

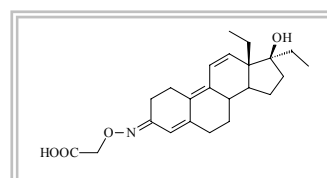
Tetrahidrogestrinona (22)

Es va dissoldre la gestrinona (**21**, 0.2 g, 0.64 mmol) en dioxà anhidre (10 mL) i com a catalitzador es va emprar Pd/BaSO₄ al 5% (70 mg) i es va hidrogenar amb hidrogen gasós a pressió atmosfèrica. La reacció es va seguir per HPLC-UV. Quan la formació de THG va arribar al 80% es va parar la reacció, purgant el sistema amb N₂ i filtrant el cru per Celite®. El dissolvent es va rotavaporar i es va purificar per columna de sílica gel (hexà:AcOEt, 75:25) i a continuació amb un HPLC preparatiu, fent servir una columna en fase reversa, el que va permetre aïllar la THG (72 mg, 0.24 mmol) amb un 40% de rendiment.



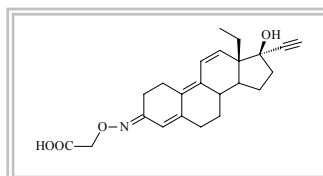
3-(carboximetoxiloxima)-tetrahidrogestrinona (23, hTHG)

La THG (57 mg, 0.18 mmol) es va fer reaccionar amb l'hemihidroclorur de carboximetoxilamina (40.9 mg, 0.18 mmol) en de EtOH (2 mL) amb KOH/EtOH 1N (0.5 mL) a reflux durant una hora. La reacció es va seguir per CCF (hexà:AcOEt, 1:1) i quan la reacció es va completar, el cru de reacció es va acidificar amb HCl_{conc}. El EtOH es va rotavaporar i el residu es va redissoldre amb AcOEt. La fase orgànica es va rentar amb HCl 1N i després es va extreure amb NaOH 1N, dues vegades. La fase aquosa es va acidificar amb HCl_{conc} fins pH àcid i es va tornar extreure amb AcOEt tres vegades. Les fases orgàniques combinades es van assecar amb MgSO₄ anhidre, filtrar i rotavaporar, per obtenir el producte desitjat **23** (38.7 mg, 0.10 mmol) amb un 55% de rendiment.



3-(carboximetoxiloxima)-gestrinona (**24**, hG)

La gestrinone (50 mg, 0.16 mmol) es va fer reaccionar amb l'hemihidroclorur de carboximetoxilamina (41.8 mg, 0.19 mmol) en de EtOH (2mL) amb KOH/EtOH 1N (0.5mL) a reflux durant una hora. La reacció es va seguir per CCF

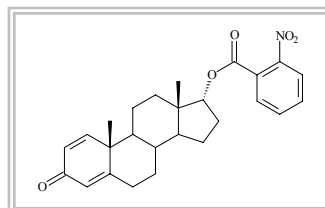


(hexà:AcOEt, 1:1) i quan la reacció es va completar, el cru de reacció es va acidificar amb HCl_{conc}. El EtOH es va rotavaporar i el residu es va redissoldre amb AcOEt. La fase orgànica es va rentar amb HCl 1N. Després, es va extreure amb NaOH 1N, dues vegades. La fase aquosa es va acidificar amb HCl_{conc} fins pH àcid i es va tornar extreure amb AcOEt tres vegades. Les fases orgàniques es van assecar amb MgSO₄ anhidre, filtrar i rotavaporar, per obtenir el producte desitjat **24** (45.7 mg, 0.12 mmol) amb un 75% de rendiment.

9.1.2.2 Síntesi de α -Boldenona

Ortonitrobenzoat de 17 α -boldenona (**24**)

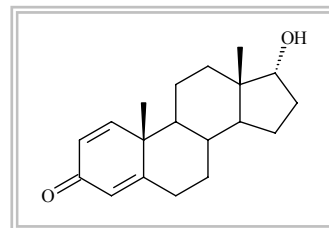
Es va fer reaccionar la boldenona (272 mg, 0.95 mmol) amb l'àcid ortonitrobenzoic (199.4 mg, 1.2 mmol) en toluè (20mL) i en presència de PPh₃ (312.7 mg, 1.2 mmol) i DEAD (0.2 ml, 1.2 mmol). La reacció es va portar a reflux i s'observà que la solució havia passat d'un color



transparent a un groc pàl·lid. La reacció es va controlar per CCF (CH₂Cl₂:Et₂O, 1:1) i al cap d'una hora, la reacció havia finalitzat. Es va rotavaporar el dissolvent i es va purificar per columna de sílica gel, amb un sistema isocràtic de hexà:AcOEt, 1:1. Es van aplegar les fraccions eluides d'interès i es van rotavaporar per obtenir el producte desitjat **24** (320 mg, 0.74 mmol) amb un 78% de rendiment.

17 α -boldenona (25)

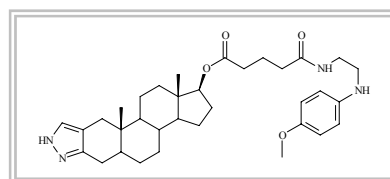
La hidròlisi es va duu a terme dissolent l'èster (300 mg, 0.68 mmol) obtingut anteriorment en una mescla THF/H₂O amb unes gotes de H₂SO₄conc. La mescla de reacció es va deixar a temperatura ambient durant tota la nit. Un cop va finalitzar la reacció es va rotavaporar el



dissolvent i el residu es va redissoldre amb AcOEt i es va rentar amb aigua dues vegades. La fase orgànica es va assecar amb MgSO₄ anhidre, filtrar i rotavaporar per obtenir la α -boldenona (170 mg, 0.6 mmol) amb un 88% de rendiment.

9.1.2.3 Preparació de l'amida hA_St-MTyr (26)

Es va dissoldre hA_St (10.02 mg, 24 μ mol) en DMF anhidre (200 μ L). A continuació, es va afegir NHS (6.71 mg, 60 μ mol) en DMF anhidre (50 μ L) i DCC (24.0 mg, 120 μ mol) en DMF anhidre (50 μ L). La



reacció es va agitar a temperatura ambient fins que es va observar un precipitat blanc. La solució es va centrifugar i el sobrenedant es va addicionar, gota a gota, a una solució de metoxitiramina (3.41 μ L, 24 μ mol) en tampó borat (1.8 mL). La solució resultant es va deixar agitant durant tota la nit a 4°C. El producte es va extreure amb AcOEt i es va rentar dos cops amb aigua. La fase orgànica es va assecar amb MgSO₄ anhidre, filtrar i rotavaporar. Segons les dades de la RMN de hidrogen es va obtenir el producte desitjat.

9.2 Desenvolupament de ELISAs per anabolitzants**9.2.1 Materials i instrumentació**

Els espectres de MALDI-TOF-MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight Mass Spectrometer*) duts a terme en l'anàlisi dels conjugats de proteïnes es van realitzar al Departament de Química Orgànica de la Facultat de Química de la Universitat de Barcelona, amb un aparell Perspective BioSpectrometry Workstation equipat amb el

software Voyager-DE-RP (versió 4.03) de Perspective Biosystems Inc. (Framingham, MA, USA) i Grams/386 (de Microsoft Windows, versió 3.04) de Galactic Industries Corporation (Salem, NH, USA).

El pH i la conductivitat de tots els tampons i solucions emprades foren mesurats en un pH metre pH 540 GLP i un conductímetre LF 340, respectivament (WTW, Weilheim, Alemanya). La plaques de 96 pous de poliestirè emprades en el desenvolupament dels immunoassaigs foren comprades a Nunc (Maxisorp, Roskilde, DK). Les etapes de rentat de les plaques es dugueren a terme en un rentador de microplaques de 96 pous SLY96 PW (SLT Labinstruments GmbH, Salzburg, Austria). Les lectures d'absorbància es van dur a terme en un lector de microplaques SpectramaxPlus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA,USA) a una longitud d'ona fixa de 450nm. Les corbes d'inhibició obtingudes en els assaigs competitiu foren analitzades amb una equació logística de quatre paràmetres, emprant el software SoftmaxPro v2.6 (Molecular Devices) i GraphPad Prism 3.03(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Si no s'especifica el contrari, les dades representades corresponen a la mitja de dues rèpliques com a mínim.

Les membranes tubulars de cel·lulosa Cellu-Sep T3 emprades en els processos de purificació dels conjugats per diàlisi, de 10mm d'amplada i una grandària de porus de 12000-14000Da s'adquiriren a Membrane Filtration Products, Inc (San Antonio, Texas, USA).

Les columnes per eliminació de sals HiTrap™ (5 mL de fase) empaquetades amb Sephadex®G-25 Superfine (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) foren emprades per la purificació dels conjugats a HCH, BSA i HRP de l'hA_St.

9.2.2 Reactius químics i immunoquímics

Les proteïnes emprades en la preparació dels conjugats com l'HCH (Horseshoe Crab Hemocyanin), la BSA (Bovine Serum Albumin), l'OVA (Ovalbumin), la CONA (Conalbumin) i l'HRP (Horseradish Peroxidase) foren adquirides a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Altres reactius immunoquímics com els adjuvants de Freund

complets i incomplets i les immunoglobulines de cabra específiques pel reconeixement de anticossos de conill acoblades a HRP (anti-IgG-HRP) foren, també, adquirides a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). El reactiu de Bradford per a la detecció de proteïnes fou adquirit a BioRad Laboratories GMBH (Munich, Alemanya).

La dicitclohexilcarbodiimida (DCC), la 1-(3-dimetilaminopropil)3-etilcarbodiimida (EDCI) i la N-hidroxisuccinimida (NHS) emprades en els processos de conjugació foren adquirides a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), mentre que el cloroformat d'isobutil i la tributilamina foren adquirits a Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA).

Els diferents esteroides emprats en els estudis d'especificitat dels diferents assaigs desenvolupats foren adquirits a diferents cases comercials. Així la T, la B, la MB, el St, la DHT i la G van ser adquirits per Sequoia Research Products, Ltd (Oxford, UK). D'altres van ser sintetitzats al laboratori com són la THG i l' α -B (vegeu apartat 9.1.2.1.4 i 9.1.2.2, respectivament). La resta van ser subministrats per Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA). També s'ha d'esmentar que el metabòlits del St (16bOH-St i 3'OH-St) van ser gentilment donats per Prof. Dr. Stephany de RIVM (Bilthoven, Holanda). La noretandrolona va ser gentilment donada per la Dra. Ventura del IMIM (Barcelona, Espanya). L'etinilestradiol, trenbolona i estradiol van ser cedits per l'Institut de Salut Pública de Barcelona.

9.2.3 Tampons

El PBS és tampó fosfat 10 mM amb un 0.8% de solució salina a pH 7.5. El PBST és PBS amb un 0.05% de Tween 20. El tampó borat és una solució àcid bòric-borat de sodi 0.2 M a pH 8.7. El tampó de tapissat és carbonat/bicarbonat 0.05 M a pH 9.6. El tampó citrat emprat és una solució 0.04M de citrat sòdic a pH 5.5. La solució substrat conté un 0.01% de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) i un 0.004% de H₂O₂ en tampó citrat. L'aigua emprada va ser de qualitat Mili-Q de un sistema Millipore.

9.2.4 Conjugació dels haptens a molècules transportadores

9.2.4.1 Preparació dels immunògens pels haptens d'anabolitzants a HCH.

Mètode de l'anhídrid mixt

La conjugació dels haptens hB_St, hA_B, hB_MB, hB_THG a través de l'àcid carboxílic als residus de lisina de les proteïnes HCH i BSA pel mètode de l'anhídrid mixt es va dur a terme seguint condicions similars prèviament descrites²⁰⁷. A una solució de cadascun dels haptens (10 µmol) en DMF_{anh.} (200 µL) refredada a 4°C en un bany de gel i es van addicionar consecutivament 11 µmol de tri-n-butilamina i 12 µmol de cloroformiat d'sobutil. Després de mantenir la reacció sota agitació 15 min a 4°C es va deixar evolucionar fins a temperatura ambient i es va mantenir agitant-se durant 30 min més. Passat aquest temps la solució de l'anhídrid mixt es va afegir gota a gota a una solució de la proteïna HCH (10 mg) en tampó borat (1.8 mL) i la reacció d'acoblament es mantingué sota agitació a temperatura ambient durant 4h. Els conjugats es van purificar per diàlisi contra PBS (0.5 mM, 4×5 L) i aigua MilliQ (1×5 L), es van liofilitzar i es van guardar congelats a -40°C. Es van preparar alíquotes de treball de 1 mg/mL en PBS que es van conservar a 4°C. Simultàniament es va preparar el conjugat de BSA seguint el mateix procediment però fent reaccionar 10 µmol dels haptens amb 10 mg de proteïna. El conjugat de BSA s'emprà per avaluar el grau de conjugació assolit en la conjugació per MALDI-TOF-MS (més endavant a l'apartat 9.2.6.1.) així com en els posteriors assaigs de valoració dels anticossos obtinguts durant el protocol d'immunització (més endavant, a l'apartat 9.2.8.1.2.).

Mètode de l'ester actiu

L'haptè hA_St es van conjuguar covalenment a HCH i simultàniament a BSA seguint el mètode de l'ester actiu prèviament descrit⁷² amb lleugeres modificacions. L'haptè (10 µmol) es va dissoldre DMF_{anh.} (140 µL) i s'addicionaren consecutivament diciclohexilcarbodiimida (DCC) (50 µmol en 30 µL en DMF_{anh.}) i N-hidroxisuccinimida (NHS) (25 µmol en 30 µL de DMF_{anh.}). La reacció es va mantenir sota agitació a

temperatura ambient durant 3h, fins a observar l'aparició d'un precipitat corresponent a la dicitclohexilurea, que s'eliminà a continuació per centrifugació. El sobrenedant s'afegí molt lentament sobre una solució de HCH i BSA (10 mg) en tampó borat (1.8 mL) i la reacció d'acoblament es deixà agitant-se a temperatura ambient durant 4h. El conjugat es va purificar per tal d'eliminar-ne les sals fent passar la solució a través d'una columna de Sephadex G-25 i eluint-lo amb aigua MilliQ. Les fraccions que contenien proteïna es recolliren i ajuntaren. Es va mesurar la concentració mitjançant el test de Bradford i es va corregir la concentració fins 1mg/min amb PBS 10mM. La solució es va aliquotar i es va guardar a 4°C.

La preparació de tots els conjugats haptè-HRP es va fer seguint el mètode de l'ester actiu amb la mateixa metòdica, però amb la diferència que per cada 10µmol d'haptè es conjugava a 2 mg d'HRP. Els conjugats a HRP es van purificar per diàlisi de la mateixa manera que s'ha esmentat anteriorment, excepte el conjugat a HRP de hA_St que es va purificar per columna de Sephadex G-25. La solució es va aliquotar i es va guardar a 4°C.

9.2.5 Test de Bradford

Es van preparar rectes de calibratge (de 50 a 0.78 µg/mL) per cada proteïna (BSA i IgG) en PBS 10 mM. Aquestes solucions estàndard així com les mostres corresponents als conjugats proteics (en dilucions seriades) s'afegiren a una microplaca (160 µL/pou) per triplicat seguit del reactiu de Bradford (40 µL/pou). Després d'incubar 15 min a temperatura ambient es mesuraren els valors d'absorbància a una longitud d'ona de 595 nm.

9.2.6 Caracterització dels conjugats. Determinació de la densitat d'haptè.

9.2.6.1 Densitat d'haptè dels conjugats a BSA

La densitat d'haptè dels conjugats de BSA dels haptens sintetitzats, es va calcular mitjançant MALDI-TOF-MS determinant el PM de les proteïnes natives sense conjuguar i comparant-lo amb el del conjugat. Els espectres s'obtingueren barrejant 2 µL d'una

solució de la matriu, l'àcid trans-3,5-dimetoxi-4-hidroxi-cinnàmic (10 mg/mL en una solució de CH₃CN/H₂O 70:30, 0.1% TFA) amb 2 µL d'una solució del conjugat o de la proteïna (5 mg/mL en CH₃CN/H₂O 70:30, 0.1% TFA). La densitat d'haptè (δ haptè) es calculà d'acord amb la següent equació:

$$\delta_{\text{haptè}} = \frac{\text{PM}(\text{Conjugat}) - \text{PM}(\text{Proteïna})}{\text{PM}(\text{haptè})}$$

9.2.6.2 Densitat d'haptè dels conjugats a HRP

La densitat d'haptè dels conjugats a HRP es va calcular per MALDI-TOF-MS, d'una manera molt similar a l'explicada en el punt anterior, però amb la diferència que es va fer servir com a patró intern, la BSA. La proporció optimitzada de BSA i de conjugat d'HRP és de BSA:HRP 4:1. Cada mesura s'ha de calibrar segons la BSA. La densitat d'haptè es calcula de la mateixa manera segons la mateixa equació descrita.

9.2.7 Obtenció dels anticossos policlonals específics

9.2.7.1 Protocol d'immunització

Per cada un dels conills, es van agafar 100µL de la solució de l'antigen d'immunització de concentració 1 mg/mL en PBS i es van portar a un volum de 0.5 mL amb PBS (100 µg d'antigen per conill). Aquesta solució es va emulsionar amb el mateix volum d'adjuvant de Freund complet. L'emulsió (1 mL per conill) s'injectà intradèrmicament per diferents punts del llom dels animals. Passat un mes de la primera injecció, s'estimulà de nou el sistema immune de l'animal inoculant-lo amb 100 µg més de l'antigen emulsionat amb adjuvant de Freund incomplet. Les inoculacions es repetiren cada quatre setmanes aproximadament emprant l'adjuvant de Freund incomplet fins a un total de sis inoculacions, quan ja no s'observà més evolució en el títol d'anticòs.

9.2.7.1.1 Immunització homòloga

Es van fer servir, entre dos i tres conills blancs femelles de la varietat New Zealand amb un pes al voltant de 1-2 Kg que s'inocularen amb cadascun dels immunògens: hA_B-HCH (conills 138 i 153), hB_MB (conills 142 i 143), hA_St (conills 145 i 149), hB_St (conills 147 i 148) i hB_THG (conills 168, 169 i 170) per cada un dels conills, es van agafar 100µL de la solució de l'antigen d'immunització de concentració 1 mg/mL i es van portar a un volum de 0.5 mL amb PBS (100 µg d'antigen per conill) i es va emulsionar amb el mateix volum d'adjuvant de Freund complet. L'emulsió (1 mL per conill) s'injectà intradèrmicament per diferents punts del llom dels animals. Passat un mes de la primera injecció, s'estimulà de nou el sistema immune de l'animal inoculant-lo amb 100 µg més de l'antigen emulsionat amb adjuvant de Freund incomplet. Les inoculacions es repetiren cada quatre setmanes aproximadament emprant l'adjuvant de Freund incomplet amb un total de sis inoculacions, fins que no s'observà més evolució en el títol d'anticòs.

9.2.7.1.2 Immunització heteròloga

Es van generar anticossos policlonals per a la detecció de MB i B. El protocol d'immunització, en aquest cas, es va realitzar de la següent manera: la primera inoculació es va realitzar a cadascun dels conills amb l'haptè de tipus A, i la següent inoculació es va realitzar amb l'haptè de tipus B. Així, alternativament, fins a fer 6 inoculacions en total (tres de tipus A i tres de tipus B, alternats). Per la MB/B són el conills 140 i 141. La preparació dels immunògens es va realitzar de la mateixa manera que es descriu a l'apartat 9.2.7.1.

9.2.7.2 Extracció de les sangs parcials. Avaluació del títol d'anticòs.

Durant el procés d'immunització es van extreure petites quantitats de sang (4-5 mL) per tal d'avaluar la resposta immune. El sèrum preimmune es va extreure just abans d'iniciar el protocol, mentre que l'extracció dels diferents antisèrums parcials es dugué a terme

entre 8-10 dies, passada cada inoculació. Les extraccions es van realitzar a través de l'artèria central de l'orella del conill mitjançant una cànula connectada a un tub hermètic al buit, de tipus vacutainer, proveït amb un gel separador de sèrum. Els antisèrums recollits s'agitaren, es centrifugaren durant 10 min a 10000 rpm i es dividiren en alíquotes de 1.8 mL que es guardaren a -40°C després d'addicionar un 0.02% de NaN₃. Les alíquotes de treball es van guardar a 4°C. L'evolució del títol d'anticossos es va avaluar mesurant la unió dels antisèrum parcials a microplaques tapissades amb els antigens homòlegs conjugats a BSA, seguint un protocol basat en un assaig indirecte no competitiu monodimensional (apartat 9.2.8.1.2.). En el cas de la immunització heteròloga es va avaluar el reconeixement dels dos antigens de BSA als anticossos heteròlegs, és a dir, per 140 i 141 es va mesurar el títol d'anticòs amb hA_B-BSA i hB_MB-BSA.

9.2.7.3 Obtenció de la sang total

Passats deu dies de la darrera inoculació, personal especialitzat dels Laboratoris Farmacèutics Viñas de Barcelona dugué a terme l'exsanguinació final dels conills. Als animals se'ls administrà xilazina com a relaxant muscular amb una solució de concentració 10 mg/mL en solució salina isotònica de NaCl (0.5 mL/Kg) Els animals es van anestesiar emprant una solució formulada comercial que contenia ketamina com a principi actiu (Imalgene 1000 de Merial Laboratoris S.A., Barcelona, Espanya) (0.5 mL/Kg). Seguidament, per tal de canular l'artèria caròtida es va fer una incisió a la pell i el teixit subcutani de la zona traqueal emprant un bisturí. Emprant unes pinces mosquit i unes tisores de punta arrodonida es va separar amb cura el teixit muscular fins a quedar l'artèria completament aïllada. A continuació, delimitant un segment d'uns 4 cm de longitud, es passaren dos fils al voltant de l'artèria. Amb el fil de la part distal es va fer un nus per tal d'evitar la dessagnació del conill en tallar el vas. Tot seguit es va realitzar un tall en direcció obliqua en la zona superior del vas i s'hi introduí la cànula. Es va realitzar un nus amb l'altre fil per tal de fixar la cànula i es va connectar amb el tub vacutainer per tal de procedir a recollir la sang, que es va tractar tal i com es descriu en l'apartat anterior, i es guardà a -40°C. Les alíquotes de treball es conservaren a 4°C.

9.2.8 Assaigs immunoenzimàtics no competitius.

9.2.8.1 Assaig no competitiu en format indirecte

9.2.8.1.1 Protocol general

Les microplaques es tapissen amb el corresponent antigen de tapissat a la dilució adient (100 µL/pou en tampó de tapissat carbonat-bicarbonat), es tapen i s'incuben a 4°C durant tota la nit. Al dia següent les plaques es renten exhaustivament amb PBST (300 µL/pou, 4 vegades) i s'addiciona l'anticòs diluït apropiadament en PBST (100 µL/pou). Després d'incubar 30 min a temperatura ambient, la placa es renta de nou (300 µL PBST/pou, 4 vegades) i s'hi addiciona una solució de Anti-IgG-HRP (1/6000 en PBST, 100 µL/pou) que es deixa incubar 30 min més a temperatura ambient. La placa es renta de nou (300 µL PBST/pou, 4 vegades) i s'afegeix la solució de substrat (100 µL/pou) i s'incuba 30 min a temperatura ambient protegida de la llum. La reacció s'atura afegint H₂SO₄ 4N (50 µL/pou) i es mesuren els valors d'absorbància obtinguts a 450 nm.

9.2.8.1.2 Assaig monodimensional (1D) no competitiu

L'evolució del títol de l'anticòs durant els processos d'immunització, així com l'estudi de l'afinitat dels anticossos obtinguts pels diferent antigens de tapissat preparats, va ser avaluada mitjançant assaigs immunoenzimàtics no competitius en format indirecte. En el cas dels controls durant el procés d'immunització les plaques es van tapissat amb el conjugat homòleg a la immunització corresponent (1 µg/mL, 100µL/pou) i en el cas de la immunització heteròloga es va controlar el procés d'immunització a ambdós conjugats. Es van incubar a 4°C durant tota la nit. Al dia següent es van rentar amb PBST i s'hi van afegir dilucions seriades dels antisèrums parcials obtinguts així com l'antisèrum preimmune (dilucions de 1/1000 a 1/64000 en PBST i zero d'As (només PBST), 100 µL/pou) i es van incubar durant 30 min a temperatura ambient. Les plaques es rentaren i es processaren tal i com es descriu al protocol general (vegeu **apartat 9.2.8.1.1**).

De manera similar per la valoració dels antisèrums finals, les plaques es van tapissat amb els diferents antigens conjugats a BSA a una concentració fixa de 1 µg/mL en tampó

carbonat-bicarbonat (100µL/pou, 1 AT per columna) i s'avaluà la seva afinitat dels antiserums corresponents (dilucions de 1/1000 a 1/64000 en PBST i zero d'As (només PBST), 100 µL/pou). Les plaques es processaren tal i com es descriu al protocol general. Aquelles combinacions As/AT que donaren una resposta major a 0.5 U.A. en les condicions de reactius més concentrades després d'incubar durant 30 min foren seleccionades per a dur a terme els assaigs no competitius bidimensionals (assaigs 2D, apartat 9.2.8.1.3.).

9.2.8.1.3 Assaig bidimensional (2D) no competitiu

Amb aquelles combinacions As/AT seleccionades en l'assaig 1D es van realitzar els assaigs 2D. Es va fer servir una placa per cada combinació. La placa es va tapissar amb 12 dilucions diferents de l'antigen en sentit horitzontal (de 1 µg/mL a 0.9 ng/mL en tampó carbonat-bicarbonat i només tampó, corresponent a zero d'AT, 100 µL/pou) i després d'incubar una nit a 4°C es va rentar i s'hi va afegir una sèrie de dilucions seriadades del corresponent As en sentit vertical (8 dilucions, de 1/500 a 1/32000 en PBST, i zero d'As (només PBST), 100 µL/pou). Es va incubar durant 30 min a temperatura ambient, es van rentar i es van processar tal i com es descriu al protocol general. Es van escollir com a concentracions òptimes d'As i d'AT, aquelles que produïren valors al voltant de 0.7-1 unitats d'absorbància i que estaven al voltant del 70-80% de saturació de reactius.

9.2.8.2 Assaig no competitiu en format directe

9.2.8.2.1 Protocol general

Les plaques es tapissen amb l'As diluït apropiadament en tampó de tapissat (100 µL/pou) es tapen i es guarden a 4°C durant tota la nit. Al dia següent es renten amb PBST (300 µL/pou, 4 vegades) i s'hi addiciona el traçador enzimàtic (TE) diluït adientment en PBST (100 µL/pou). Després d'incubar 30 min a temperatura ambient es renta la placa de nou, i a continuació s'afegeix la solució de substrat (100 µL/pou) i s'incuba 30 min a temperatura ambient protegida de la llum. La reacció s'atura afegint H₂SO₄ 4N (50 µL/pou) i es mesuren els valors d'absorbància obtinguts a 450 nm.

9.2.8.2 Assaig 1D no competitiu

La valoració de l'avidessa dels antiserums finals pels traçadors enzimàtics es va dur a terme mitjançant els assaigs 1D no competitiu en format directe. Les microplaques es van tapissar amb els antiserums finals diluïts en el tampó de tapissat (dilució 1/1000) i es van guardar a 4°C tota nit. Al dia següent es van rentar les plaques i es van afegir 7 dilucions dels TE corresponents (de 2 µg/mL a 0.031 µg/mL en PBST i només tampó, 100 µL/pou) i es va incubar durant 30 min a temperatura ambient. Les plaques es rentaren i es processaren tal i com es descriu al protocol general.

Aquelles combinacions As/AT que donaren valors d'absorbància superiors a 0.5 foren seleccionades per a dur a terme els posteriors assaigs 2D (**apartat 9.2.8.2.3**).

9.2.8.2.3 Assaig 2D no competitiu

Per cada combinació As/TE es va emprar una placa. Cada placa es va tapissar amb 12 dilucions diferents de l'As en sentit horitzontal (de 1/1000 a 1/1024000 en tampó de tapissat i només tampó, corresponent a zero d'As, 100 µL/pou) i després d'incubar una nit a 4°C es va rentar i s'hi va afegir una sèrie de dilucions seriades del TE en sentit vertical (de 2 µg/mL a 0.031 µg/mL en PBST, i zero de TE (només PBST), 100 µL/pou). Es va incubar durant 30 min a temperatura ambient, es va rentar i es va continuar procedint tal i com es descriu al protocol general. Es van escollir com a concentracions òptimes d'As i de TE aquelles que produïren valors d'unitats d'absorbància al voltant de 0.7-1 que estaven al voltant del 70-80% de saturació de reactius.

9.2.9 Assaig immunoenzimàtics competitiu

9.2.9.1 Protocol general per a un ELISA en format directe

Les plaques es van tapissar amb l'As apropiadament diluït en tampó de tapissat (100 µL/pou) durant tota la nit a 4°C. Al dia següent es van rentar i es van afegir les solucions d'analit (el que correspongui) (50 µL/pou en PBST, només PBST per zero d'analit) seguides per les solucions del TE adientment diluït (50µL/pou en PBST). Després de 30

min de competència a temperatura ambient, les plaques es van rentar i s'hi va addicionar la solució de substrat (100 µL/pou). La reacció enzimàtica es va deixar evolucionar durant 30 min i es va aturar amb H₂SO₄ 4N (50 µL/pou). Els valors d'absorbància obtinguts es mesuraren a una longitud d'ona de 450 nm.

La corba de calibratge obtinguda s'ajustà a una equació logística de quatre paràmetres representada per la següent expressió:

$$Y = B + \frac{A - B}{1 + \left(\frac{C}{x}\right)^D}$$

On A és l'absorbància màxima (Abs_{màx}), B és l'absorbància mínima (Abs_{mín}), C és la concentració al 50% de la Abs_{màx} menys Abs_{mín} (IC₅₀) i D és el pendent en el punt d'inflexió de la corba sigmoide.

9.2.9.2 Protocol general per a un ELISA en format indirecte

Les plaques es van tapissar amb l'AT a la concentració corresponent (100 µL/pou en tampó de tapissat) durant tota la nit a 4°C. Al dia següent, es van rentar i s'hi van afegir les solucions d'analit (el corresponent a l'ELISA estudiat) (50 µL/pou en PBST, només PBST per zero d'analit) seguides per la solució de l'As apropiadament diluït (50µL/pou en PBST). Després d'incubar durant 30 min a temperatura ambient, les plaques es van rentar i s'hi va addicionar una solució de Anti-IgG-HRP (1/6000 en PBST, 100 µL/pou) que es va deixar incubar 30 min més a temperatura ambient. La placa es va rentar de nou i seguidament es va afegir la solució de substrat (100 µL/pou) i s'incubà 30 min a temperatura ambient protegida de la llum. La reacció es va aturar afegint H₂SO₄ 4N (50 µL/pou) i es van mesurar els valors d'absorbància obtinguts a 450 nm.

La corba de calibratge obtinguda s'ajustà a l'equació logística de quatre paràmetres definida a l'apartat anterior.

9.2.9.3 Factors estudiats per a la optimització d'un assaig competitiu.

9.2.9.3.1 Influència de la concentració de Tween 20 en l'assaig

Es van preparar solucions de PBST amb diferents proporcions de Tween 20 (0.5%, 0.1%, 0.05%, 0.01%, 0.005%, 0.001% i 0%) amb les quals es van preparar corbes de calibratge de l'analit així com les corresponents dilucions d'As (per format indirecte) o de TE (per format directe) amb cada una d'elles.

9.2.9.3.2 Influència de la força iònica

Es van preparar diverses solucions de PBST amb diferents concentracions de tampó PBS (50 mM, 25 mM, 10 mM, 5 mM i 2.5 mM), que en termes de conductivitat equivalien a valors de 67, 37, 16, 8.5 i 4.5 mS/cm respectivament, i afegint després la quantitat corresponent de Tween 20. Aquests tampons es van emprar per preparar les corbes d'analit i les solucions d'anticòs (per format indirecte) o de TE (per format directe).

9.2.9.3.3 Influència del temps de preincubació

En una placa tapissada, s'hi van afegir 5 corbes de calibratge preparades en PBST, que prèviament havien estat preincubades amb l'anticòs (per format indirecte) o de TE (per format directe) adientment diluït durant diferents temps: 60 min, 45 min, 30 min, 15 min i 0 min (sense preincubar). Un cop addicionada la mescla (100 µL/pou), es deixà competir durant 30 min. A partir d'aquest moment la placa es va processar tal i com es descriu al protocol general.

9.2.9.3.4 Influència del temps de competència

En una placa tapissada, s'hi van afegir la corba de calibratge i l'anticòs (per format indirecte) o de TE (per format directe) a diferents intervals de temps, de manera que s'establissin temps de competència de 15 min, 30 min, 45 min, 60 min i 90 min. La placa es va processar tal i com es descriu al protocol general.

9.2.9.3.5 Influència del pH

Es van preparar solucions de PBST amb valors de pH ajustats a 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 9.5 i 10.5, que posteriorment s'empraren per preparar les corbes d'analit i les solucions d'anticòs (per format indirecte) o de TE (per format directe). Per a realitzar l'experiment, es van tapissar 3 plaques i a cada una d'elles s'hi afegiren les 9 corbes diferents (3 rèpliques de cada corba, una per placa). Les plaques es van processar tal i com es descriu al protocol general.

9.2.9.3.6 Influència dels dissolvents orgànics

L'efecte del dissolvent orgànic es va estudiar afegint la proporció de dissolvent en PBS i posterior addició de la corresponent quantitat de Tween 20. Els dissolvents estudiats van ser: metanol, etanol, acetonitril, 2-propanol, dimetilsulfòxid, dimetilformamida i dioxà. Es van preparar al 2, 5, 10 i 20% de dissolvent orgànic i es va comparar amb la corba de referència sense dissovent. Les plaques es van processar tal i com s'explica en els protocols generals.

9.2.9.4 Estudis d'especificitat dels ELISAs optimitzats

Es va estudiar l'especificitat de cadascun dels assaigs optimitzats enfront d'altres compostos estructuralment relacionats amb els esteroides avaluats. Es van preparar solucions concentrades en DMSO (10mM) de diferents compostos esteroidals just abans de mesurar-les pels ELISAs optimitzats. Les corbes de calibratge per a cada un d'ells es preparà per dilució seriada de la mateixa manera que la corba d'analit (segons el rang de concentracions en les quals es treballa per a cada assaig optimitzat) en el PBST optimitzat. A partir d'aquí es va treballar segons el protocol optimitzat per a cada assaig. Es van determinar els valors de IC_{50} per a cada un dels analits i dels altres compostos i s'empraren per determinar els valors de reactivitat creuada (RC) d'acord amb la següent expressió:

$$\%RC = \frac{IC_{50}(\text{analit})}{IC_{50}(\text{compost}_i)} \times 100$$

9.2.9.5 Estudis de precisió amb mostres dopades cegues

Diferents persones alienes a la realització de l'experiment van preparar diferents mostres cegues en PBST. Per cada mostra es van preparar diferents dilucions seriades (1/2, 1/4 i 1/8) i es mesuraren directament en l'ELISA optimitzat. Les anàlisis es van dur a terme per triplicat. La correlació s'avaluà establint una regressió lineal entre els valors de les mostres dopades i els valors mesurats per l'ELISA.

9.2.9.6 ELISAs optimitzats pel Estanozolol

9.2.9.6.1 *Format directe As145/hA_St-HRP*

Es va tapissar una placa amb l'As145 (1/16000 en tampó de tapissat, 100 µL/pou) i es va deixar incubar tota la nit a 4°C. Al dia següent la placa es va rentar quatre vegades amb PBST i s'hi van afegir les solucions de l'estanozolol (1000nM fins 0.0128nM en PBST 25mM i amb un 0.001% de Tween 20, 50 µL/pou). A continuació es va afegir el TE hA_St-HRP (1/16000 diluït en PBST 25mM amb un 0.001% de Tween20, 50 µL/pou). El temps de competència es va fixar en 30 min. A partir d'aquest moment la placa es va processar tal i com es descriu al protocol general (vegeu **apartat 9.2.9.1**).

9.2.9.6.2 *Format indirecte As147/hB_St-BSA*

Es va tapissar una placa amb l'AT hB_St-BSA (0.039 µg/ml en tampó de tapissat, 100 µL/pou) i es va deixar incubar tota la nit a 4°C. Al dia següent, es van mesclar les solucions estàndard d'estanozolol (1000nM fins 0.0128nM en PBST 10mM amb un 0.0005% de Tween 20, 100 µL/pou) i la solució de l'As147 (1/32000 diluït en PBST 10mM amb un 0.0005% de Tween20, 100 µL/pou). La mescla d'analit-anticòs es va deixar preincubar durant una hora. A continuació la placa es va rentar quatre vegades amb PBST i es varen afegir les solucions analit-anticòs (100 µL) que s'havien preincubat en

una placa a part. Després d'una etapa de competència de 30 min , la placa es va rentar i es va processar tal i com es descriu al protocol general (vegeu **apartat 9.2.9.2**).

9.2.9.6.3 *Format indirecte As147/hA_St-BSA*

Es va tapissar una placa amb l'AT hA_St-BSA (0.125 µg/ml en tampó de tapissat, 100 µL/pou) i es va deixar incubar tota la nit a 4°C. Al dia següent, la placa es va rentar quatre vegades amb PBST i s'hi van addicionar les solucions de l'estanozolol (1000nM fins 0.0128nM en PBST 10mM amb un 0.005% de Tween 20, 50 µL/pou). A continuació es va afegir l'As147 (1/4000 diluït en PBST 10mM amb un 0.005% de Tween20, 50 µL/pou) i el temps de competència es va fixar en 30 min. A continuació la placa es va rentar quatre vegades amb PBST. A partir d'aquest moment la placa es va processar tal i com es descriu al protocol general (vegeu **apartat 9.2.9.2**).

9.2.9.7 ELISAs optimitzats per Boldenona i Metilboldenona.

9.2.9.7.1 *Format directe As141/hA_T-HRP*

Es va tapissar una placa amb l'As141 a una dilució 1/16000 en tampó de tapissat (100 µL/pou) i es va deixar incubar tota la nit a 4°C. Al dia següent la placa es va rentar quatre vegades amb PBST i s'hi va addicionar les solucions de boldenona (2000 nM fins 0.128nM en PBST 10 mM amb un 0.05% de Tween 20, 50 µL/pou). A continuació s'hi va afegir el TE hA_T-HRP (1/16000 diluït en PBST 10 mM amb un 0.05% de Tween20, 50 µL/pou). El temps de competència es va fixar a 30 min. A partir d'aquest moment la placa es va processar tal i com es descriu al protocol general (vegeu **apartat 9.2.9.1**).

9.2.9.7.2 *ELISA directe As143/hB_B-HRP*

Es va tapissar una placa amb l'As143 a una dilució 1/16000 en tampó de tapissat (100 µL/pou) i es va deixar incubar tota la nit a 4°C. Al dia següent la placa es va rentar quatre vegades amb PBST i s'hi va addicionar les dilucions de metilboldenona (1000 nM fins 0.064 nM en PBST 10 mM amb un 0.05% de Tween 20, 50 µL/pou). A continuació s'hi

va afegir el TE hB₂-HRP (1/16000 diluït en PBST 10 mM amb un 0.05% de Tween20, 50 µL/pou). El temps de competència es va fixar en 30 min. A partir d'aquest moment la placa es va processar tal i com es descriu al protocol general (vegeu **apartat 9.2.9.1**).

9.2.9.8 ELISA optimitzat per Tetrahydrogestrinona.

9.2.9.8.1 Format indirecte As170/hG-BSA

Es va tapissar una placa amb l'AT hG-BSA a una concentració de 0.125 µg/ml en tampó de tapissat (100 µL/pou) i es va deixar incubar tota la nit a 4°C. Al dia següent, la placa es va rentar quatre vegades amb PBST i a continuació s'hi va addicionar les dilucions de la THG (1000nM fins 0.0128nM en PBST 10mM amb un 0.05% de Tween 20, 50 µL/pou), i s'hi va afegir el As170 (1/16000 diluït en PBST 10mM amb un 0.05% de Tween20, 50 µL/pou). El temps de competència es va fixar en 30 min. A partir d'aquest moment la placa es va processar tal i com es descriu al protocol general (vegeu **apartat 9.2.9.2**).

9.3 Desenvolupament de mètodes de preparació de mostres biològiques.

9.3.1 Materials i instrumentació

Cartutxos Set-Pak® C18 (Lichrolut® RP-18, 500mg) van ser subministrats per VWR International.

Les IS-SPE, les columnes HiTrap NHS activated Sepharose™ (1 mL de fase) foren subministrades per Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden).

Pel desenvolupament del mètode HTS-SPE-IS NHS-activated Sepharose® 4 Fast Flow (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) activada amb grups NHS i l'acoblament de l'anticòs es va realitzar conjuntament abans de distribuir la fase entre totes les minicolumnes. El procediment HTS-SPE es va realitzar mitjançant el sistema VersaPlate™ 96-Well SPE System (Varian, Palo Alto, CA, USA), consisteix en una base de 96 forats per l'acoblament de 96 tubs buits i un regulador de buit. El regulador de buit

es connectà a una trompa d'aigua. La fase de Sefarosa on estava acoblat l'anticòs es va omplir en minicolumnes buides del sistema Versaplate.

Les mini columnes emprades pel protocol HTS-C18-ELISA per St van ser subministrades per Varian, Palo Alto, CA, USA. Les característiques de la fase son 100 mg de fase C18 a un grandària de partícula de 40 µm.

9.3.2 Estudis d'efecte matriu

les corbes de calibració es van preparar amb la matriu a avaluar. Sense diluir i diluïda a diferents factors de dilució (indicat amb $1/i$, $i=$ factor de dilució) amb el tampó de l'assaig en cada cas (vegeu procediments de l'apartat 9.2.9). Les corbes es van processar seguint els procediments d'ELISA corresponents i es van analitzar comparant-les amb una corba preparada amb el tampó de l'assaig.

9.3.3 Mètodes pel pretractament de mostres

9.3.3.1 Mostres de sèrum

El sèrum (Lyophilized-pooled human sera) va ser subministrat per Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) i es va reconstituir amb aigua qualitat MiliQ (5mL) segons les especificacions del subministrador. El sèrum reconstituït es va emmagatzemar a 4°C fins a fer-lo servir.

9.3.3.1.1 Tractament del sèrum amb etanol.

Al sèrum reconstituït (1mL) se li van afegir una quantitat igual de volum d'etanol absolut (1mL), gota a gota, sota agitació magnètica. El precipitat es va separar per centrifugació i el sobrenedant es va diluir 5 vegades en PBS per tenir una concentració total d'etanol del 10%.

9.3.3.2 Mostres d'orina

Es va procedir a l'avaluació de dos tipus d'orina provinents d'humans i d'origen boví.

- **Orina Humana.** Per tal d'obtenir una mostra representativa d'orina humana, es va procedir a la recollida de mostres d'un conjunt de 14 persones (set homes i set dones) no tractades amb anabolitzants segons les afirmacions dels propis donants. Es va fer una mostra mesclant volums iguals de les catorze orines, es va al·liquotar i es va congelar a -20°C.
- **Orina bovina.** Respecte a les orines d'origen boví, aquestes van ser subministrades per UCD (University College of Dublin, Irlanda) i provenen d'animals tractats i no tractats de forma controlada. Les mostres es van obtenir congelades, però per a una millor manipulació, es va procedir a la descongelació i a la al·liquotació en volums més reduïts. Els protocols d'administració i de recollida de mostra s'especifica a continuació i van ser realitzats per UCD.
 - A) Tractament dels animals: la formulació de l'anabolitzant es va inocular per via intramuscular fent servir grups de tres animals per cada tractament. Les dosis emprades per cada anabolitzant (estanozolol, boldenona i metilboldenona) va ser de 200 mg (n=3) i es van administrar en una injecció única. Es van agafar 3 animals control com blancs de la mostra.
 - B) Recollida de mostra: a partir de la inoculació (temps=0) es van recollir orines després de 1, 3, 6, 9, 12 i 24 hores i 2, 4, 6, 8 i 10 dies després del tractament. El volum de mostra recollida va ser de 1.2 mL (x3) aproximadament.
 - C) Mostres control es van agafar a la mateixa hora que per la resta d'animals tractats. I per als estudis preliminars de l'efecte matriu i desenvolupament del protocol, volums superiors d'orina control es van obtenir fora del període de recollida.
 - D) Mostres *pool* consisteixen a agafar orines de 5 punts consecutius de recollida i mesclar-les a volums iguals. Es va fer el mateix amb les mostres control.

9.3.3.2.1 Tractament de l'orina amb pentà.

Es va afegir pentà a mostres d'orina d'orina bovina (1 mL) fins a un volum corresponent al 40%. La mescla es va agitar vigorosament i es va centrifugar (2min, 10000rpm). El sobrenedant es va descartar i es va tornar a realitzar la mateixa extracció. A continuació es van eliminar les possibles traces de pentà al speed-back (20 min). Es va afegir PBS (9mL) i Tween 20 al 5% (10 µL).

9.3.3.2.2 Tractament de l'orina amb diferent additius.

Mostres d'orina (1mL) es van diluir amb PBS (9 mL), i es van afegir PVP 1% (polivinilpirrolidona), PEG 1% (polietilenglicol), BSA 1% i EDTA 5mM. A continuació es va afegir Tween 20 al 5% (10µL).

9.3.3.2.3 Hidròlisi de les orines

Hidròlisi àcida: es va afegir àcid sulfúric concentrat (52µL) a l'orina (1mL) per tal d'obtenir una concentració de 1M de H₂SO₄. La mescla es va escalfar en un bany de sorra a 100°C durant 1 h. Es va deixar refredar fins temperatura ambient i es va neutralitzar amb NaOH fins pH=7.5. Es va centrifugar i el sobrenadant es va recollir per posteriors estudis.

Hidròlisi bàsica: es va afegir una solució de KOH 15N (200 µL) a l'orina (1mL). Es va escalfar en un bany de sorra durant 30 min a 100°C. Després de que la mostra es refredés, es va neutralitzar fins pH=7.5 mitjançant l'addició de H₂SO_{4conc}. Es va centrifugar per tal de descartar els sòlids en suspensió, i el sobrenadant es va recollir per posteriors estudis.

Hidròlisi enzimàtica: per cada 1 mL d'orina, es va afegir 1mL d'una solució tampó HAc/NaAc (pH=4.6, 0.1M). Es va addicionar 5 µL de β-glucuronidasa (activitat de 109600 unitats β-glucuronidasa/mL i 1170 unitat sulfatasa/mL). Es va deixar incubar a 37°C durant tota la nit. A continuació es va ajustar el pH fins 7.5 amb PBS 100mM.

9.3.3.2.4 Extracció amb toluè

Es va agafar l'orina humana (1mL) i es va afegir toluè (0.5 mL). Aquesta mescla es va agitar durant 5 min i després es va centrifugar per tal d'obtenir dues fases ben diferenciades. L'operació d'extracció es va repetir un cop més. Es van ajuntar les fases orgàniques i es va eliminar el toluè mitjançant una corrent de N₂. Un cop assecat l'extracte es va redissoldre amb EtOH (0.5 mL) i es va diluir 10 vegades amb PBS. Se li va afegir la quantitat corresponent de Tween 20.

9.3.4 Desenvolupament de fases d'extracció selectiva (SPE) per l'anàlisi d'orines per ELISA.

9.3.4.1 Estudis d'efecte matriu i mesura amb els diferents ELISAs.

L'efecte matriu de les mostres carregades a les diferents fases d'extracció selectiva es van avaluar. Les mostres eluïdes es van diluir 10 vegades en PBS 10mM i se li va afegir la quantitat de Tween 20 corresponent a cada assaig optimitzat. Depenent de la concentració de dissolvent orgànic al qual s'ha eluït, la corba de referència es va fer també a la mateixa concentració després de diluir 10 vegades en PBS 10mM. També es van fer dilucions de la mostra eluïda i es va mesurar amb l'ELISA.

9.3.4.2 Procediment C₁₈_Set-Pak® per la detecció d'estanozolol.

Els cartutxos Set-Pak® C18 (Merck Lichrolut® RP-18, 500 mg) van ser condicionats amb MeOH (5mL) i H₂O (5mL) i H₂O amb 0.1% HAc (10mL). Les mostres àcides (portades fins pH=4.6 amb tampó HAc 3M) de PBS, Les mostres preparades en PBS o en orina (10 mL) van ser carregades a la columna. El cartutx va ser rentat amb MeOH:PBS 40:30 (5 mL) i l'estanozolol va ser eluït amb MeOH:PBS 90:10 (5mL). En totes aquestes etapes es va utilitzar un flux aproximat de 2 mL/min. De les fraccions d'elució els tres primers es van ajuntar, es van diluir 10 vegades en PBS i van ser mesurades amb l'ELISA per estanozolol afegint un 9% de MeOH al tampó de l'assaig. Els cartutxos es van poder regenerar amb 30 mL de MeOH.

9.3.4.3 Procediment C₁₈ Versaplate™, HTS-SPE(C₁₈) per la detecció d'estanozolol.

Els cartutxos pel sistema Versaplate™ C₁₈ (Bond Elut Matrix-C₁₈, 100 mg) van ser acondicionats amb MeOH (1 mL) i H₂O (1mL) seguit de H₂O amb 0.1% HAc (2mL). Les mostres controls en PBS, orina o mostres dopades d'orines (0.5 mL) es va ajustar fins a pH 4.6 amb tampó HAc 0.1M (0.5 mL). Els cartutxos es van rentar amb MeOH:PBS 70:30 (1 mL) i el nostre analit va ser eluït amb MeOH:PBS 90:10 (500 µL). Les fraccions eluïdes van ser diluïdes 10 vegades en PBS 10mM i es van mesurar amb l'ELISA afegint un 9% de MeOH al tampó de l'assaig. Les columnes es van regenerar amb MeOH (2 mL).

9.3.4.4 Procediment IAC-SPE per a la detecció de boldenona i metilboldenona

9.3.4.4.1 Preparació de l'immunosorbent

Purificació dels anticossos. Els antiserums 140 i 141 van ser purificats per precipitació afegint una solució (NH₄)₂SO₄ satural fins a un 35% segons està descrit ¹⁸⁰. La fracció d'IgG precipitada es va resuspendre amb PBS 10mM i va ser dialitzada amb PBS 0.5 mM (3 x 5 L) i amb aigua MiliQ (5 L). Un cop dialitzat, els anticossos es van liofilitzar i es va guardar al congelador de -40°C.

Immobilització dels anticossos. Els anticossos purificats segons l'apartat anterior van ser acoblats covalentment a una columna de NHS-activated Sepharose™ segons les recomanacions dels proveïdor (Amersham Biosciences). Resumidament, es va preparar una solució d'IgG (10 mg/mL, 1mL) en el tampó d'acoblament (0.2 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH=8.3) i es va injectar a la columna a un flux aproximat de 1mL/min. La columna es va deixar durant 25 min a temperatura ambient i es va rentar posteriorment amb tres volums de columna amb el tampó d'acoblament. L'excés de grups actius que no es van acoblar amb les IgG van ser desactivats amb una solució d'etanolamina (0.5M, NaCl 0.5M, pH= 8.3, 6mL) i un tampó d'acetat de sodi (0.1M, NaCl 0.5M, pH=4, 6mL) que van ser injectats alternativament a la columna i durant 3 cicles. Finalment la columna es

va rentar amb PBS 10 mM (2mL) i es va guardar amb un tampó 0.05M de Na₂HPO₄ que contenia 0.1% NaN₃ fins utilització.

9.3.4.4.2 Avaluació de la desorció dels analits.

L'estudi de la desorció de l'analit es va fer augmentant progressivament la concentració d'etanol al tampó d'elució. Es va carregar mostres de PBS dopades amb boldenona o amb metilboldenona (1mL) i es van fer successius rentats (1 mL) augmentant la concentració d'etanol a des del 10% fins al 100% amb increments d'un 10%. La concentració de les mostres eluïdes es va determinar amb l'ELISA corresponent fent servir una concentració del 10% d'EtOH al tampó de l'assaig.

9.3.4.4.3 Procediment general de IAC-SPE.

Aquest procediment es va fer servir amb l'IS 141 (immunosorbent preparat amb l'anticòs procedent de l'As141) per l'aïllament de B i MB. Primer, es va condicionar la columna amb PBS 10mM (2 mL) i es va carregar la mostra (PBS, orina control, orina dopada o orina d'animals tractats, 1 mL). A continuació se li va fer una etapa de rentat amb EtOH:PBS 10:90 (1mL) i la mostra es va eluir amb EtOH:PBS 90:10 (1mL). La mostra eluïda es va diluir 10 vegades amb PBS i es va mesurar amb l'ELISA corresponent afegint 9% d'EtOH al tampó de l'assaig. Les columnes es van regenerar amb 5 mL de PBS 10mM.

9.3.4.5 Desenvolupament d'un procediment HTS-IAC-ELISA per a la detecció de estanozolol.

9.3.4.5.1 Preparació de l'immunosorbent.

Purificació dels anticossos. Els antisèrums a purificar en aquest cas van ser pel As145, As147, As148 i As149. El mètode de purificació que es va emprar està descrit a l'apartat 9.3.4.4.1.

Immobilització dels anticossos. Les IgG (Ab145, Ab147, Ab148 i Ab149) purificades van ser acoblades covalentment a una Sepharosa 4 Fast Flow™ activada amb grups NHS segons les recomanacions del subministrador (Amersham Biosciences). Totes les etapes de rentat van ser realitzades en un embut de filtració amb aspiració per buit. La fase de sefarosa (1mL) es va rentar amb HCl 1mM fred (12mL). El gel sec (aproximadament 0.5 mL de volum) es va transferir a un tub de PP i es va barrejar amb una solució de l'anticòs purificat (20 mg/mL, 0.5mL) en el tampó d'acoblament (0.2M NaHCO₃, 0.5M NaCl, pH=8.3). La suspensió es va deixar agitar durant 3h a temperatura ambient en un agitador longitudinal. Després que la reacció d'acoblament tingués lloc, la sefarosa va ser rentada amb el tampó d'acoblament (3mL). A continuació se l'hi varen afegir alternativament una solució d'etanolamina al 0.5M(1mL, 0.5M NaCl, pH=8.3) i una solució d'acetat de sodi 0.1M (1 mL, 0.5M, pH=4), en tres cicles de rentat. Finalment la fase es va rentar amb PBS 10mM (3 mL). L'immunosorbent es va guardar a 4°C en 0.05M Na₂HPO₄ (pH=7) amb un 0.1% de NaN₃ fins la seva utilització.

9.3.4.5.2 Preparació de les columnes mini-IAC

Les mini-IAC columnes (0.2mL de volum mort) van ser preparades per addició de 0.44 mL de la suspensió de la fase preparada anteriorment en columnes buides (format Versaplate™). La suspensió va haver de ser agitada vigorosament abans d'utilitzar-la. Les columnes van ser empaquetades per succió sota buit (trompa de buit) i rentades amb PBS. Un cop el gel va ser drenat sense deixar que quedés sec, un fritat (20 µm de porus) va ser col·locat sobre la fase dintre de les columnes per tal de protegir-la. Les columnes així preparades van ser introduïdes a la base del sistema Versaplate de SPE 96-pouets per construir un sistema d'immunosorbents va ser assembletat que permetés la purificació simultània de les mostres.

9.3.4.5.3 Avaluació de la desorció dels analits.

L'estudi de la desorció es va fer com anteriorment, augmentant progressivament la concentració d'etanol. Les condicions òptimes per eluir l'analit es van investigar carregant mostres de PBS dopades amb estanozolol (1 mL) i fent successius rentats (1

mL) augmentant la concentració d'etanol des del 10% fins al 100% amb increments del 10%. La concentració de les mostres eluïdes es va determinar amb l'ELISA corresponent fent servir un PBS amb un 10% d'EtOH.

9.3.4.5.4 Procediment general de HTS-SPE-IAC.

Aquest procediment es va aplicar per a la detecció d'estanozolol en orina bovina amb immunosorbents preparats amb l'anticòs 145. Al sistema Versaplate se li va acoblar un regulador de buit per tal de controlar el flux pel qual passa la mostra a través de les minicolumnes. El flux es va regular per tal d'obtenir un valor d'entre 1-2 mL/min. Primer es va condicionar la columna amb PBS 10mM (2 mL) i es va carregar la mostra (PBS, orina control, orina dopada i orina d'animals tractats, 1 mL). A continuació es va procedir al rentat amb una solució de EtOH:PBS 10:90 (1mL) i a continuació la mostra es va eluir amb EtOH:PBS 80:20 (1 mL). La mostra eluïda es va diluir 10 vegades en PBS i es va mesurar amb l'ELISA fent servir el tampó de l'assaig amb un 8% d'EtOH. Les columnes es van regenerar amb 5 mL de PBS 10mM.

9.4 Producció i avaluació de Polímers d'Empremta Molecular (MIPs)

9.4.1 Materials i instrumentació.

La testosterona (T), l'estanozolol (St), la boldenona (B) i la metilboldenona (MB) van ser subministrats per Sequoia Research Products (Regne Unit). L'àcid metacrílic (MAA), dimetilmetacrilat de l'etilenglicol (EGDMA) i la progesterona (P) van ser adquirits a Aldrich (Milwaukee, Estats Units). L'iniciador 2,2'-azobisisobutironitril (AIBN) va ser comprat a Fluka (Neu-Ulm, Suïssa). Els dissolvents emprats foren de qualitat HPLC subministrats per Merck (Darmstadt, Alemanya). Tots els reactius van ser destil·lats abans d'utilitzar-los i l'iniciador va ser recristal·litzat en èter dietílic. Vials de 20mL de vidre van ser emprats com a reactors de polimerització. Les columnes utilitzades per a la avaluació cromatogràfica van ser model Omnifit 6.6mm x 100mm i foren subministrades per Omnifit (Cambridge, Anglaterra).

Les anàlisis realitzades es van fer per HPLC-UV. El sistema constava d'una bomba Merck Hiotachi L-7100, detector diode array L-7455, injector automàtic L-7200 (Merck, Darmstadt, Alemanya). Els cromatogrames van ser processats amb el programa HSM Software (Merck, Darmstadt, Alemanya). Per al rentat dels polímers es va emprar bomba Waters model 510.

Els espectres de RMN de ^1H i ^{13}C es van fer amb un espectròmetre Varian Inova-500 (500MHz per ^1H i 125MHz per ^{13}C , Varian Inc., Palo Alto, CA, Estats Units). El forn emprat per a les polimeritzacions va ser un Digitronic (JPSelecta, Abrera, Espanya). Per a la trituració dels polímers es va fer servir un Mixer Mill MM200, i per a la tamització un SieveShaker As200 Basic, ambdós proveïts per Retsch GmbH (Haan, Alemanya).

Els estudis de modelatge molecular es dugueren a terme amb el software Hyperchem 6.0 (Hyperube Inc, Gainesville, FL, USA). Les teòriques geometries i distribucions electròniques es van avaluar per a la testosterona i els potencials monòmers fent servir models de mecànica quàntica semiempírica MNDO i PM3. Els càlculs es feren emprant criteris de química computacional estàndards.

9.4.2 Experiments de RMN

Tots els espectres es van adquirir en un equip Varian Inova-500 a la freqüència de 500 MHz pel ^1H . El dissolvent emprat per a l'obtenció dels espectres va ser el CDCl_3 , on es va fer servir com a pic de referència el TMS (tetrametilsilà) a una concentració aproximada del 0.05% (referència 0ppm, 0Hz). La relació entre la testosterona i els diferents compostos model es va corregir mesurant la relació molar que hi ha entre les àrees del H4 de testosterona i protons característics dels compostos model.

9.4.2.1 Valoració de l'afinitat per RMN

9.4.2.1.1 Cribatge de potencials monòmers amb testosterona.

Es va preparar una solució de testosterona en CDCl_3 (40mM). En paral·lel es van preparar diferents solucions en CDCl_3 dels compostos model a dos concentracions (40mM i

400mM). Els compostos model avaluats foren l'àcid metacrílic, la metóxitiramina, la 2-aminopiridina, la 2-(aminoetil)-piridina i l'etilendiamina. A continuació, a cada 350 μL de compost model se li van afegir 350 μL de la solució de testosterona i es va procedir a obtenir l'espectre de RMN de ^1H .

9.4.2.1.2 Valoració per RMN de l'afinitat MAA i MAAM amb testosterona.

Es va preparar una solució de testosterona en CDCl_3 (40mM). Es va preparar unes solucions d'àcid metacrílic (MAA) i metacrilamida (MAAM) a una concentració de 1000mM en CDCl_3 . D'aquesta solució es van fer dilucions binàries en CDCl_3 fins a arribar a una concentració de 15.62mM. A continuació, a cada 350 μL de cada dilució de monòmer se li van afegir 350 μL de la solució de testosterona. i es va procedir a obtenir l'espectre de RMN de ^1H .

9.4.2.1.3 Determinació de l'estequiometria del complex per ajust del Job per RMN.

En aquest cas es va preparar un conjunt d'onze mostres. La preparació de la sèrie es va realitzar mitjançant la mescla de volums complementaris a 1 mL d'una solució de testosterona de 50 mM i de MAA de 50 mM de manera que la fracció molar de MAA es va trobar compresa entre 0 i 1 a intervals de 0.1 (per exemple, la dissolució de fracció molar 0.1 de MAA consta de 100 μL de la solució de MAA i 900 μL de la dissolució de testosterona). A continuació es van obtenir els espectres de RMN de ^1H i es van mesurar el desplaçament químics del hidrògens 4 i 17.

9.4.3 Preparació dels Polímers d'Empremta Molecular.

En vials de 20 mL es va dissoldre la testosterona (50.35 mg, 0.17mmol) en cloroform anhidre (1.5 mL). A continuació es va afegir MAA (118 μL , 0.70mmol) i EGDMA (790 μL , 4.18mmol). El vial es va tancar hermèticament i a través del sèptum de silicona es van fer cicles successius de buit i Ar per tal de purgar el sistema. A continuació es va afegir

l'AIBN (14.8 mg, 0.09 mmol) dissolts en el porogen anhidre. Seguidament es va tornar a purgar el sistema amb cicles de buit-Ar i es va posar el vial al forn a 60°C durant 12 hores. Per la preparació del polímer control es va procedir de la mateixa manera, però en absència de testosterona. La massa rígida de polímer obtingut es va treure del vial, i es va procedir a l'eliminació del porogen mitjançant evaporació a pressió reduïda. Tot seguit es va moldre el polímer en un molí de boles de desplaçament lineal i es va passar per la tamissadora, agafant la mida de partícula comprès entre 20-63 µm.

9.4.4 Avaluació dels Polímers d'Empremta Molecular

9.4.4.1 Rentat dels polímers produïts

Un cop tamisats els polímers, es van omplir amb 500 mg de polímer a unes columnes Omnifit. Les columnes es van empaquetar i es van acoblar a un sistema de cromatografia líquida de mitja pressió per tal de fer els rentats. A la sortida de la columna se li va acoblar un recollidor automàtic on es va recollir fraccions de 1 mL. Les fraccions recollides es van analitzar per HPLC-UV fins no observar sangrat de la molècula motlle.

9.4.4.2 Caracterització cromatogràfica (afinitat i selectivitat)

Un cop rentats i empaquetats el polímers es van acoblar a un sistema d'HPLC-UV. La columna es va acondicionar amb ACN. Les condicions estan descrites a la taula, on λ és la longitud d'ona de monitorització i Ci és la concentració dels compostos a injectar (i) al polímer. Les mateixes condicions

Fase Mòbil	ACN
Flux	1 ml/min
Vol. injecció	10 µL
Ci	0.2 mM
λ	238 nm

es van aplicar tant pel polímers específic (MIP) com el polímer blanc (NIP). L'avaluació es va fer injectant solucions de testosterona, boldenona, metilboldenona, estanozolol, estrona i progesterona i observant el temps de retenció al qual eluïen.

9.5 Aproximació al desenvolupament d'un microarray amb RAc per atrazina.

9.5.1 *Biologia Molecular*

9.5.1.1 Materials i instrumentació

Tant els bacteris com els plàmidis que es van utilitzar, estaven disponibles al laboratori: IPR 7, 23 i 53, pASK84, pJUKA1 i bactèria electrocompetent JM83. Enzims de restricció BstEII i NcoI foren subministrats per New England Biolabs (Ipswich, MA, EEUU). Ligasa T4 DNA va ser subministrat per Fermentas (Burlington, Ontario, Canada) i New England Biolabs (Ipswich, MA, EEUU). Colorant per realitzar els gels d'agarosa *Loading dye R0611* Fermentas (Burlington, Ontario, Canada). Marcador de pes molecular *Mass ruler DNA ladder Mix SM0403* Fermentas (Burlington, Ontario, Canada).

Tampons i medis: Medi LB (10 g de tripton, 5 g de llevat i 10 g de NaCl en 1L d'aigua), medi LB-A (2.5 g Tripton, 1.25 de llevat, 2.5 g de NaCl i 3.75 g d'agar en 250 mL d'aigua). LB-Amp (10 ml de LB + 10 µL d'ampicil·lina [solució de 1mg/mL]).

9.5.1.2 Medi del cultiu bacterià

Per al creixement dels bacteris es va utilitzar un medi ric: el LB a la seva forma líquida o sòlida (amb un 1.5% d'agar). El medi es va esterilitzar per autoclau (121°C, 20 min). Per la selecció dels bacteris transformades es va afegir ampicil·lina fins arribar a una concentració de 10 µg/mL (sempre després d'autoclavar i quan la temperatura del medi hagi baixat dels 50°C).

En el cas del medi sòlid, després de l'addició de l'antibiòtic, s'afegeix el LB-agar en les plaques de Petri i es van deixar solidificar a l'aire en una atmosfera estèril com per exemple en una campana de flux laminar.

Condicions de cultiu: en placa a 30°C sense agitació; líquid a 30°C agitant a 220 rpm. Condicions d'emmagatzematge: en placa a 4°C durant 4-6 setmanes. Líquid amb glicerol al 50% a -80°C per anys.

9.5.1.3 Extracció del DNA plasmíctic

A partir d'un cultiu líquid saturat de bacteris es pot obtenir el seu plàsmid aïllat per ser digerit o transformat. Es van utilitzar kits comercials minipreps de la cas QiaGen (QIAprep®, Qiagen GmbH, Alemanya). Es va partir d'un cultiu de 10 mL de LB-Amp amb agitació orbital (150 rpm) a 30°C durant 16 h. Es va centrifugar i el *pellet* es va resuspendre amb una solució subministrada amb el kit comercial de Qiagen. A partir d'aquest punt es va seguir les especificacions de la casa comercial per produir la lisis cel·lular i posterior purificació.

9.5.1.4 Digestió dels plàsmids

Els fragment de DNA que ens interessaven es van obtenir a partir del plàsmid mitjançant enzims de restricció. Les condicions de digestió dels diferents enzims provats (temperatura, temps volums, etc..) van ser seguint les especificacions que donen el subministrador.

9.5.1.5 Electroforesis de DNA en gels d'agarosa

Aquesta tècnica ha estat emprada per visualitzar els plàsmids obtinguts, així, com el fragments que provenen de les digestions. En la majoria dels casos es va utilitzar una concentració d'agarosa NEEO en tampó TAE al 0.8% (50 mM Tris, 1mM acetat, 2 mM d'EDTA, pH 8.5) amb una concentració de bromur d'etidi (EtBr) de 0.05%. Com a marcador es va utilitzar *Mass ruler DNA ladder Mix SM0403* i es va aplicar una corrent de 25 V. L'emissió de la llum es va realitzar mitjançant una làmpada d'UV i es va captar amb una càmera fotogràfica.

9.5.1.6 Extracció del DNA del gel d'agarosa

La digestió ens condueix generalment a l'obtenció de fragments de diferents mesura que se separen electroforèticament. Per aïllar els fragments desitjats es va retallar la banda que ens interessava del gel i es va extreure el DNA de l'agarose. Es va utilitzar un kit comercial Qiaquick Gel Extraction kit de Qiagen. Es van seguir les especificacions del fabricant.

9.5.1.7 Lligació

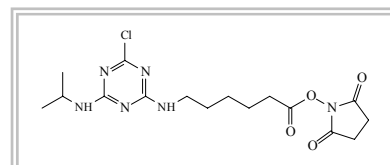
La lligació es va realitzar amb una mescla de vector:inserir a diferents proporcions molars 1:1, 1:3, 1:6 en un medi de reacció de lligació subministrat amb la ligasa T4 DNA (Fermentas). La lligació es va realitzar segons les especificacions del subministrador. Per tal de extreure el DNA es va realitzar segons protocol E.3 de Maniatis *et al.*²⁰⁸. L'extracció va consistir en afegir 10 µL d'una solució de PCI (Fenol, cloroform i isopropanol, mescla comercial) a la mescla de la lligació. Es va agitar i centrifugar i varem agafar la fase aquosa, i la fracció orgànica es va tornar a extreure amb tampó 10 mM de Tris amb 1 mM d'EDTA a pH 7.6. Aquesta operació es va repetir 2 cops. Realitzar una neteja de la mostra per tal d'eliminar les sals mitjançant uns filtres Microcon de Millipore amb una membrana de 50000 Da.

9.5.1.8 Electroporació

Es va deixar un volum aproximat de 5 µL. Com a precaució, tot el procés es va realitzar en fred, aproximadament a 0°C, en la mesura del possible. A la solució anterior, es va afegir 10 µL de bactèria electrocompetent JM83. A continuació afegir aquest solució a una cubeta per electroporació i aplicar un voltatge de 2500V en 4.5 ms. Immediatament després es va afegir un medi de SOC (Invitrogen). Incubar a 37°C 1 h. Després d'aquest temps es centrifuga i el *pellet* es redissol en 200 µL de medi SOC i aplicar en plaques de LB-A.

9.5.2.3 Ester actiu de l'haptè d'atrazina (28)

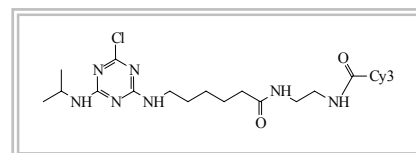
L'haptè d'atrazina (2 mg, 6.6 μmol) es va dissoldre en DMF anhidre (100 μL). A continuació se li varen afegir NHS (1.9 mg, 16.5 μmol) en DMF anhidre (50 μL) i DCC (6.8 mg, 33 μmol) en DMF anhidre



(50 μL). Es va deixar agitant fins a observar un precipitat blanc. Simultàniament es va seguir la reacció per HPLC-UV. Quan la reacció va finalitzar es va centrifugar i el sobrenedant que contenia el producte desitjat es va mantenir en solució per la posterior etapa sintètica.

9.5.2.4 Cy3-EDA-Atr. (29)

El Cy3-EDA (0.8 mg, 1.1 μmol) es va dissoldre en un tampó carbonat a pH=9.6 i a continuació es va afegir, gota a gota, l'ester actiu de l'haptè d'atrazina obtingut anteriorment. La reacció es va



seguir per HPLC-UV i es deixà a temperatura ambient durant tota la nit. Un cop finalitzada la reacció es va purificar per HPLC fent servir una columna de fase reversa (Lichrospher RP-18 150x4.6 mm, mida de partícula 5 μm). Al final de tot el procés es va obtenir el desitjat Cy3-EDA-Atr (0.5mg, 0.5 μmol) amb un rendiment del 45%. Producte caracteritzat per MALDI-TOF fent servir com a matriu acid dihidroxibenzoic (DHB). (Pes teòric, [M+1]: 956.7, pes trobat, [M+1]: 956.74).

9.5.3 Immunoassaig sobre superfícies de vidre

9.5.3.1 Material i equips

L'Atrazina i els immunoreactius per realitzar l'experiment immunoenzimàtic estaven disponibles al laboratori. Els tampons tenien la mateixa formulació com en l'**apartat 9.2.3** sinó es diu el contrari. L'H₂O era de qualitat Mili-Q i els dissolvent emprats eren d'alta qualitat. El GPTS (glicidoxipropiltrimetilsilà) i el NiSO₄ foren subministrats per

Aldrich. El lector de plaques era Sunrise 96-well plate reader (Tecan Trading AG, Suïssa).

9.5.3.2 Protocol general de funcionalització de les superfícies de vidre

El rentat de les superfícies de vidre es va realitzar amb una sèrie de solucions per tal de tenir el vidre preparat per la seva funcionalització. Aquest rentats van consistir en submergir les superfícies de vidre en una mescla MeOH:HCl_{conc} 1:1 durant 30 min. A continuació es va rentar amb H₂O. Després es va submergir en una solució de H₂SO_{4conc} durant 30 min, i passat aquest temps es va tornar a rentar amb H₂O. Finalment, es va submergir en una solució de NaOH al 10% durant 1 h. A continuació es va rentar bé amb H₂O i amb EtOH.

Un cop netes i activades les superfícies, es va procedir a la seva funcionalització mitjançant una solució de GPTS al 2.5% en una solució etanòlica amb 10 mM d'Hac (3 mL per portaobjectes de vidre). Aquesta mescla es va deixar incubar durant 3 h a T_{amb}. Les superfícies es van assecar.

A continuació es va afegir una solució de NTA a 0.15 g/mL en tampó NaHCO₃ 0.5 M (3 mL per porta). Es va incubar tota la nit a T_{amb}. El dia següent es va rentar amb H₂O. Després, es va afegir una solució de NiSO₄ 10 mM en tampó glicina 5 mM a pH 8 (3 mL) i es va incubar durant 1 h a T_{amb}. Es va rentar amb H₂O.

9.5.3.3 Assaig immunoenzimàtic sobre superfícies de vidre

Sobre les superfícies funcionalitzades es va afegir una solució de Fab en PBS (1 µg/mL) en tampó PBS (4 mL) i es va deixar incubar 4 h. Es va rentar amb PBST. A través d'una màscara de silicona es van afegir unes solucions preparades de Atr-HPR a diferents concentracions (2, 1, 0.5 µg/mL) i es van fer un assaig d'inhibició amb una concentració alta d'analit (1000 µg/L). Es van deixar els blancs adients per controlar l'adsorció no específica. Es va incubar durant 2 h. Es va rentar amb PBST i a continuació es va afegir

el substrat (1 h). Es va transvasar cadascun dels pouets a una placa (100 μ L) i es va afegir 50 μ L de H₂SO₄ 4N per procedir a la seva lectura (λ =450 nm).

9.6 Determinació d'hormones anabolitzants per LC-MS-MS

Aquesta tasca es va realitzar a l'Agència de Salut Pública de Barcelona. El LC-MS-MS consta de un equip Waters 2695 LC acoblat a un espectròmetre de masses de triple quadrupol Micromass Quattro Micro API. Els solvents utilitzats eren de qualitat HPLC. Es van preparar els patrons dels diferents productes injectats en MeOH a una concentració de 10 mM. La testosterona-d₃ va ser subministrat per Aldrich, i venia com a solució de dimetoxietà a una concentració de 100 ppm. La columna emprada era una XTerra MS C₁₈ 2.5 μ m, 21x50 mm.

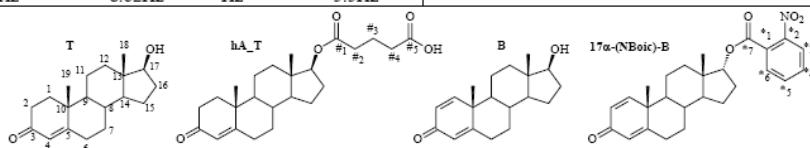
10 Annex: Caracterització estructural

10.1 RMN

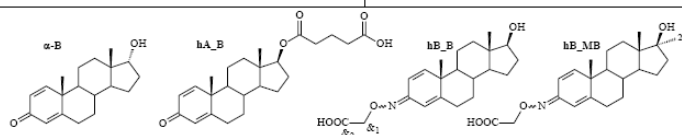
La assignació de les senyals es va realitzar a partir de diferents espectres de RMN tan de ^1H com de ^{13}C , així com, monodimensionals com bidimensionals. A continuació s'enumeren els experiments realitzats per l'assignació completa dels compostos sintetitzats: ^1H , ^{13}C , DEPT (**D**istortionless **E**nhancement by **P**olarization **T**ransfer), gdqCOSY (**g**radient **d**ouble-**q**uantum-filtered **C**orrelation **S**pectroscopy), gHSQC (**g**radient **H**eteronuclear **S**ingle-**Q**uantum **C**orrelation **S**pectroscopy), HMBC (**H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**orrelation), NOE 1D (**N**uclear **O**verhauser **E**ffect monodimensional), NOESY (**N**uclear **O**verhauser **E**ffect **S**pectrometry) i TOCSY (**T**otal **C**orrelation **S**pectroscopy).

Caracterització estructural

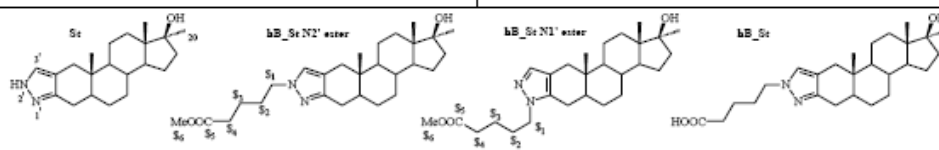
¹ H	T	hA_T	B	17 α -(<i>o</i> -NB _{out})-B	¹ H	T	hA_T	B	17 α -(<i>o</i> -NB _{out})-B
C1	2.03, 1.7	2.03, 1.70	7.05, d, 10.2Hz	7.03, d, 10.2Hz	C18	0.81, s	0.83, s	0.81, s	0.88, s
C2	2.34	2.40	6.23, d, 10.1 Hz	6.21, d, 10.2Hz	C19	1.19, s	1.18, s	1.23, s	1.25, s
C3	-	-	-	-	C20				
C4	5.73, s	5.74, s	6.06, s	6.06, s	C&2				
C5	-	-	-	-	C&1				
C6	2.39, 2.27	2.28, 2.38	2.35, 2.45	2.36, 2.48	C*7				-
C7	1.00, 1.84	1.03, 1.84	1.00, 1.95	1.13, 1.98	C*1				-
C8	1.58	1.59	1.66	1.65	C*2				-
C9	0.93	0.95	1.04	1.09	C*3				7.82
C10	-	-	-	-	C*4				7.64
C11	1.43, 1.60	1.41, 1.58	1.68, 1.75	1.69, 1.77	C*5				7.60
C12	1.09, 1.86	1.19, 1.79	1.11, 1.88	1.12, 1.82	C*6				7.73
C13	-	-	-	-	C#1		-		
C14	0.97	1.07	0.94	1.34	C#2		2.39, t, 6.67Hz		
C15	1.31, 1.63	1.36, 1.67	1.32, 1.61	1.33, 1.82	C#3		1.96, qt, 6.67Hz		
C16	1.43, 2.08	1.52, 2.18	1.44, 2.06	1.75, 2.30	C#4		2.45, t, 7.56Hz		
C17	3.65, t, 2.04 Hz	4.61, t, 8.62Hz	3.68, t, 1.99 Hz	5.04, d, 5.5Hz	C#5		-		



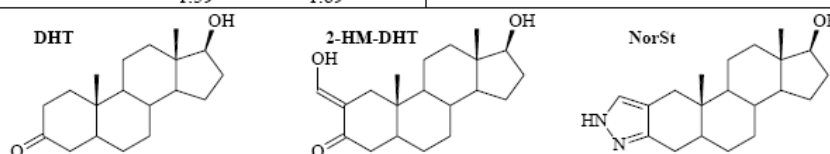
¹ H	α -B	hA_B	hB_B	hB_MB	¹ H	α -B	hA_B	hB_B	hB_MB
C1	7.07, d, 9.6	7.06, d, 10.16Hz	6.52, d, 10.0 Hz, 6.35, d, 9.8 Hz, 6.78, d, 10.2 Hz	6.50, d, 10.2 Hz, 6.36, d, 10.2 Hz, 6.84, d, 10.0 Hz	C15	1.23, 1.81	1.41, 1.69	1.32, 1.84	1.32, 1.60
C2	6.23, d, 9.9Hz	6.25, d, 10.53Hz	6.18, d, 10.1 Hz	6.15, d, 10.1 Hz	C16	1.12, 2.22	1.48, 2.18	1.73, 2.28	1.30, 1.56
C3	-	-	-	-	C17	3.76, d, 6.1Hz	4.60, t, 8.32Hz	3.66, t, 5.6Hz	-
C4	6.07, s	6.09, s	6.63, s 5.91, s	6.65, s 5.95, s	C18	0.75, s	0.86, s	0.84, s	0.93
C5	-	-	-	-	C19	1.26, s	1.24, s	1.24, s	1.20
C6	2.36, 2.49	2.48	2.28, 2.50	2.32, 2.46	C20				1.19
C7	1.12, 2.01	1.04, 1.98	1.02, 1.82	0.99, 1.90	C&2				-
C8	1.64	1.70	1.65	1.66	C&1			4.65, s 4.68, s	4.66, s 4.65
C9	1.11	1.07	1.05	1.02	C#1		-		
C10	-	-	-	-	C#2		2.46, t, 7.08Hz		
C11	1.74, 1.84		1.55, 1.71	1.59, 1.75	C#3		1.96, qt, 6.91Hz		
C12	1.58		1.74, 1.88	1.76, 1.83	C#4		2.46, t, 8.14Hz		
C13	-	-	-	-	C#5		-		
C14	1.41	1.05	1.35	1.19					



¹ H	St	hB_St-N2' ester	hB_St-N1' ester	hB_St	¹ H	St	hB_St-N2' ester	hB_St-N1' ester	hB_St
C1	2.60, 2.10	2.08, 2.58	2.12, 2.59	2.09, 2.57	C14	1.19	1.19	1.21	1.19
C2	-	-	-	-	C15	1.60, 1.27	1.27, 1.59	1.28, 1.61	1.26, 1.60
C3	-	-	-	-	C16	1.72	1.70, 0.70	0.93, 1.76	0.70, 1.71
C4	2.25, 2.57	2.25, 2.58	2.17, 2.48	2.25, 2.56	C17	-	-	-	-
C5	1.57	1.55	1.59	1.57	C18	0.85	0.88	0.89	0.88
C6	1.35, 1.56	1.58	1.39, 1.61	1.34, 1.54	C19	0.74	0.75	0.73	0.74
C7	1.29, 1.51	1.31, 1.52	1.34, 1.54	1.31, 1.53	C20	1.21	1.20	1.24	1.21
C8	1.43	1.42	1.45	1.43	C3'	7.22	7.07	7.26	7.05
C9	0.81	0.80	0.83	0.80	CS1	-	4.03	3.99	4.02
C10	-	-	-	-	CS2	-	1.85	1.85	1.85
C11	1.40, 1.65	1.42, 1.63	1.44, 1.68	1.40, 1.65	CS3	-	1.62	1.62	1.61
C12	1.71, 1.82	1.70	1.77, 1.84	1.73	CS4	-	2.31	2.34	2.41
C13	-	-	-	-	CS5	-	-	-	-
					MeS6	-	3.65	3.67	-

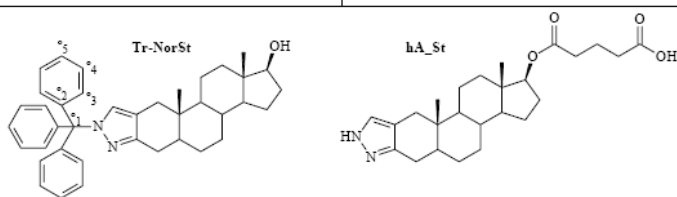


¹ H	DHT	2-HM-DHT	NorSt	¹ H	DHT	2-HM-DHT	NorSt
C1	1.36, 2.01	1.98, 2.32	2.14, 2.65	C12	1.08, 1.83	1.14, 1.90	1.15, 1.89
C2	2.31, 2.40	-	-	C13	-	-	-
C3	-	-	-	C14	0.97	0.94	1.03
C4	2.10, 2.27	1.82, 1.07	2.34, 2.66	C15	1.23, 1.59	1.25, 1.58	1.32, 1.65
C5	1.54	1.45	1.62	C16	1.46, 2.07	2.04, 1.42	1.50, 2.13
C6	1.32	1.20, 1.48	1.29	C17	3.64, t, 8.51Hz	3.65	3.71
C7	0.91, 1.73	1.69, 0.87	1.40, 1.65	C18	0.75, s	0.75	0.81
C8	1.46	1.36	1.45	C19	1.03, s	0.77	0.78
C9	0.75	0.76	0.90	C20	-	-	-
C10	-	-	-	C3'	-	8.62	7.31
C11	1.37, 1.63	1.40, 1.59	1.48, 1.69				

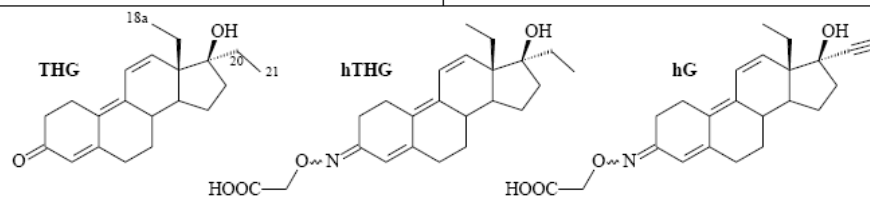


Caracterització estructural

¹ H	Tr-NorSt	hA_St	¹ H	Tr-NorSt	hA_St
C1	2.12, 2.58	2.12, 2.63	C16	1.52, 2.20	1.57, 2.22
C2	-	-	C17	3.72	4.67
C3	-	-	C18	0.82	0.86
C4	2.33, 2.71	2.34, 2.62	C19	0.79	0.81
C5	1.67	1.63	C20	-	-
C6	-	-	C3'	7.02	7.30
C7	1.37, 1.67	1.34, 1.62	C°1	-	-
C8	1.45	1.45	C°2	-	-
C9	0.89	0.89	C°3,5	7.34	-
C10	-	-	C°4	7.21	-
C11	1.41, 1.62	1.42, 1.64	C#1	-	-
C12	1.17, 1.83	1.23, 1.79	C#2	-	2.41
C13	-	-	C#3	-	1.98
C14	1.06	1.11	C#4	-	2.42
C15	1.34, 1.65	1.37, 1.73	C#5	-	-

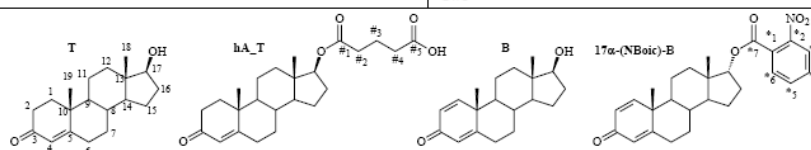


¹ H	THG	hG	hTHG	¹ H	THG	hG	hTHG
C1	2.87	2.34	2.46	C13	-	-	-
C2	2.50	2.51, 2.42	2.60, 2.53	C14	1.73	1.94	1.70
C3	-	-	-	C15	1.71, 2.05	1.39, 1.64	2.10, 1.67
C4	5.77	5.78, 6.42	5.88, 6.46	C16	1.60	2.55, 2.79	2.73
C5	-	-	-	C17	-	-	-
C6	2.59, 2.51	2.39, 2.41	2.53	C18	1.45, 1.65	1.37, 1.60	1.50, 1.77
C7	1.92, 1.28	1.18, 1.76	2.46	C18a	0.98	0.93	1.06
C8	2.56	2.39	2.54	C20	1.52, 1.79	-	1.65, 1.46
C9	-	-	-	C21	1.05	2.44	0.97
C10	-	-	-	C&1	2.87	4.52, 4.51	4.64, 4.62
C11	6.59	6.50	6.57	C&2	-	-	-
C12	6.37	6.26, 6.30	6.23, 6.28				

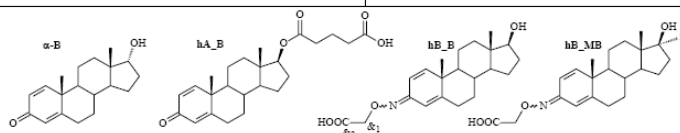


Caracterització estructural

¹ H	T	hA_T	B	17 α -(<i>o</i> -NB _{oat})-B	¹ H	T	hA_T	B	17 α -(<i>o</i> -NB _{oat})-B
C1	35.65	35.64	156.08	155.92	C18	11.06	12.04	11.40	16.84
C2	33.94	32.94	127.75	127.78	C19	17.42	17.37	18.97	18.97
C3	199.60	199.79	186.63	186.43	C20				
C4	123.85	123.89	124.13	124.29	C&2				
C5	171.35	171.30	169.37	169.24	C&1				
C6	32.80	32.73	33.02	33.02	C*7				166.23
C7	31.55	31.45	33.38	33.93	C*1				125.52
C8	35.75	35.37	35.84	36.08	C*2				148.54
C9	53.93	53.66	52.75	52.09	C*3				123.92
C10	38.67	38.61	43.36	43.43	C*4				132.89
C11	20.65	20.51	22.74	22.54	C*5				132.01
C12	36.44	36.61	36.56	31.65	C*6				130.27
C13	42.82	42.50	43.84	44.56	C#1		172.84		
C14	50.49	50.19	50.36	49.35	C#2		33.85		
C15	23.34	23.46	23.78	25.05	C#3		19.93		
C16	30.41	27.49	30.65	29.68	C#4		32.86		
C17	81.56	82.57	81.72	84.45	C#5		178.59		

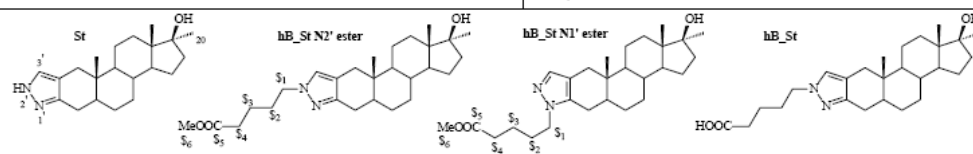


¹ H	α -B	hA_B	hB_B	hB_MB	¹ H	α -B	hA_B	hB_B	hB_MB
C1	156.19	155.91	149.21	148.36	C15	24.74	23.65	23.43	23.54
C2	127.95	127.47	144.40	144.15	C16	32.34	27.44	30.45	31.61
C3	186.38	186.50	121.23	120.35	C17	80.01	82.39	81.82	81.97
C4	124.39	123.86	114.43	113.94	C18	16.97	12.16	11.38	14.22
C5	169.13	169.17	161.54	160.79	C19	18.74	18.18	18.45	19.83
C6	32.87	33.34	115.79	115.41	C20				25.99
C7	32.89	33.04	108.35	109.73	C&2			173.89	174.2
C8	35.77	35.29	156.14	156.07	C&1			70.43	70.35
C9	52.12	52.18	151.53	151.67	C#1		172.78		
C10	43.58	43.55	31.83	31.61	C#2		32.83		
C11	22.35	22.34	33.15	33.31	C#3		19.93		
C12	31.07	36.50	35.43	36.76	C#4		32.93		
C13	45.37	42.75	52.45	52.61	C#5		178.24		
C14	47.80	49.83	43.43	43.39					
			36.43	38.96					
			43.65	45.79					
			50.15	50.21					

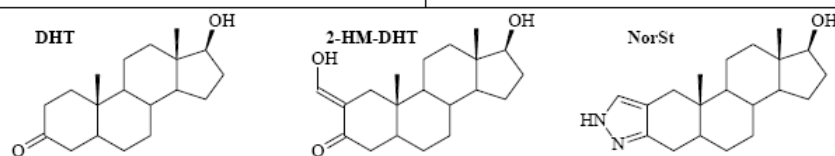


Caracterització estructural

¹ H	St	hB_St- N2' ester	hB_St- N1' ester	hB_St	¹ H	St	hB_St- N2' ester	hB_St- N1' ester	hB_St
C1	34.64	34.79	35.07	34.81	C14	50.44	50.53	50.51	50.54
C2	114.4	114.97	115.08	114.87	C15	23.14	23.13	23.29	23.14
C3	131.2	147.69	136.60	147.73	C16	31.36	31.34	31.44	31.35
C4	26.34	27.39	25.99	27.43	C17	81.60	81.66	81.68	81.56
C5	42.36	42.50	42.22	42.53	C18	13.79	13.74	13.87	13.75
C6	29.18	29.15	29.22	29.13	C19	11.35	11.39	11.41	11.35
C7	31.51	31.44	31.61	31.34	C20	25.54	25.58	25.77	25.56
C8	36.5	36.56	36.58	36.60	C3'	141.0	126.75	136.85	126.45
C9	53.71	53.75	53.79	53.76	CS1		51.36	48.21	51.35
C10	36.4	36.30	36.34	36.25	CS2		29.76	29.54	29.65
C11	20.74	20.63	20.78	20.61	CS3		21.95	22.03	21.99
C12	38.72	38.96	38.93	38.94	CS4		33.43	33.47	33.35
C13	45.27	45.32	45.37	45.33	CS5		173.23	173.43	178.32
					MeS6		51.47	51.53	

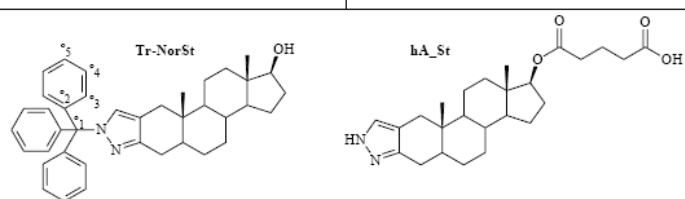


¹ H	DHT	2-HM-DHT	NorSt	¹ H	DHT	2-HM-DHT	NorSt
C1	38.54	37.44	34.93	C12	36.61	35.34	36.99
C2	38.11	107.76	115.20	C13	42.96	42.76	43.09
C3	212.06	183.53	142.92	C14	50.80	50.77	51.12
C4	44.64	36.46	26.69	C15	23.35	23.33	23.71
C5	46.71	40.38	42.64	C16	30.46	30.39	30.73
C6	28.76	28.03	29.82	C17	81.80	82.52	82.23
C7	31.22	31.17	29.36	C18	11.11	10.99	11.19
C8	35.41	35.48	36.00	C19	11.45	11.37	11.64
C9	53.89	53.52	54.10	C20	-	-	-
C10	35.71	36.13	36.75	C3'		189.35	132.95
C11	21.00	20.97	20.96				

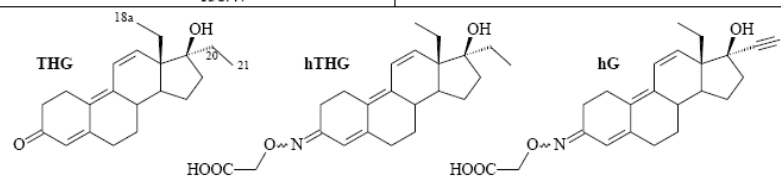


Caracterització estructural

¹ H	Tr-NorSt	hA_St	¹ H	Tr-NorSt	hA_St
C1	34.79	34.95	C16	30.43	27.49
C2	113.83	115.23	C17	82.34	82.91
C3	148.47	142.63	C18	11.78	12.05
C4	27.79	27.34	C19	11.64	11.53
C5	42.65	42.62	C20	-	-
C6	29.26	29.43	C3'	130.29	132.92
C7	29.20	29.16	C°1	77.89	
C8	35.53	35.53	C°2	143.63	
C9	53.76	53.76	C°3,5	127.59	
C10	36.22	36.06	C°4	130.22	
C11	20.61	20.73	C#1		32.89
C12	36.98	36.95	C#2		19.92
C13	42.98	42.48	C#3		33.45
C14	51.04	50.67	C#4		172.92
C15	23.73	23.51	C#5		178.00



¹ H	THG	hG	hTHG	¹ H	THG	hG	hTHG
C1	24.45	27.13	27.26	C13	50.82	51.32	50.81
C2	36.78	31.58	31.85	C14	49.3	49.08	49.21
C3	199.62	154.94, 158.27	156.01, 159.03	C15	34.64	22.11	34.45
C4	123.7	118.04, 112.19	117.9, 111.7	C16	22.74	21.94	22.18
C5	157	127.50, 127.79	152.32, 150.84	C17	84.41	78.17	84.25
C6	31.79	31.21	31.44	C18	31.01	22.76	24.45
C7	27.37	27.19	27.46	C18a	7.71	10.71	11.39
C8	37.94	37.49	37.63	C20	24.6	88.13	30.64
C9	142.13	136.93, 138.03	148.02, 145.11	C21	11.55	72.34	7.70
C10	127.20	144.14, 146.72	127.65, 127.29	C&1		70.17	69.93
C11	124.89	124.53	124.6	C&2		172.44	173.41
C12	141.07	136.82, 138.47	138.17				



10.2MS

10.2.1 HRMS

Compost	Teòric	Mesura	ppb
α -B	286.193280	286.194061	-2.7
hA_B	400.224974	400.224213	0.8
hA_T	403.2473	403.2484	-2.7
hB_B	359.209659	359.209480	0.2
hB_MB	373.225309	373.226413	-3.0
hA_St	428.267508	428.267683	-0.4
26	562.3645	562.2645	0
hB_St	428.303894	428.303776	0.3
THG	312.208930	312.208123	2.6
h_G	381.194009	381.192417	4.2
h_THG	385.225309	385.226913	-4.2

10.2.2 MS

Compost	Pes Molecular	Íons moleculars m/z		Col·lisió /V	Ions fills m/z (abundància %)
		[M+1]	[M+23]		
hA_T	402.53	403.4		70	
hA_B	400.51	401.1	423.1	70	
hB_B	359.46	360.1	382.1	70	286.1
hB_MB	373.49	374.1	396.1	70	300.2, 245.1
α-B	286.41		309.0	70	
hB_St-OMe N2'	442.64	443.2	465.2	70	
hB_St-OMe N1'	442.62	443.2	465.2	70	
hB_St	428.58	429.2	451.2	70	
Tr-St	570.81		593.2	70	329.1, 243.1
2-HM-DHT	318.45	319.2		70	
NorSt	314.47	315.1		70	
Tr-NorSt	556.79	579.2		70	243.1, 315.1
hA_St	428.57	429.2	451.2	70	315.1
THG	312.45	313.1	335.1	70	
hG	381.47	382.1	404.1	70	308.1
hTHG	385.50	386.3		70	

10.3 IR

Compost	ν (KBr, cm^{-1})
hA_B	1656 ($\text{C}_3=\text{O}$), 1604 (Δ^4), 1594 (Δ^1), 1728 ($\text{C}_{\#5}=\text{O}$), 1697 ($\text{C}_{\#1}=\text{O}$), 2938 (OH_{acid})
hB_B	1661 ($\text{C}_3=\text{N}$), 1733 ($\text{C}_{\&2}=\text{O}$), 2922 (OH_{acid})
hB_MB	1661 ($\text{C}_3=\text{N}$), 1733 ($\text{C}_{\&2}=\text{O}$), 2925 (OH_{acid})
hA_St	1731 ($\text{C}_{\#5}=\text{O}$), 1697 ($\text{C}_{\#1}=\text{O}$), 2933 (OH_{acid})
hB_St	1718 ($\text{C}_{\text{S}5}=\text{O}$), 2938 (OH_{acid})
THG	1650 ($\text{C}_3=\text{O}$), 1711 (Δ^{11}), 1565 (Δ^4), 1666 ($\text{C}_3=\text{N}$), 1591 (Δ^4), 1726 ($\text{C}_{\&2}=\text{O}$), 2938 (OH_{acid}), 3293 ($\equiv\text{C}_{20}\text{-H}$)
h_G	1717 (Δ^{11}), 1732 ($\text{C}_{\&2}=\text{O}$), 1650 ($\text{C}_3=\text{N}$), 1567 (Δ^4), 2938 (OH_{acid})

11 Conclusions

1. Malgrat que les hormones anabolitzants han estat molt estudiades, des del punt de vista químic i fisiològic, encara se segueix investigant per sintetitzar noves estructures amb espectres d'activitat diferents. Aquest ha estat el cas de la THG, sorgit durant el transcurs d'aquesta tesi doctoral.

Respecte a la utilització d'aquests anabolitzants, tot i que es tracta de productes que estan regulats i prohibits, tant en el camp agroalimentari com l'esportiu, les dades analitzades i recollides (Laboratori de Comunitaris de Referència, laboratori Oficial del COI, notícies de xarxes de distribució il·legal d'aquestes substàncies trobades per la policia durant aquest període, etc.) demostren que se segueixen utilitzant de forma fraudulenta, d'aquí que sigui interessant continuar amb la investigació de noves metodologies i tècniques per detectar aquests anabolitzants.

2. Tot i que les estructures dels haptens d'immunització es varen dissenyar amb l'objectiu d'obtenir anticossos amb especificitat de classe (ampli espectre de reconeixement), els resultats obtinguts demostren que per assolir aquest objectiu

Conclusions

és determinant tenir en compte la longitud del braç espaciador. Així doncs, els haptens hA_St, hB_St, hA_B, amb una distància important entre el punt d'unió a la proteïna i el determinant antigènic majoritàriament exposat al sistema immune, van generar anticossos força específics tot i que els càlculs teòrics semblaven indicar que en aquesta zona no hi havien diferències importants amb d'altres compostos estructuralment relacionats. Per altra banda, pel cas dels haptens amb un braç espaciador més petit com hB_MB i hG, van generar anticossos amb un espectre de reconeixement més ampli.

3. Les característiques fisicoquímiques dels anabolitzants esteroidals (quantitat de àtoms de l'estructura, una geometria plana i rígida o la hidrofobicitat) han resultat ser molt adients per produir anticossos d'alta afinitat, tal com es desprèn de l'excel·lent detectabilitat aconseguida en els immunoassaigs desenvolupats per hormones anabolitzants com l'estanozolol, la boldenona, la metilboldenona o la tetrahydrogestrinona.
4. S'ha demostrat que emprant combinacions heteròlogues d'anticòs i d'antigen de tapissat (o traçador enzimàtic) en els assaigs immunoquímics competitiu, s'obté un espectre de reconeixement molt més ampli que quan les combinacions d'anticòs i d'antigen de tapissat (o traçador enzimàtic) són homòlogues. Aquest fet està en consonància amb altres casos descrits a la bibliografia on a les combinacions heteròlogues, en presentar l'anticòs una afinitat més baixa pel competidor, permet que altres compostos relacionats puguin desplaçar l'equilibri interaccionant amb l'anticòs.
5. Tot i que l'objectiu era produir anticossos amb una gran afinitat per la MB, els resultats obtinguts en fer immunitzacions heteròlogues per la Boldenona i la Metilboldenona, indiquen que s'obté un antisèrum on hi predominen fonamentalment dos conjunts de famílies de clons productors d'anticossos. Per una banda un conjunt, produït per l'hapté hA_B tindria una més gran avidesa per unir-se a la B que a la MB, i per altre banda un altre conjunt d'anticossos, segurament produïts per l'hapté hB_MB tindria més avidesa per la MB que per la

- B. Aquest comportament mix de l'antisèrum es posa d'evidència en funció del competidor utilitzat.
6. De les matrius avaluades, l'orina ha estat de les més complexes, fet que impedeix que els esteroides anabolitzants puguin ser quantificats directament per ELISA d'acord amb els requeriments de detectabilitat establerts per les regulacions. Per aquest motiu, va ser necessari introduir alguna etapa d'extracció i/o purificació de les mostres per tal de minimitzar les interferències no específiques produïdes per la matriu.
 7. L'efecte matriu ha pogut eliminar-se, efectivament, mitjançant mètodes molt simples com ara una extracció amb dissolvents (extracció no específica) i/o una extracció amb immunosorbents (extracció específica), la qual cosa ha determinat que el fet d'introduir una etapa de preparació de mostra no reduís significativament l'elevada eficiència de processament de mostres que tenen els mètodes ELISA en microplaca. Per altra banda aquests tractaments ens han permès arribar a l'objectiu de detectar aquests compostos segons les normatives que regulen els seus nivells de concentració.
 8. S'ha desenvolupat un nou mètode per al disseny racional de la mescla de polimerització per obtenir un polímer d'empremta molecular que presenta unes bones propietats d'afinitat i selectivitat. El fet d'utilitzar models computacionals, per a l'estudi de la interacció molecular, més les dades experimentals procedents dels assaigs d'afinitat i estequiometria mitjançant tècniques de RMN han permès optimitzar la formulació final del polímer d'empremta molecular. D'acord amb aquestes dades s'ha preparat un MIP pel reconeixement selectiu de la testosterona i la boldenona.

12 Publicacions, projectes i congressos

12.1 Articles sorgits d'aquesta tesi doctoral

- *Preparation of Antibodies for the New Designer Steroid, Tetrahydrogestrinone (THG), and Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).* J.-Pablo Salvador, Francisco Sanchez-Baeza and M.-Pilar Marco. Acceptat al Anal. Chem.
- *A New Methodology for the Rational Design of Molecularly Imprinted Polymers.* J.-Pablo Salvador, M.-Carmen Estevez, M.-Pilar Marco and Francisco Sánchez-Baeza. Acceptat al Analytical Letters.
- *Production of antibodies for the quantitative detection of the anabolically active androgens 17 β -boldenone and methylboldenone.* K. Kramer, J.-Pablo Salvador, A. Hubauer, R. Lausterer, M.-Pilar Marco. Acceptat al Analytical Letters

- *Development of an ELISA against Stanozolol. The effect of the immunizing and competitor haptens in the assay performance.* J.-Pablo Salvador, Francisco Sánchez-Baeza and M.-Pilar Marco. Enviat al Anal. Chem.
- *Towards developing a colloidal-based localized plasmon resonance (LPR) biosensor: Optimisation and operation with analytical methodology.* Mark P. Kreuzer , Romain Quidant, J.-Pablo Salvador, M.-Pilar Marco, and Gonçal Badenes. Enviat al Biosensors and Bioelectronics.
- *Development and evaluation of C18 and immunosorbent solid-phase extraction using a High-throughput Screening (HTS) methods with immunochemical analysis of stanozolol in bovine urine.* J.-Pablo Salvador, Francisco Sanchez-Baeza and M.-Pilar Marco, en preparació.
- *Heterologous vs. Homologous immunisation strategies: effect on the immunoassay specificity for boldenone and methylboldenone.* J.-Pablo Salvador, Begoña Varela, Francisco Sanchez-Baeza and M.-Pilar Marco, en preparació.
- *Development and evaluation of an immunosorbent solid-phase extraction for the immunochemical analysis of boldenone and methylboldenone in bovine urine.* J.-Pablo Salvador, Begoña Varela, Francisco Sanchez-Baeza and M.-Pilar Marco, en preparació.

12.2 Altres publicacions

- *Chapter 5: Immunochemical Determination of Industrial Emerging Pollutants.* M.-Carmen Estevez-Alberola, Hector Font, Mikaela Nichkova, J.-Pablo Salvador, Begoña Varela, Francisco Sanchez-Baeza and M.-Pilar Marco. (CL) In: Emerging Organic Pollutants in Wastewaters and sludge (Vol. 2). Series: Handbook Of Environmental Chemistry Vol.5 (Water Pollution), (2005): 119-180. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2005.
- *Chapter 6: Immunochemical Determination of Pharmaceuticals and Personal Care Products as Emerging Pollutants.* M.-Carmen Estevez-Alberola, Hector Font, Mikaela Nichkova, J.-Pablo Salvador, Begoña Varela, Francisco Sanchez-Baeza and M.-Pilar Marco. (CL) In: Emerging Organic Pollutants in Wastewaters and sludge (Vol. 2). Series: Handbook Of Environmental Chemistry Vol.5 (Water Pollution), (2005): 181-244. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2005.
- *Chapter 2.8: Application of bioassays/biosensors for the analysis of pharmaceuticals in environmental samples.* J.-Pablo Salvador, Javier Adrian, Roger Galve, Daniel G. Pinacho, Mark Kreuzer, Francisco Sánchez-Baeza and M.-Pilar Marco. In Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle. Elsevier. Publicat.

12.3 Relació de publicacions sorgides de col·laboracions

- *Quantitative detection of doping substances by a localised surface plasmon sensor.* Kreuzer, M. P.; Quidant, R.; Badenes, G.; Marco, M.-P., *Biosensors and Bioelectronics* **2006**, 21, (7), 1345-1349.
- *Screening of boldenone and methylboldenone in bovine urine using disposable lectrochemical immunosensors.* Huihui Lu, Gra' inne Conneely, Miloslav Pravda, George G. Guilbault. *Steroids* 71 (2006) 760–767

12.4 Projectes sorgits a conseqüència del treball realitzat en aquesta tesi doctoral

- *Inmunosensores basados en nanoestructuras resonantes como dispositivos de alarma frente a hormonas androgénicas (HINAN)*
Fundación Areces
2 de Marco de 2005 hasta 28 de Febrero de 2008
Cantidad concedida 60.000 €
Total Proyecto: 130.000 €
Coordinador: Dra. Silvia Soira (ICFO)
Investigador principal en IIQAB-CSIC: Dr. Roger Galve
Nº de Grupos participantes: 2
- *Desarrollo de plataformas NanoBio-analíticas basadas en reconocimiento molecular mediante detección óptica y/o electrónica (NanoBioMol).*
MEC: Acción Estrategica de Nanotecnologia, NAN2004-09415-C05-02
Enero 2006-Enero 2009
Cantidad concedida:
Total proyecto:
Coordinador: Prof. Joseph Samitier (PCB-CREBEC)
Investigador principal en IIQAB-CSIC: Dra. M.-Pilar Marco
Nº de Grupos participantes: 5.
- *Nanoestructuras magnéticas ordenadas con aplicación en dispositivos biosensores optomagnéticos (Bioptomag).*
Proyectos intramurales de frontera, CSIC.
Enero 2006-Enero 2008
Cantidad concedida: 54000 €.
Total proyecto: 182000€.
Coordinador: Prof. Manuel Vázquez Villalabeitia (ICMM)
Investigador principal en IIQAB-CSIC: Dra. M.-Pilar Marco
Nº de Grupos participantes: 4.

12.5 Congressos

- Maig 2006 (Antwerp, Belgium). *Fifth international Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis*
ORAL: “*Immunochemical detection of anabolic steroids*”.
J.-Pablo Salvador, F.J. Sánchez-Baeza and M.-Pilar Marco.
POSTER: “*Development of an ELISA for Tetrahydrogestrinone (THG) determination*”.
J.-Pablo Salvador, F.J. Sánchez-Baeza and M.-Pilar Marco.
POSTER: “*Development of HTS-IS-ELISA for the detection of Boldenone, MethylBoldenone, Stanozolol and their metabolites*”.
J.-Pablo Salvador, B. Varela, F.J. Sánchez-Baeza and M.-Pilar Marco.
POSTER: “*A Localized Plasmon Resonance Nanoscale Optical Immunosensor for Stanozolol*”.
Mark P. Kreuzer, J.-Pablo Salvador, Romain Quidant, Gonçal Badenes and M.-Pilar Marco.
- Març 2005 (Barcelona, Spain). *2nd Nanospain Workshop*
POSTER: “*Quantitative detection of doping substances by localised surface plasmon resonance*”.
M.Kreuzer, R. Quidant, G. Badenes, J.-Pablo Salvador and M.-Pilar Marco
- Octubre 2003 (Lisbone, Portugal). *First World Congres on Synthetic Receptors*
POSTER: “*Development of SPE procedures based on molecular imprinted polymers (MISPE) for improved analysis of food safety related compounds*”.
M.C. Estevez*, J.P. Salvador, J. Adrian, M.P. Marco and F.J. Sánchez-Baeza
POSTER: “*Nuclear magnetic resonance (NMR) and computational chemistry (CMM) data in the rational design of new molecular imprinted polymers (MIPs)*”.
J.P. Salvador*, M.C. Estevez, M.P. Marco and F.J. Sánchez-Baeza.

13 Referències

1. IUPAC, The Nomenclature of Steroids. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/steroid/> **2005**.
2. Steroids, In *Rodd's chemistry of carbon compounds.*, Elsevier: 1970; Vol. II, Part D, p 197.
3. David, K.; Dingemans, E.; Freud, J.; Laqueur, E., Crystalline male hormone from testes (testosterone), more active than androsterone prepared from urine or cholesterol. *Z. physiol. Chem.* **1935**, 233, 281-2.
4. David, K., *Acta Brevia Neerland* **1935**, 5, 108.
5. Butenandt, A.; Hanisch, G., Über Testosterone. Umwandlung des Dehydroandrosterons in Androstendiol und Testosterone; ein Weg zur Darstellung des Testosterons aus Cholestrin. *Z. Physiol. Chem.* **1935**, 237, 89.
6. Ruzicka, L.; Wettstein, A., Sexualhormone VII. Über die künstliche Herstellung des Testikelhormons. Testosteron (Androsten-3-on-17-ol.). *Helv. Chim. Acta* **1935**, 18, 1264.
7. Strike, D. P.; Herbst, D.; Smith, H., *J. Med. Chem.* **1967**, 10, 446.
8. Ruzicka, L.; Goldberg, M. W.; Rosenberg, H. R., Sexualhormone X. Herstellung des 17-Methyltestosteron und anderer Androsten und Androsterinderivate. Zusammenhänge zwischen chemischer Konstitution und männlicher Hormonwirkung. *Helv. Chim. Acta* **1935**, 18, 1487-98.
9. Birch, A. J.; Mukherji, S. M., *J. Chem. Soc.* **1949**, 2531.
10. Tanabe, K.; Takasaki, R.; Hayashi, R.; Morisawa, Y.; Hashimoto, T., Steroid series. XVII. New synthetic routes to 19-norsteroids. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1967**, 15, 27-37.

Referències

11. Meystre, C.; Frey, H.; Voser, W.; Wettstein, A., Gewinnung von 1,4-Bisdehydro-3-oxosteroiden. *Helv. Chim. Acta* **1956**, *39*, 734.
12. Vischer, E.; Meystre, C.; Wettstein, A., Herstellung weiterer 1-Dehydrosteroiden auf mikrobiologischen Wege. *Helv. Chim. Acta* **1955**, *38*, 1502-1505.
13. Clinton, R. O.; Manson, A. J.; Stonner, F. W.; Beyler, A. L.; Potts, G. O.; Arnold, A., Steroidal-[3,2-c]-pyrazoles. *J. Am. Chem. Soc* **1959**, *81*, 1513.
14. Clinton, R. O.; Manson, A. J.; Stonner, F. W.; Neumann, H. C.; Christiansen, R. G.; Clarke, R. L.; Ackerman, R. H.; Page, D. F.; Dean, J. W.; Dickinson, W. B.; Carabateas, C., Steroidal[3,2-c]pyrazoles. II. Androstanes, 19-Norandrostanes and their unsaturated analogs. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 1478.
15. Velluz, L.; Nomine, G.; Bucourt, R.; Mathieu, J., *C. R. Acad. Sci.* **1963**, *257*, 569.
16. Catlin, D. H.; Sekera, M. H.; Ahrens, B. D.; Starcevic, B.; Chang, Y.-C.; Hatton, C. K., Tetrahydrogestrinone: Discovery, synthesis, and detection in urine. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, *18*, (12), 1245-1249.
17. Jensen, E. V., Overview of the nuclear receptor family. In *Nuclear Hormone Receptors: Molecular Mechanisms, Cellular Functions, Clinical Abnormalities*, G., P. M., Ed. Academic Press: London, 1991; pp 1-13.
18. Sack, J. S., Kish, K.F., Wang, C., Attar, R.M., Kiefer, S.E., An, Y., Wu, G.Y., Scheffler, J.E., Salvati, M.E., Krystek Jr., S.R., Weinmann, R., Einspahr, H.M., Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 4904-4909.
19. Evans, N. A., Current Concepts in Anabolic-Androgenic Steroids. *The American Journal of Sports Medicine* **2004**, *32*, (2), 534-542.
20. Kuhn, C. M., Anabolic steroids. *Recent Progress in Hormone Research* **2002**, *57*, 411-434.
21. Schänzer, W., Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clinical Chemistry* **1996**, *42*, (7), 1001-1020.
22. Clark, A. F., Steroid D4-reductase. Their physiological role and significance. In *Steroid biochemistry*, Hobkirk, R., Ed. 1979; Vol. 1, pp 1-27.
23. Bean, K. A.; Henion, J. D., Direct determination of anabolic steroid conjugates in human urine by combined high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **1997**, *B*, (Biomed. Appl., 690), 65-75.
24. Ferchaud, V.; Bizec, B. L.; Monteau, F.; Andre, F., Determination of the exogenous character of testosterone in bovine urine by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry. *Analyst (Cambridge, U. K.)* **1998**, *123*, (12), 2617-2620.
25. Le Bizec, B.; Monteau, F.; Gaudin, I.; Andre, F., Evidence for the presence of endogenous 19-norandrosterone in human urine. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **1999**, *723*, (1 + 2), 157-172.
26. van der Merwe, P. J.; Pieterse, J. W., Stability of zeranol, nandrolone and trenbolone in bovine urine. *Analyst (Cambridge)* **1994**, *U. K.*, (119), 2651-3.
27. Van Poucke, C.; Van Peteghem, C., Development and validation of a multi-analyte method for the detection of anabolic steroids in bovine urine with liquid chromatography-tandem

- mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2002**, 772, (2), 211-217.
28. Munoz-Guerra, J.; Carreras, D.; Soriano, C.; Rodriguez, C.; Rodriguez, A. F., Use of ion trap gas chromatography-tandem mass spectrometry for detection and confirmation of anabolic substances at trace levels in doping analysis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1997**, 704, (1-2), 129-141.
29. Buiarelli, F.; Cartoni, G. P.; Amendola, L.; Botre, F., Screening and confirmation analysis of anabolic agents in human urine by gas chromatography -- hybrid mass spectrometry (high resolution -- time of flight). *Analytica Chimica Acta* **2001**, 447, (1-2), 75-88.
30. Leinonen, A.; Kuuranne, T.; Kotiaho, T.; Kostianen, R., Screening of free 17-alkyl-substituted anabolic steroids in human urine by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Steroids* **2004**, 69, (2), 101-109.
31. Hungerford, N. L.; Sortais, B.; Smart, C. G.; McKinney, A. R.; Ridley, D. D.; Stenhouse, A. M.; Suann, C. J.; Munn, K. J.; Sillence, M. N.; McLeod, M. D., Analysis of anabolic steroids in the horse: Development of a generic ELISA for the screening of 17[alpha]-alkyl anabolic steroid metabolites. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2005**, 96, (3-4), 317-334.
32. McKinney, A. R.; Suann, C. J.; Dunstan, A. J.; Mulley, S. L.; Ridley, D. D.; Stenhouse, A. M., Detection of stanozolol and its metabolites in equine urine by liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography B 41st Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists* **2004**, 811, (1), 75-83.
33. Madea, B.; Grellner, W.; Musshoff, F.; Dettmeyer, R., Medico-legal aspects of doping. *Journal of Clinical Forensic Medicine* **1998**, 5, (1), 1-7.
34. Meyer, H. H. D., Biochemistry and physiology of anabolic hormones used for improvement of meat production: Review article. *APMIS* **2001**, 109, 1-8.
35. ZoBell, D.; Chapman, C. K.; Heaton, K., Beef cattle implants. *Utah State University extension* **2000**, AG, 509.
36. Commission, E., Report for 2004 on the results of residue monitoring in food of animal origin in the Member States. *SANCO/3400/2005* **2006**.
37. Raloff, J., Hormones: Here's the Beef. *Science News* **2002**, 161, (1), 10.
38. Lange, I. G.; Daxenberger, A.; Schiffer, B.; Witters, H.; Ibarreta, D.; Meyer, H. H. D., Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. *Analytica Chimica Acta* **2002**, 473, (1-2), 27-37.
39. Estevez, M.-C.; Font, H.; Nichkova, M.; Salvador, J.-P.; Varela, B.; Sanchez-Baeza, F.; Marco, M.-P., Immunochemical determination of pharmaceutical and personal care products as emerging pollutants, chapter 6. In *Emerging Organic Pollutants in Waste Waters and Sludge*, Barceló, D., Ed. Springer-Verlag: Berlin, 2005; Vol. 2, pp 181-244.
40. SCVPH, Report of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to the Public Health, European Commission DG XXIV, 30 April 1999. **April 1999**.
41. FDA, Tolerances for residues of new animal drugs in food. *Code of Federal regulations* 21, (556).
42. EC, Directive 96/23/EC. *Off. J. Eur. Commun.* **1996**, L 125, 3.
43. EC, Directive 2003/74/EC. *Off. J. Eur. Commun.* **2003**, L 262, 17.

Referències

44. EC, Directive 2002/657/EC. *Off. J. Eur. Commun.* **2002**, L 221, 8-36.
45. Ritter, S. K., Designer steroid rocks sports world. *Science and Technology* **2003**, 81, (46), 66-69.
46. De Brabander, H. F.; Verheyden, K.; Mortier, V.; Le Bizec, B.; Verbeke, W.; Courtheyn, D.; Noppe, H., Phytosterols and anabolic agents versus designer drugs. *Analytica Chimica Acta* In Press, Corrected Proof doi:10.1016/j.aca.2006.07.031.
47. WADA, The 2006 Prohibited list. http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/2006_LIST.pdf **2006**.
48. Tsiyou, M.; Kioukia-Fougia, N.; Lyris, E.; Aggelis, Y.; Fragkaki, A.; Kiouisi, X.; Simitsek, P.; Dimopoulou, H.; Leontiou, I.-P.; Stamou, M., An overview of the doping control analysis during the Olympic Games of 2004 in Athens, Greece. *Analytica Chimica Acta* **2006**, 555, (1), 1-13.
49. Johnston, L. D.; O'Malley, P. M.; Bachman, J. G.; Schulenberg, J. E. *Monitoring the Future national results on adolescent drug use: Overview of key findings. 2005*; NIH Publication N° 06-5882; National Institute on Drug Abuse. National Institutes of Health. U.S. Department of Health and Human Services: Bethesda, Maryland, 2006; p 79 pp.
50. FEI, Veterinari Regulations. http://www.horsesport.org/PDFS/FEI/04_02/VR2006-E.pdf **2006**.
51. Poelmans, S.; De Wasch, K.; De Brabander, H. F.; Van De Wiele, M.; Courtheyn, D.; van Ginkel, L. A.; Sterk, S. S.; Delahaut, P.; Dubois, M.; Schilt, R., Analytical possibilities for the detection of stanozolol and its metabolites. *Analytica Chimica Acta* **2002**, 473, (1-2), 39-47.
52. Saugy, M.; Cardis, C.; Robinson, N.; Schweizer, C., Test methods: anabolics. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **2000**, 14, (1), 111-133.
53. Casademont, G.; Perez, B.; Garcia Regueiro, J. A., Simultaneous determination, in calf urine, of twelve anabolic agents as heptafluorobutyryl derivatives by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1996**, 686, (2), 189-198.
54. Guan, F.; Uboh, C. E.; Soma, L. R.; Luo, Y.; Rudy, J.; Tobin, T., Detection, quantification and confirmation of anabolic steroids in equine plasma by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **2005**, 829, (1-2), 56-68.
55. Marcos, V.; Perogordo, E.; Espinosa, P.; de Pozuelo, M. M.; Hooghuis, H., Multiresidue analysis of anabolic compounds in bovine hair by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2004**, 507, (2), 223-231.
56. Buiarelli, F.; Cartoni, G. P.; Coccioni, F.; Giannetti, L.; Merolle, M.; Neri, B.; Terracciano, A., Detection of boldenone and its major metabolites by liquid chromatography--tandem mass spectrometry in urine samples. *Analytica Chimica Acta* **2005**, 552, (1-2), 116-126.
57. Nielen, M. W. F.; Lasaroms, J. J. P.; Mulder, P. P. J.; Van Hende, J.; van Rhijn, J. H. A.; Groot, M. J., Multi residue screening of intact testosterone esters and boldenone undecylenate in bovine hair using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **2006**, 830, (1), 126-134.
58. Blokland, M. H.; Rossum, H. J. v.; Herbold, H. A.; Sterk, S. S.; Stephany, R. W.; Ginkel, L. A. v., Metabolism of methyltestosterone, norethandrolone and methylboldenone in a heifer. *Analytica Chimica Acta EURORESIDUE V, Noordwijkerhout, The Netherlands, 10-12 May 2004*. **2005**, 529, (1-2), 317-323.

59. Borts, D. J.; Bowers, L. D., Direct measurement of urinary testosterone and epitestosterone conjugates using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, (1), 50-61.
60. Schaezner, W.; Delahaut, P.; Geyer, H.; Machnik, M.; Horning, S., Long-term detection and identification of metandienone and stanozolol abuse in athletes by gas chromatography-high-resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **1996**, *B*, (Biomed. Appl., 687), 93-108.
61. Gonzalo-Lumbreras, R.; Izquierdo-Hornillos, R., Optimization of the high-performance liquid chromatographic separation of a complex mixture containing urinary steroids, boldenone and bolasterone: application to urine samples. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **2000**, *742*, (1), 47-57.
62. van Puymbroeck, M.; Leyssens, L.; Vanderzande, D.; Gelan, J.; Raus, J., Metabolites in feces can be important markers for the abuse of anabolic steroids in cattle. *The Analyst* **1998**, *123*, 2449-2452.
63. Perona, M.; Pavan, I., Determination of anabolic steroid 19-nortestosterone in bovine serum by GC-SIM-MS. *J. Chromatogr. Sci.* **1993**, *31*, (10), 429-32.
64. Draisci, R.; Palleschi, L.; Ferretti, E.; Lucentini, L.; Cammarata, P., Quantitation of anabolic hormones and their metabolites in bovine serum and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2000**, *870*, (1+2), 511-522.
65. Stolker, A. A. M.; Tricht, E. F. v.; Zoontjes, P. W.; Ginkel, L. A. v.; Stephany, R. W., Rapid method for the determination of stanozolol in meat with supercritical fluid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *483*, 1-9.
66. Fuh, M.-R.; Huang, S.-Y.; Lin, T.-Y., Determination of residual anabolic steroid in meat by gas chromatography-ion trap-mass spectrometer. *Talanta* **2004**, *64*, (2), 408-414.
67. Marchand, P.; le Bizec, B.; Gade, C.; Monteau, F.; Andre, F., Ultra trace detection of a wide range of anabolic steroids in meat by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2000**, *867*, (1-2), 219-233.
68. Bresson, M.; Cirimele, V.; Villain, M.; Kintz, P., Doping control for metandienone using hair analyzed by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **2006**, *836*, (1-2), 124-128.
69. Gaillard, Y.; Vayssette, F.; Balland, A.; Pepin, G., Gas chromatographic-tandem mass spectrometric determination of anabolic steroids and their esters in hair: Application in doping control and meat quality control. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1999**, *735*, (2), 189-205.
70. Poelmans, S.; Wasch, K. D.; Noppe, H.; Hoof, N. V.; Cruchten, S. V.; Bizec, B. L.; Deceuninck, Y.; Sterk, S.; Rossum, H. J. V.; Hoffman, M. K.; Brabander, H. F. D., Endogenous occurrence of some anabolic steroids in swine matrices. *Food Additives & Contaminants* **2005**, *22*, (9), 808 - 815.
71. De Brabander, H.; Poelmans, S.; Schilt, R.; Stephany, R.; Le Bizec, B.; Draisci, R.; Sterk, S.; van Ginkel, L.; Courtheyn, D.; Van Hoof, N.; Macrì, A.; De Wasch, K., Presence and metabolism of the anabolic steroid boldenone in various animal species: a review. Food additives and contaminants. *Food Additives & Contaminants* **2004**, *21*, (6), 515-525.
72. Oubiña, A.; Ballesteros, B.; Bou, P.; Galve, R.; Gascón, J.; Iglesias, F.; Sanvicens, N.; Marco, M.-P., Immunoassays for environmental analysis. In *Sample Handling and trace analysis*

Referències

of pollutants. *Techniques, applications and quality assurance*, Barceló, D., Ed. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2000; Vol. 21, pp 289-340.

73. Estevez, M.-C.; Font, H.; Nichkova, M.; Salvador, J.-P.; Varela, B.; Sanchez-Baeza, F.; Marco, M.-P., Immunochemical determination of industrial emerging pollutants, chapter 5. In *Emerging Organic Pollutants in Waste Waters and Sludge*, Barceló, D., Ed. Springer-Verlag: Berlin, 2005; Vol. 2, pp 119-180.

74. Salvador, J.-P.; Adrian, J.; Galve, R.; Pinacho, D. G.; Kreuzer, M.; Sánchez-Baeza, F.; Marco, M.-P., Application of bioassays/biosensors for the analysis of pharmaceuticals in environmental samples, Chapter 2.8. In *Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle*, Barceló, D., Ed. Elsevier: p in Press.

75. McNiven, S. J.; Cheong, S.-H.; Levi, R.; Yokobayashi, Y.; Nakagiri, T.; Yano, K.; Karube, I., Applications of molecular imprinting to the recognition and detection of bioactive molecules. *ACS Symp. Ser.* **1998**, 703, (Molecular and Ionic Recognition with Imprinted Polymers), 90-108.

76. Sellergren, B.; Lanza, F., Molecularly imprinted polymers in solid phase extractions. *Tech. Instrum. Anal. Chem.* **2001**, 23, (Molecularly Imprinted Polymers), 355-375.

77. Yalow, R. S.; Berson, S. A., Immunogenic specificity of peptide hormones. *Nature* **1959**, 184, 1648.

78. Yalow, R. S.; Berson, S. A., Immunassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* **1960**, 39, 1157-1175.

79. Marco, M.-P.; Gee, S.; Hammock, B. D., Immunochemical techniques for environmental analysis. I. Antibody production and immunoassay development. *Trends Anal. Chem.* **1995**, 14, (8), 415-425.

80. Kohler, G.; Milstein, C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **1975**, 256, 495-497.

81. Hock, B.; Dankwardt, A.; Kramer, K.; Marx, A., Immunochemical techniques: antibody production for pesticide analysis. A review. *Analytica Chimica Acta* **1995**, 311, (3), 393-405.

82. Kramer, K., Synthesis of pesticide-specific single-chain Fv utilizing the recombinant phage antibody system (RPAS, Pharmacia), a detailed protocol. *Analytical Letters* **1998**, 31, (1), 67-92.

83. Katz, S. E.; Siewierski, M., Drug residue analysis using immunoaffinity chromatography. *J. Chromatogr.* **1992**, 624, 403-409.

84. Weller, M. G., Immunochromatographic techniques - a critical review. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, 366, 635-645.

85. Rodriguez-Mozaz, S., Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: a review article. *Anal Bioanal Chem* **2004**, 378, 588-598.

86. Hock, B., Antibodies for immunosensors, A review. *Analytica Chimica Acta* **1997**, 347, 177-186.

87. Jeffcoate, S. L., Hapten-specificity of antisera to steroid-protein conjugates. In *Radioimmunoassay Methods, Eur. Workshop*, 1971; pp 151-5.

88. Weinstein, A.; Lindner, H. R.; Friedlander, A.; Bauminger, S., Antigenic complexes of steroid hormones formed by coupling to protein through position 7. Preparation from .DELTA.4-3-oxosteroids and characterization of antibodies to testosterone and androstenedione. In *Steroids*, 1972; Vol. 20, pp 789-812.

89. Bosch, A. M. G.; Den Hollander, F. C.; Woods, G. F.; Van Casteren, J. I. J.; Dijkhuizen, D. M., Specificities of antisera against testosterone linked to albumin at different positions (C-3, C-11, C-17). In *Steroids*, 1974; Vol. 23, pp 699-71.
90. Rao, P. N.; Shain, S. A.; Axelrod, L. R., Preparation of some novel steroid haptens for generation of antibodies to testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone. In *Journal of Steroid Biochemistry*, ENGLAND: United Kingdom, 1974; Vol. 5, pp 433-8.
91. Rao, P. N.; Moore, P. H., Jr., Synthesis of new steroid haptens for radioimmunoassay. Part I. 15.beta.-Carboxyethylmercaptotestosterone-bovine serum albumin conjugate. Measurement of testosterone in male plasma without chromatography. In *Steroids*, 1976; Vol. 28, pp 101-9.
92. Brooks, R. V.; Firth, R. G.; Sumner, N. A., Detection of anabolic steroids by radioimmunoassay. In *Br. J. Sports Med.*, 1975; Vol. 9, pp 89-92.
93. Hampl, R.; Putz, Z.; Bicikova, M.; Starka, L., Advances in immunoassay of anabolic steroids. In *Anal. Chem. Symp. Ser.*, 1985; Vol. 23, pp 219-24.
94. Pratt, J. J.; Woldring, M. G.; Villerius, L., Chemiluminescence-linked immunoassay. In *J. Immunol. Methods*, 1978; Vol. 21, pp 179-84.
95. Jansen, E. H. J. M.; Laan, C. A.; Van den Berg, R. H.; Stephany, R. W.; Zomer, G., A solid-phase chemiluminescence immunoassay for 17a-methyltestosterone. *Analytica Chimica Acta* **1985**, 170, (1), 29-34.
96. Jansen, E. H. J. M.; Van den Berg, R. H.; Zomer, G.; Stephany, R. W., A chemiluminescent immunoassay for 17a-methyltestosterone. *Food Additives & Contaminants* **1985**, 2, (1), 47-53.
97. Jansen, E. H. J. M.; Zomer, G.; Berg, R. H. V. d.; Stephany, R. W., Development of a chemiluminescence for 19-nortestosterone. *Vet. Quart.* **1984**, 6, 101-103.
98. Rao, P. N.; Taraporewala, I. B., A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for testosterone: use of a novel heterologous hapten conjugated to penicillinase. *Steroids* **1992**, 57, (4), 154-61.
99. Lu, H.; Conneely, G.; Crowe, M. A.; Aherne, M.; Pravda, M.; Guilbault, G. G., Screening for testosterone, methyltestosterone, 19-nortestosterone residues and their metabolites in bovine urine with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Analytica Chimica Acta* **2006**, 570, (1), 116-123.
100. Hagedorn, H. W.; Schulz, R.; Jaeschke, G., Identification and verification of the anabolic steroid boldenone in equine blood and urine by HPLC/ELISA. *Biomed Chromatogr* **1994**, 8, (2), 63-8.
101. Barrett, N. J.; Kicman, A. T.; Bansal, S.; Cowan, D. A., Developing an immunoassay for the anabolic steroid stanozolol. In *Pharm. Sci.*, 1995; Vol. 1, pp 87-89.
102. Douglas, J. C.; McCormick, A.; McConnell, R. I.; Lamont, J. V.; Fitzgerald, S. P., Development of an enzyme immunoassay for the screening of stanozolol in urine samples. *Proceedings of the Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food: Euroresidue IV Conference, Veldhoven* **2000**, 371-376.
103. McConnell, R. J.; Fitzgerald, S. P.; Lamont, J. V., Trenbolone and 19-nortestosterone residue analysis by immunoaffinity chromatography and high performance liquid chromatography and/or an enzyme linked immunosorbent assay. *Food Saf. Qual. Assur.: Appl. Immunoassay Syst.* **1992**, roc., 1st, Meeting Date 1991, 245-50.

Referències

104. Sawaya, W. N.; Lone, K.; Saeed, T.; Husain, A.; Khalafawi, S., Application of an enzyme-linked immunosorbent assay for screening of sheep urine and animal tissue for the androgenic steroid trenbolone acetate in the state of Kuwait. In *Food Additives and Contaminants*, 1998; Vol. 15, pp 151-156.
105. Tang, P. W.; Crone, D. L.; Chu, C. S.; Yeung, H. K.; Chan, K., Measuring the nandrolone threshold ratio by enzyme-linked immunosorbent assay for 5 α -estrane-3 β ,17 α -diol. In *Analytica Chimica Acta*, 1993; Vol. 275, pp 139-46.
106. Van Look, L. J.; Jansen, E. H. J. M.; Van den Berg, R. H.; Zomer, G.; Vanoosthuyze, K. E.; Van Peteghem, C. H., Development of a competitive enzyme immunoassay for 17 α -19-nortestosterone. *Journal of Chromatography* **1991**, 564, (2), 451-9.
107. Cooper, J.; Elliott, C. T.; Baxter, G. A.; Hewitt, S. A.; McEvoy, J. D. G.; McCaughey, W. J., Comparison of two polyclonal antibodies for the detection of 19-nortestosterone in bovine bile by ELISA. *Food Agric. Immunol.* **1998**, 10, (2), 133-142.
108. Van Ginkel, L. A.; Van Blitterswijk, H.; Zoontjes, P. W.; Van Den Bosch, D.; Stephany, R. W., Assay for trenbolone and its metabolite 17[α]-trenbolone in bovine urine based on immunoaffinity chromatographic clean-up and off-line high-performance liquid chromatography-thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A* **1988**, 445, 385-392.
109. van Ginkel, L. A.; Stephany, R. W.; van Rossum, H. J.; Steinbuch, H. M.; Zomer, G.; van de Heeft, E.; Jong, A. P. J. M. d., Multi-immunoaffinity chromatography: A simple highly selective clean-up method for multi-anabolic residue analysis of meat. **1989**.
110. Dubois, M.; Taillieu, X.; Colemonts, Y.; Lansival, B.; Delahaut, P.; Graeve, J. D., GC-MS determination of anabolic steroids after multi-immunoaffinity purification. *Analyst* **1998**, 123, 2611.
111. Machnik, M.; Delahaut, P.; Horning, S.; Schaenzer, W., Purification and concentration of anabolic steroids by immuno affinity chromatography (IAC). *Recent Adv. Doping Anal. (4)* **1997**, roc.
112. Lu, H.; Conneely, G.; Pravda, M.; Guilbault, G. G., Screening of boldenone and methylboldenone in bovine urine using disposable electrochemical immunosensors. *Steroids* **2006**, 71, (9), 760-767.
113. Kreuzer, M. P.; Quidant, R.; Badenes, G.; Marco, M.-P., Quantitative detection of doping substances by a localised surface plasmon sensor. *Biosensors and Bioelectronics* **2006**, 21, (7), 1345-1349.
114. Wulff, G., Molecular Recognition in Polymers Prepared by Imprinting with Templates. *ACS Symp. Ser.* **1986**, 308, 186-230.
115. Mayes, A. G.; Mosbach, K., Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry? *Trends Anal. Chem* **1997**, 16, 321-332.
116. Alexander, C.; Andersson, H. S.; Andersson, L. I.; Ansell, R. J.; Kirsch, N.; Nicholls, I. A.; O'Mahony, J.; Whitcombe, M. J., Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. *J. Mol. Recognit.* **2006**, 19, 106-180.
117. Andersson, L. I., Molecular imprinting: developments and application in the analytical chemistry field. *J. Chromatogr. B* **2000**, 745, 3-13.
118. Remcho, V. T.; Tan, Z. J., MIPs as chromatographic stationary. phases for molecular recognition. *Anal Chem* **1999**, 71, 248A-255A.

119. Kempe, M.; Mosbach, K., Review: Molecular imprinting used for chiral separations. *J. Chromatogr. A* **1994**, 694, (3-13).
120. Chen, Y.; Shimizu, K. D., Measurement of Enantiomeric Excess Using Molecularly Imprinted Polymers. *Org. Lett.* **2002**, 4, 2937-2940.
121. Haginaka, J.; Takehira, H.; Hosoya, K.; Tanaka, N., Uniform-sized molecularly imprinted polymer for (S)-naproxen selectively modified with hydrophilic external layer. *J. Chromatogr., A* **1999**, 849, (2), 331-339.
122. Olsen, J.; Martin, P.; Wilson, I. D., Molecular imprints as sorbents for solid phase extraction: Potential and applications. *Anal. Commun.* **1998**, 35, 13H-14H.
123. Andersson, L. I., Molecular imprinting for drug bioanalysis. A review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay. *J. Chromatogr. B* **2000**, 739, 163-173.
124. Benito-Peña, E.; Moreno-Bondi, M. C.; Aparicio, S.; Orellana, G.; Cederfur, J.; Kempe, M., Molecular engineering of fluorescent Penicillins for molecularly imprinted polymer assays. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 2019-2027.
125. Vlatakis, G.; Andersson, L. I.; Müller, R.; Mosbach, K., Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. *Nature* **1993**, 361, 645-647.
126. Bengtsson, H.; Roos, U.; Andersson, L. I., Molecular Imprint Based Radioassay for Direct Determination of S-Propranolol in Human Plasma. *Anal. Commun.* **1997**, 34, 233-235.
127. Piletsky, S. A.; Subrahmanyam, S.; Turner, A. P. F., Application of molecularly imprinted polymers in sensors for the environment and biotechnology. *Sens. Rev.* **2001**, 21, 292-296.
128. Yano, K.; Karube, I., Molecularly imprinted polymers for biosensor applications. *Trends Anal. Chem.* **1999**, 18, 199-204.
129. Haupt, K.; Mosbach, K., Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2495-2504.
130. Kugimiya, A.; Takeuchi, T., Molecularly imprinted polymer-coated quartz crystal microbalance for detection of biological hormone. *Electroanalysis* **1999**, 11, 1158-1160.
131. Dong, H.; Tong, A.-j.; Li, L.-d., Syntheses of steroid-based molecularly imprinted polymers and their molecular recognition study with spectrometric detection. *Spectrochimica Acta Part A* **2003**, 59, 279-284.
132. Kugimiya, A.; Kuwada, Y.; Takeuchi, T., Preparation of Sterol-Imprinted Polymers with the Use of 2-(Methacryloyloxy)ethyl phosphate. *J. Chromatogr. A* **2001**, 938, 131-135.
133. Huval, C. C.; Bailey, M. J.; Braunlin, W. H.; Holmes-Farley, S. R.; Mandeville, W. H.; Petersen, J. S.; Polomoscanik, S. C.; Sacchiro, R. J.; Chen, X.; Dhal, P. K., Novel Cholesterol Lowering Polymeric Drugs Obtained by Molecular Imprinting. *Macromolecules* **2001**, 34, (6), 1548-1550.
134. Hishiya, T.; Shibata, M.; Kakazu, M.; Asanuma, H.; Komiyama, M., Molecularly imprinted cyclodextrins as selective receptors for steroids. *Macromolecules* **1999**, 32, (7), 2265-2269.
135. Sreenivasan, K., Effect of the type of monomers of molecularly imprinted polymers on the interaction with steroids. *J. Appl. Polym. Sci.* **1998**, 68, (11), 1863-1866.

Referències

136. Sreenivasan, K.; Sivakumar, R., Imparting recognition sites in poly(HEMA) for two compounds through molecular imprinting. *J. Appl. Polym. Sci.* **1999**, 71, (11), 1823-1826.
137. Whitcombe, M. J.; Rodriguez, M. E.; Villar, P.; Vulfson, E. N., A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, (27), 7105-11.
138. Ramstrom, O.; Ye, L.; Mosbach, K., Artificial antibodies to corticosteroids prepared by molecular imprinting. *Chem. Biol.* **1996**, 3, (6), 471-477.
139. Baggiani, C.; Giraudi, G.; Trotta, F.; Giovannoli, C.; Vanni, A., Chromatographic characterization of a molecular imprinted polymer binding cortisol. *Talanta* **2000**, 51, (1), 71-75.
140. Tarbin, J. A.; Sharman, M., Development of molecularly imprinted phase for the selective retention of stilbene-type estrogenic compounds. *Anal. Chim. Acta* **2001**, 433, (1), 71-79.
141. Idziak, I.; Benrebouh, A., A molecularly imprinted polymer for 17 alpha- ethynylestradiol evaluated by immunoassay. *Analyst* **2000**, 125, (8), 1415-1417.
142. Haginaka, J.; Sanbe, H., Uniform-sized molecularly imprinted polymers for beta-estradiol. *Chem. Lett.* **1998**, (11), 1089-1090.
143. Cheong, S.-H.; Rachkov, A. E.; Park, J.-K.; Yano, K.; Karube, I., Synthesis and binding properties of a noncovalent molecularly imprinted testosterone-specific polymer. *J. Polym. Sci.* **1998**, Part A, (Polym. Chem., 36), 1725-1732.
144. Cheong, S. H.; McNiven, S.; Rachkov, A.; Levi, R.; Yano, K.; Karube, I., Testosterone receptor binding mimic constructed using molecular imprinting. *Macromolecules* **1997**, 30, (5), 1317-1322.
145. McNiven, S.; Yokobayashi, Y.; Cheong, S. H.; Karube, I., Enhancing the selectivity of molecularly imprinted polymers. *Chem. Lett.* **1997**, (12), 1297-1298.
146. Boenke, A.; Searle, C.; Karjalainen, T., Contribution of European research to endocrine disruptors. *Analytica Chimica Acta* **2002**, 473, (1-2), 161-165.
147. Greene, T. W.; Wuts, P. G. M., *Protective Groups in Organic Synthesis*. 3rd edition ed.; John Wiley & Sons, Inc.: 1999.
148. Kyrein, H. J., Der Radioimmunoassay fur Steroidhormone —Grundlagen, Entwicklung und Anwendung radioimmunologischer Testverfahren. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1983**, 177, 426-438.
149. Kamata, S.; Matsui, T.; Haga, N.; Nakamura, M.; Odaguchi, K.; Itoh, T.; Shimizu, T.; Suzuki, T.; Ishibashi, M.; Yamada, F.; Katoh, G., Aldosterone antagonists. 2. Synthesis and biological activities of 11,12-dehydropregnane derivatives. *J. Med. Chem.* **1987**, 30, (9), 1647-1658.
150. Galve, R.; Sanchez-Baeza, F.; Camps, F.; Marco, M. P., Indirect competitive immunoassay for trichlorophenol determination: Rational evaluation of the competitor heterology effect. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 452, 191-206.
151. Harrison, R. O.; Goodrow, M. H.; Hammock, B. D., Competitive inhibition ELISA for the s-triazine herbicides: Assay optimization and antibody characterization. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, 122-128.

152. Abad, A.; Moreno, M. J.; Montoya, A., Hapten synthesis and production of monoclonal antibodies to the N-methylcarbamate pesticide methiocarb. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2417-2426.
153. Martin, Stephen F.; Dodge, J. A., Efficacious modification of the Mitsunobu reaction for inversions of sterically hindered secondary alcohols. *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, (26), 3017-3020.
154. Gendloff, E. H.; Casale, W. L.; Ram, B. P.; Tai, J. H.; Pestka, J. J.; Hart, L. P., Hapten-protein conjugates prepared by the mixed anhydride method. Cross-reactive antibodies in heterologous antisera. *Journal of Immunological Methods* **1986**, *92*, 15-20.
155. Ramon-Azcon, J.; Galve, R.; Sanchez-Baeza, F.; Marco, M.-P., Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of the Linear Alkylbenzene Sulfonates and Long-Chain Sulfophenyl Carboxylates Using Antibodies Generated by Pseudoheterologous Immunization. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, (1), 71-81.
156. Goodfriend, T. L.; Levine, L.; Fasman, G. D., Antibodies to bradykinin and angiotensin: A use of carbodiimides in immunology. *Science* **1964**, *144*, 1344-1346.
157. Deshpand, S., *Enzyme Immunoassays from concept to product development*. Chapman & Hall: New York, 1996.
158. Brinkley, M., A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens and crosslinking reagents. *Bioconjugate Chemistry* **1992**, *3*, (1), 2-13.
159. Sashidhar, R. B.; Capoor, A. K.; Ramana, D., Quantitation of -amino group using amino acids as reference standards by trinitrobenzene sulfonic acid. *Journal of Immunological Methods* **1999**, *167*, (1-2), 121-127.
160. Wetzel, R.; Halualani, R.; Stults, J. T.; Quan, C., A general method for highly selective crosslinking of unprotected polypeptides via pH-controlled modification of N-terminal α -amino groups. *Bioconjugate Chemistry* **1990**, *1*, (2), 114-122.
161. Ersoy, O.; Fleck, R.; Sinskey, A. J.; Masamune, S., N O Acyl-Transfer Reaction Catalyzed by Antibodies. *J. Am. Chem. Soc* **1996**, *118*, (81), 13077-13078.
162. Tsumuraya, T.; Suga, H.; Meguro, S.; Tsunakawa, A.; Masamune, S., Catalytic Antibodies Generated via Homologous and Heterologous Immunization. *J. Am. Chem. Soc* **1995**, *117*, (46), 11390-11396.
163. Suga, H.; Ersoy, O.; Williams, S. F.; Tsumuraya, T.; Margolies, M. N.; Sinskey, A. J.; Masamune, S., Catalytic antibodies generated via heterologous immunization. *J. Am. Chem. Soc* **1994**, *116*, (13), 6025-6026.
164. Estevez, M.-C. Preparació de Receptors Moleculars d'Origen Sintètic i Biològic. Desenvolupament d'Aplicacions per l'Anàlisi de Biocides i Tensioactius en mostres aquoses. UB, 2005.
165. Galve, R. Desenvolupament de Tècniques Immunoquímiques per a la Determinació de Residus d'Origen Industrial. UB, Barcelona, 2001.
166. Cushley, W.; Harnett, M. M., Cellular signalling mechanisms in B lymphocytes. *Biochemical journal* **1993**, *292*, (2), 313-332.
167. Lee, N. J.; Skerritt, J. H.; McAdam, D. P., Hapten synthesis and development of ELISAs for detection of endosulfan in water and soil. *J Agr Food Chem* **1995**, *43*, (6), 1730-1739.

Referències

168. Sanvicens, N.; Sanchez-Baeza, F.; Marco, M.-P., Immunochemical Determination of 2,4,6-Trichloroanisole as the Responsible Agent for the Musty Odor in Foods. 1. Molecular Modeling Studies for Antibody Production. *J Agr Food Chem* **2003**, 51, 3924-3931.
169. Zeravik, J.; Skryjova, K.; Nevorankova, Z.; Franek, M., Development of Direct ELISA for the Determination of 4-Nonylphenol and Octylphenol. *Anal Chem* **2004**, 76, (4), 1021-1027.
170. Manclus, J. J.; Montoya, A., Development of enzyme-linked immunosorbent assays for the insecticide chlorpyrifos .1. Monoclonal antibody production and immunoassay design - .2. Assay optimization and application to environmental waters. *J Agr Food Chem* **1996**, 44, (12), 4063-4070.
171. Sanvicens, N.; Varela, B.; Marco, M.-P., Immunochemical Determination of 2,4,6-Trichloroanisole as the Responsible Agent for the Musty Odor in Foods. 2.Immunoassay Evaluation. *J Agr Food Chem* **2003**, 51, 3932-3939.
172. Doyle, E., Human Safety of Hormone Implants Used to Promote Growth in Cattle. *FRI BRIEFINGS* **2000**.
173. Estevez, M.-C.; Galve, R.; Sanchez-Baeza, F.; Marco, M.-P., Effect of pseudo-heterologous and homologous immunization procedures on the detectability and specificity of antibodies raised against Sulfophenylcarboxylates. *Enviat al Anal. Chim. Acta*.
174. Trout, G. J.; Kazlauskas, R., Sports drug testing – an analyst’s perspective. *Chem. Soc. Rev.* **2004** 33, 1-13.
175. Dankwart, A.; Hock, B., Enzyme immunoassay for the analysis of pesticides in water and food. *Food Technol Biotechnol* **1997**, 35, 165-174
176. Morozova, V. S.; Levashova, A. I.; Eremin, S. A., Determination of Pesticides by Enzyme Immunoassay. . *Journal of Analytical Chemistry* **2005**, 60, (3), 202.
177. Muller, O., Methods in Biochemical Analysis. In Glick, D., Ed. John Wiley & Sons: New York, 1963; pp 376-390.
178. Varley, H.; Gowenlock, A.; Bell, M. *Practical Clinical Biochemistry*; London, 1976; pp 260-365.
179. Maickel, R., Biofluid and Tissue Analysis for Drugs. In E. Reid, I. D. W., Ed. New York, 1984; pp 3-16.
180. Manson, M. M., *Immunochemical protocols*. Humana Press: Totowa, 1992; Vol. 10.
181. Nichkova, M.; Marco, M.-P., Development and evaluation of C18 and immunosorbent solid-phase extraction methods prior immunochemical analysis of chlorophenols in human urine. *Analytica Chimica Acta* **2005**, 533, (1), 67-82.
182. Bou, P.; Díez, S.; Jimenez, J.; Marco, M.-P.; Bayona, J. M., Determination of Irgarol 1051 in Western Mediterranean sediments. Development and application of a supercritical fluid-extraction-immunoaffinity chromatography procedure. *Water Res.* **2003**, 37, 3658-3665.
183. Stewart, J. J. P., Comments on a Comparison of Am1 with the Recently Developed Pm3 Method - Reply. *Journal of Computational Chemistry* **1990**, 11, (4), 543-544.
184. Dewar, M. J. S.; Ruiz, J. M., Calculations of Electron-Affinities Using the Am1 Semiempirical Scf-Mo Method and Their Application to Single-Electron-Transfer Reactions. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **1989**, 197, 62-PHYS.

185. Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P., The Development and Use of Quantum-Mechanical Molecular-Models .76. Am1 - a New General-Purpose Quantum-Mechanical Molecular-Model. *Journal of the American Chemical Society* **1985**, 107, (13), 3902-3909.
186. Rekharsky, M.; Inoue, Y.; Tobey, S.; Metzger, A.; Anslyn, E., Ion-pairing molecular recognition in water: Aggregation at low concentrations that is entropy-driven. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, (50), 14959-14967.
187. Zimmerman, S. C.; Wu, W. M.; Zeng, Z. J., Complexation of Nucleotide Bases by Molecular Tweezers with Active-Site Carboxylic-Acids - Effects of Microenvironment. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, 113, (1), 196-201.
188. Rau, D.; Kramer, K.; Hock, B., Cloning, functional expression and kinetic characterization of pesticide-selective Fab fragment variants derived by molecular evolution of variable antibody genes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2002**, V372, (2), 261-267.
189. Abian, J.; Durand, G.; Barceló, D., Analysis of Chlorotriazines and Their Degradation Products in Environmental Samples by Selecting Various Operating Modes in Thermospray HPLC/MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, 41, 1264-1273.
190. Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Herrero-Hernández, E.; Román, F. J. S.-S.; Flores, M. G. P., Determination of herbicides and metabolites by solid-phase extraction and liquid chromatography. Evaluation of pollution due to herbicides in surface and groundwaters. *Journal of Chromatography A* **2002**, 950 157-166.
191. Sanchez-Brunete, C.; Martinez, L.; Tadeo, J. L., Determination of Corn Herbicides by GC-MS and GC-NPD in Environmental Samples. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, 2210-2214.
192. PetricoinIII, E. F.; Hackett, J. L.; Lesko, L. J.; Puri, R. K.; Gutman, S. I.; Chumakov, K.; Woodcock, J.; Jr., D. W. F.; Zoon, K. C.; Sistare, F. D., Medical applications of microarray technologies: a regulatory science perspective. *Nature Genetics* **2002**, 32, 474 - 479.
193. Schulze, A.; Downward, J., Navigating gene expression using microarrays — a technology review. *Nature Cell Biology* **2001**, 3, E190 - E195.
194. Delehanty, J. B.; Ligler, F. S., A microarray immunoassay for simultaneous detection of proteins and bacteria. *Anal. Chem.* **2002**, 74, (21), 5681-5687.
195. Glokler, J.; Angenendt, P., Protein and antibody microarray technology. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **2003**, 797, (1-2), 229-40.
196. Kusnezow, W.; Hoheisel, J. D., Antibody Microarrays: Promises and Problems. *BioTechniques* **2002**, 33, S14-S23.
197. Stears, R. L.; Martinsky, T.; Schena, M., Trends in microarray analysis. *Nature Medicine* **2003**, 9, 140 - 145
198. Zhang, C.-M.; Reslewic, S. A.; Glatz, C. E., Suitability of Immobilized Metal Affinity Chromatography for Protein Purification from Canola. *Biotechnology and bioengineering* **2000**, 68, (1), 52-58.
199. Kröger, D.; Liley, M.; Schiweck, W.; Skerra, A.; Vogel, H., Immobilization of histidine-tagged proteins on gold surfaces using chelator thioalkanes. *Biosensors & Bioelectronics* **1999**, 14 155-161.

Referències

200. Sigal, G. B.; Bamdad, C.; Barberis, A.; Strominger, J.; Whitesides, G. M., A Self-Assembled Monolayer for the Binding and Study of Histidine-Tagged Proteins by Surface Plasmon Resonance. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 490-497.
201. Angenendt, P., Progress in protein and antibody microarray technology. *Drug Discovery Today* **2005**, 10, (7), 503-511.
202. Kusnezow, W.; Hoheisel, J. D., Solid supports for microarray immunoassays. *J. Mol. Recognit.* **2003**, 16, 165-176.
203. Kusnezow, W.; Jacob, A.; Walijew, A.; Diehl, F.; Hoheisel, J. D., Antibody microarrays: An evaluation of production parameters. *Proteomics* **2003**, 3, 254-264.
204. Pavlickova, P.; Schneider, E. M.; Hug, H., Advances in recombinant antibody microarrays. *Clinica Chimica Acta* **2004**, 343 17-35.
205. Schaeferling, M.; Schiller, S.; Paul, H.; Kruschina, M.; Pavlickova, P.; Meerkamp, M.; Giammasi, C.; Kambhampati, D., Application of self-assembly techniques in the design of biocompatible protein microarray surfaces. *Electrophoresis* **2002**, 23, 3097-3105.
206. van Poucke, C.; van de Velde, M.; van Peteghem, C., Combination of liquid chromatography/tandem mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry for the detection of 21 anabolic steroid residues in bovine urine. *J. Mass Spectrom.* **2005**, 40, 731-738.
207. Ballesteros, B.; Barceló, D.; Camps, F.; Marco, M.-P., Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of the Antifouling Agent Irgarol 1051. *Anal. Chim. Acta* **1997**, 347, 139-147.
208. Maniatis, T.; Fritsch, E. F.; Sambrook, J., *Molecular cloning : a laboratory manual* ; . N.Y., 1987
209. Estévez, M.-C.; Kreuzer, M.; Sánchez-Baeza, F. and M.-P. Marco, Analysis of Nonylphenol: Advances and Improvements in the Immunochemical Determination Using Antibodies Raised against the Technical Mixture and Hydrophilic Immunoreagents. *Environ. Sci. Technol.*, **2006**, 40, 559-568

