



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede amministrativa: Università degli Studi di Padova

**DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA, PATOLOGIA
COMPARATA ED IGIENE VETERINARIA**

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE
INDIRIZZO SANITA' PUBBLICA E PATOLOGIA COMPARATA**

CICLO XXII

Enzimi farmaco-metabolizzanti epatici in specie di interesse veterinario

Direttore della Scuola: Ch.mo prof. Massimo Morgante

Coordinatore di Indirizzo: Ch.mo prof. Mauro Dacasto

Supervisore: Dr.ssa Francesca Capolongo

Dottorando: Dott. Sara PEGOLO

31 gennaio 2010

INDICE

CAPITOLO 1

Introduzione	17
1.0 Il sistema citocromo P450	17
1.1 Il ruolo del citocromo P450	22
1.2 Isoforme del citocromo P450	25
1.3 Citocromo P450 in specie di interesse veterinario	26
1.4 Fattori modulanti gli enzimi biotrasformativi	27
1.4.1 Fattori intrinseci	27
1.4.2 Induzione enzimatica	28
1.4.3 Inibizione enzimatica	31
Scopo della tesi	33

CAPITOLO 2

Valutazione dell'attività di CYP1A e CYP2C nel fegato di bovino	37
2.0 Introduzione	39
2.1 Materiali e metodi	41
2.2 Risultati	49
2.3 Discussione	56
2.4 Conclusioni	60

CAPITOLO 3

Valutazione dell'attività di idrossilazione del testosterone nel fegato di bovino: studio di cinetica enzimatica e di inibizione.	63
3.0 Introduzione	65
3.1 Materiali e metodi	68
3.2 Risultati	73

3.3 Discussione	80
3.4 Conclusioni	82

CAPITOLO 4

Effetti di trattamenti illeciti su CYP3A nel fegato del bovino da carne e in colture primarie di epatociti di bovino

4.0 Introduzione	87
------------------	----

a) ESPERIMENTO DES ED ESTRADIOLO

4.1 Materiali e metodi	98
4.2 Risultati	101
4.3 Discussione	103

b) ESPERIMENTO EPATOCITI BOLDENONE E ADD

4.4 Materiali e metodi	106
4.5 Risultati	108
4.6 Discussione	110

4.7 Conclusioni	112
-----------------	-----

CAPITOLO 5

Valutazione dell'attività di EROD nel fegato di *Zosterisessor ophiocephalus* come biomarcatore di inquinamento nella Laguna di Venezia

5.0 Introduzione	115
5.1 Materiali e metodi	121
5.2 Risultati	125
5.3 Discussione	129
5.4 Conclusioni	133

CAPITOLO 6

Messa a punto di metodi *high-throughput* in luminescenza per la valutazione dell'attività di CYP3A e di CYP2C nel fegato di cavallo **135**

6.0 Introduzione 137

6.1 Materiali e metodi 140

6.2 Risultati 143

6.3 Discussione 147

6.4 Conclusioni 149

Bibliografia **151**

Ringraziamenti **169**

RIASSUNTO

Nel corso dei tre anni di dottorato sono stati sviluppati progetti relativi alla valutazione dell'attività epatica di isoforme di citocromo P450 in specie di interesse veterinario. In medicina veterinaria, la caratterizzazione del sistema P450 è ancora incompleta; inoltre, i substrati utilizzati sono stati selezionati sulla base delle conoscenze disponibili a partire da esperimenti condotti nell'uomo o nelle specie di laboratorio senza studi di cinetica enzimatica o di inibizione (Fink-Gremmels, 2008). Definire il contributo di un'isoforma di citocromo P450 nel metabolismo di un farmaco specifico è importante non solo per la farmacologia e la tossicologia veterinarie ma anche per la salute dell'uomo, per la possibile presenza di residui nei prodotti di origine animale.

L'obiettivo della presente tesi di dottorato è stato dunque quello di aumentare le conoscenze sugli enzimi che metabolizzano i farmaci in specie di interesse veterinario e sulla modulazione della loro attività. Tale modulazione può essere dovuta a fattori come la razza ma anche all'esposizione ad inquinanti ambientali oppure alla somministrazione di sostanze illecite utilizzate allo scopo di determinare incremento ponderale, riduzione degli indici di conversione alimentare e quindi aumento complessivo del reddito (Johnson, 2007). Le informazioni ottenute con tali studi *in vitro* dunque possono essere utili per valutare l'effetto di interazioni tra farmaci e per il disegno sperimentale di progetti volti all'identificazione di marker *in vivo* di esposizione o trattamento.

I) Valutazione dell'attività di CYP1A e CYP2C nel fegato di bovino. Nel presente lavoro, sono stati verificati accuratezza, precisione, LOD e LOQ di metodi in High Performance Liquid Chromatography (HPLC) precedentemente messi a punto nel laboratorio per la valutazione dell'attività di etossiresorufina-O-deetilasi (EROD) e tolbutamide metil-idrossilasi (TMOH) in microsomi epatici di bovino allo scopo di determinare i parametri di cinetica enzimatica: rispettivamente $0,23 \pm 0,051$ e $1010 \pm 155,7 \mu\text{M}$ per la K_m e $0,488 \pm 0,035$ e $0,089 \pm 0,006 \text{ nmol/min/mg proteina}$ per la V_{max} . La sensibilità dei metodi messi a punto ha permesso di valutare anche livelli di attività enzimatica molto bassi come quelli dei vitelli a carne bianca che vengono alimentati con una dieta a base di sostitativi del latte e basso contenuto di ferro. Infine, per verificare l'esistenza di differenze intra-specifiche nell'attività enzimatica, le attività di EROD e

TMOH sono state determinate utilizzando microsomi epatici di bovini di razza Charolais (CH), Blonde D'Aquitaine (BD) e Piemontese (PM). I risultati ottenuti per l'attività di EROD hanno evidenziato una maggiore attività nei bovini di razza CH vs PM ($p < 0,05$). E' stata dunque dimostrata, per la prima volta, l'esistenza di differenze intra-specifiche dovute alla razza relative a questa attività enzimatica, confermando quanto evidenziato da altri autori in relazione ad attività CYP3A-dipendenti (Dacasto *et al.*, 2003). Tali differenze potrebbero influenzare la biodisponibilità e l'efficacia clinica di xenobiotici (Sallovitz *et al.*, 2002) e potrebbero essere di particolare interesse nelle specie di interesse veterinario per l'ipotetica presenza di residui potenzialmente tossici negli alimenti di origine animale. Per quanto riguarda invece l'attività di TMOH non sono state evidenziate differenze statisticamente significative.

II) Valutazione dell'attività di idrossilazione del testosterone nel fegato di bovino: studio di cinetica enzimatica e di inibizione. In questo studio è stata valutata, tramite analisi in HPLC, la cinetica delle reazioni di idrossilazione del testosterone (TST) *in vitro*, con microsomi epatici di bovino. I parametri di cinetica enzimatica per le attività di 6 β - , 16 β - e 2 β -TST idrossilasi (OHT) sono risultati 93,4 \pm 13,8, 36,4 \pm 6,1 e 110,8 \pm 15,2 μ M rispettivamente, per la K_m e 0,558 \pm 0,03, 0,280 \pm 0,013 e 0,338 \pm 0,017 nmol/min/mg proteina per la V_{max} . Inoltre sono stati effettuati degli studi di inibizione chimica con inibitori di CYP3A (chetoconazolo) e di CYP2B (orfenadrina e 9- etinilfenantrene) per definire il coinvolgimento di CYP3A e potenzialmente di CYP2B in queste reazioni enzimatiche. I risultati ottenuti sono stati ulteriormente confermati con l'impiego di un anticorpo anti-peptide contro CYP3A4 di bovino. Dopo aver valutato la sua specificità con microsomi epatici di bovino, sono stati effettuati degli studi di immunoinibizione, che hanno evidenziato un'inibizione > 90% per le attività di 16 β - e 2 β -OHT e > 80% per 6 β -OHT. Nel complesso, questi risultati sembrerebbero suggerire il coinvolgimento predominante di CYP3A nella produzione dei tre principali metaboliti del TST nel fegato di bovino mentre CYP2B non sembrerebbe essere coinvolto.

III) Effetti di trattamenti illeciti su CYP3A nel fegato del bovino da carne e in colture primarie di epatociti di bovino. L'obiettivo principale di entrambe le prove sperimentali descritte è stato quello di dimostrare l'applicabilità del metodo HPLC e del substrato TST per la valutazione dell'attività enzimatica CYP3A-dipendente, allo scopo di verificare l'effetto del trattamento e di acquisire ulteriori evidenze sperimentali rispetto

ai risultati di studi precedentemente coinvolti dal nostro gruppo di ricerca sul vitello a carne bianca e sul vitellone.

In un primo esperimento, sono state determinate le attività di 6 β -, 16 β - e 2 β -OHT in microsomi epatici di bovini trattati con desametazone (D) e desametazone + estradiolo (DE). I risultati ottenuti hanno evidenziato un'induzione statisticamente significativa nelle attività di 6 β - e 16 β -OHT in D e DE vs controlli (K, $p < 0,05$) e nell'attività di 2 β -OHT in D e DE vs K ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, rispettivamente), confermando quanto riportato in letteratura per l'uomo (McCune *et al.*, 2000). Tali risultati sono stati convalidati ulteriormente dall'analisi in Immunoblotting che ha evidenziato un aumento dell'espressione di CYP3A in D e D+E vs K ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, rispettivamente).

In un secondo esperimento, sono state determinate le attività di 6 β -, 16 β - e 2 β -OHT in epatociti di bovino dopo 24 h di incubazione con boldenone (B), androsta-1,4-diene-3,17-dione (A) e B + A. I risultati ottenuti hanno evidenziato un trend inibitorio negli epatociti incubati con promotori di crescita rispetto a K. In particolare, le attività di 6 β e 16 β OHT sono state inibite in A e B vs K mentre l'attività di 2 β -OHT in A vs K ($p < 0,05$). A livello di proteina invece, non è stata riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa nell'espressione di CYP3A (Immunoblotting). L'effetto inibitorio osservato potrebbe essere dovuto alle dosi utilizzate; un caso di effetto inibitorio/tossico di alte dosi di sostanze inducenti è riportato da Kostrubsky *et al.* (1999) che hanno utilizzato epatociti di uomo per studiare l'induzione del sistema citocromo P450 evidenziando la necessità di effettuare degli studi dose-risposta in un ampio *range* di concentrazioni delle sostanze utilizzate e di valutarne la tossicità.

Nel complesso, i risultati ottenuti in questi due esperimenti hanno confermato la modulazione da parte di estrogeni, corticosteroidi ed anabolizzanti dell'espressione e la regolazione degli enzimi citocromo P450-dipendenti. Chiaramente, rimane comunque la necessità di spiegare più approfonditamente per quanto riguarda il bovino i meccanismi tramite i quali queste sostanze agiscono sia a livello pre-trascrizionale che post-trascrizionale.

IV) Valutazione dell'attività di CYP1A nel fegato di *Zosterisessor ophiocephalus* come biomarcatore di inquinamento nella laguna di Venezia. Recentemente, è stato dimostrato che i biomarcatori (BM) sono molto utili per rilevare dei cambiamenti biologici precoci nell'inquinamento ambientale. Uno dei BM più comunemente usati nei pesci è l'induzione dell'attività di etossiresorufina-O-deetilasi (EROD) che è un

indicatore dell'esposizione dell'organismo a composti potenzialmente tossici, come ad esempio i policloro-bifenili e gli idrocarburi aromatici policiclici (Burgeot *et al.*, 1994). Di conseguenza, lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare l'attività di EROD tramite HPLC in *Zosterisessor ophiocephalus*, una specie bentonica che date le sue caratteristiche, può rappresentare un utile indicatore biologico dei livelli di stress ambientale presente nella Laguna di Venezia. I pesci sono stati raccolti in primavera ed in autunno in tre aree della Laguna di Venezia: Porto Marghera (PM), Valle di Brenta (VB) e Porto Canale (PC); i campioni sono stati poi suddivisi in femmine, maschi e *sneakers* (maschi giovani). L'analisi fattoriale ha evidenziato la significatività dei fattori sito, categoria e stagione ($p < 0,001$) ma anche delle interazioni categoria* sito e categoria*stagione ($p < 0,01$). Per quanto riguarda l'effetto del sito in particolare, PM possedeva valori di attività di EROD significativamente più elevati rispetto a VB e PC ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, rispettivamente) e VB rispetto a PC ($p < 0,001$). Tali risultati sembrerebbero essere in accordo con i dati disponibili relativi alla concentrazione di inquinanti organici persistenti (POP) espressa come fattore di arricchimento (EF) nei sedimenti della Laguna di Venezia, i quali indicano una contaminazione maggiore nell'area circostante a Marghera (EF>12), intermedia nei pressi di Valle di Brenta (EF=5-12) e ridotta nel territorio contiguo al sito di Porto Canale (EF=1-5; Guerzoni *et al.*, 2004). L'effetto del sito dipendeva comunque dalla categoria di animali considerata ed in particolare sono state evidenziate delle differenze tra maschi e femmine, dovute probabilmente comunque al campione analizzato più che a differenze reali in termini di induzione. Dai risultati ottenuti, l'attività di EROD è da considerarsi un buon biomarcatore anche se, considerando la natura multifattoriale della risposta dell'individuo, è necessario l'utilizzo congiunto di più biomarcatori significativi per effettuare una valutazione accurata degli effetti dell'inquinamento nell'ecosistema acquatico.

V) Messa a punto di metodi high-throughput in luminescenza per la valutazione dell'attività di CYP3A e di CYP2C nel fegato di cavallo. Nell'ultimo capitolo della tesi, sono riportati i risultati relativi agli studi di cinetica enzimatica e di inibizione chimica volti alla valutazione delle attività di CYP2C e CYP3A nel fegato di cavallo mediante l'utilizzo di saggi Glo™. Lo scopo è stato quello di valutare le performance di questa tecnologia allo scopo di applicarla in studi di metabolismo e di interazioni tra farmaci. I parametri di cinetica enzimatica per le attività di CYP3A e di CYP2C sono risultati rispettivamente $14,5 \pm 7,3$ e $175,9 \pm 16,24$ μM per la K_m e $0,022 \pm 0,004$ e $0,025 \pm$

0,0009 nmol/min/mg proteina per la V_{max} . Chetoconazolo (inibitore di CYP3A) ha evidenziato un valore di IC_{50} pari a 0,035 μ M, confermando quindi una buona specificità del substrato luciferina (L)-derivato utilizzato per CYP3A (L-IPA). Sulfafenazolo (inibitore di CYP2C) ha evidenziato un valore di IC_{50} pari a 47,2 μ M, suggerendo dunque la necessità di effettuare ulteriori studi volti a verificare la specificità di substrato (L-H), ad esempio utilizzando altri inibitori selettivi per tale sottofamiglia come l'ibuprofene o il diclofenac. I metodi in luminescenza messi a punto permettono di analizzare un numero elevato di campioni in tempi brevi, di monitorare più di un'isoforma contemporaneamente nella stessa piastra e sono caratterizzati da una buona sensibilità, confermata dai valori di LOD ottenuti: 0,2 e 0,11 nM per L-H e L-IPA, rispettivamente. I risultati ottenuti dunque possono costituire un ottimo punto di partenza per poter applicare la tecnologia di tali saggi in studi relativi alle specie di interesse veterinario con vantaggi di costi e tempi di realizzazione delle analisi.

ABSTRACT

In veterinary medicine, the characterisation of the P450 isoenzymes is still incomplete and moreover, the substrates used were selected on the basis of the available knowledge from experiments in human or laboratory species without any kinetic or inhibition study (Fink-Gremmels, 2008). Defining the contribution of a P450 isoform in the metabolism of a specific drug is of great interest not only for veterinary pharmacology and toxicology but also for human health, for the potential presence of toxic residues in food animal products.

During the PhD course, projects dealing with the evaluation of cytochrome P450 activities in veterinary species have been developed. The aim was to increase knowledge about drug metabolizing enzymes in veterinary species and about the modulation of their activity. The modulation may be due to factors as breed but also exposure to environmental contaminants or somministration of illicit drugs used to enhance growth and consequently increase profit (Johnson, 2007). Data collected from these *in vitro* studies can be actually used to evaluate the effects of drug-drug interactions and for the plan of experimental projects aiming to identify *in vivo* markers of exposure or treatment.

I) Determination of CYP1A and CYP2C activities in bovine liver. In this study, accuracy, precision, LOD and LOQ of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) methods previously developed in the lab for the evaluation of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) e tolbutamide methyl-hydroxylase (TMOH) activities, have been determined. The aim was to calculate the enzyme kinetic parameters: respectively 0.23 ± 0.051 and $1010 \pm 155.7 \mu\text{M}$ for K_m and 0.488 ± 0.035 and 0.089 ± 0.006 nmol/min/mg protein for V_{max} . The methods were proved to be so sensitive to determine also very low levels of enzyme activity as those of veal calves fed with milk replacers and low iron content diet. Finally, to verify the presence of intra-specific differences in enzyme activity, EROD and TMOH were determined with liver microsomes from Charolais (CH), Blonde D'Aquitaine (BD) and Piedmontese (PM). The results of EROD evidenced higher activity in CH vs PM ($p < 0.05$). So, for the first time, the presence of breed differences in this enzyme activity was established, confirming also what reported by other authors for CYP3A-dependent activities (Dacasto *et al.*, 2005). These differences may influence bioavailability and clinical efficacy of xenobiotics

(Sallovitz *et al.*, 2002) and may be of particular interest in veterinary species for the potential presence of toxic residues in food animal products.

II) Testosterone hydroxylation in bovine liver: enzyme kinetic and inhibition study. This study evaluated, by HPLC analysis, the kinetic of testosterone (TST) hydroxylase activities *in vitro*, with liver microsomes from cattle. Kinetic parameters for 6 β -, 16 β - and 2 β -TST hydroxylase activities (OHT) were 93.4 \pm 13.8, 36.4 \pm 6.1 and 110.8 \pm 15.2 μ M respectively for K_m and 0.558 \pm 0.03, 0.280 \pm 0.013 and 0.338 \pm 0.017 nmol/min/mg protein for V_{max} . Moreover, chemical inhibition studies with a CYP3A inhibitor (ketoconazole) and CYP2B inhibitors (orphenadrine and 9-ethynylphenanthrene) were performed to establish the involvement of CYP3A and potentially of CYP2B in these enzyme reactions. To further confirm the results obtained, an anti-peptide antibody against bovine CYP3A4 was also used. The antibody specificity with bovine liver microsomes was evaluated and then immunoinhibition studies were conducted, evidencing > 90% inhibition for 16 β - and 2 β -OHT activities and > 80% for 6 β -OHT. These results seemed to suggest the predominant involvement of CYP3A in the production of the three main TST-hydroxylated metabolites in bovine liver while CYP2B seemed to be not involved.

III) Effects of illicit treatments on CYP3A in bovine liver and in primary cultures of bovine hepatocytes. These experiments intended to prove the applicability of the HPLC method and TST substrate for evaluating CYP3A activity, aiming to actually verify illicit treatments effect and collect more data respect to previous studies in veal calf and beef cattle.

In the first experiment, 6 β -, 16 β - and 2 β -OHT were determined in bovine treated with dexamethasone (D) and dexamethasone+estradiol (DE). The results obtained evidenced a significant induction for 6 β - and 16 β -OHT in D and DE *vs* control (K, p <0.05) and for 2 β -OHT in D and DE *vs* K (p <0.05 and p <0.01, respectively), confirming what reported for human (McCune *et al.*, 2000). These results were confirmed by Immunoblotting which evidenced increasing in CYP3A protein expression in D and D+E *vs* K (p <0.01 and p <0.05, respectively).

In the second experiment, 6 β -, 16 β - and 2 β -OHT were determined in bovine hepatocytes after 24 h incubation with boldenone (B), androsta-1,4-diene-3,17-dione (A) and B + A. The results showed an inhibitory trend in hepatocytes incubated with growth promoters *vs* controls (K). In particular, 6 β and 16 β OHT were inhibited in A

and B vs K while 2 β -OHT in A vs K ($p < 0.05$). At the protein level instead, no significant difference was found in CYP3A expression (Immunoblotting). The inhibitory effect observed may be due to the high doses used; inhibitory/toxic effects of high doses of inducing agents were evidenced for instance by Kostrubsky *et al.* (1999) who used human hepatocytes to study induction of cytochrome P450, stressing the importance of large dose-response studies as well as the need to assess toxicity in these investigations.

The results obtained in these experiments confirmed the modulation of expression and regulation of cytochrome P450 enzymes by estrogens, corticosteroids and anabolic steroids. There is the need however, to explain deeply for bovine the mechanism through that these compounds act at pre- and post-transcriptional level.

IV) Determination of CYP1A activity in the liver of *Zosterisessor ophiocephalus* as biomarker of pollution in the Venice Lagoon. Recently, it was proved that biomarkers (BM) are very useful to evidence early biological changes in environmental pollution. One of the most common BM used in fishes is the induction of the P450 system and in particular ethoxyresorufin O-deethylase activity (EROD) is a marker of fish exposure to potentially toxic compounds, i.e. poli-chlorinated biphenils and polycyclic aromatic hydrocarbons (Burgeot *et al.*, 1994). The aim of this study was to evaluate by HPLC EROD activity in *Zosterisessor ophiocephalus*, a benthic fish that may represent an useful bioindicator of environmental stress in the Venice Lagoon. Fishes were collected in spring and autumn in three different areas of the Venice Lagoon: Porto Marghera (PM), Valle di Brenta (VB) and Porto Canale (PC); the samples were then classified in females, males and sneakers (small males, < 1 years-old).

Factorial analysis of EROD activity results evidenced that site, fish category and season were significant ($p < 0,001$), and the interactions category*site and category *season as well ($p < 0,001$). Considering site effect in particular, in PM EROD activity values were significantly higher than in VB and in PC ($p < 0,01$ and $p < 0,001$, respectively) and in VB higher than in PC ($p < 0,01$). These results were in agreement with the available data relative to persistent organic pollutants (POPs) concentration (expressed as enrichment factor, EF) in the sediments of the Venice Lagoon, that showed major contamination in the area close to Porto Marghera (EF>12), intermediate in the area of Valle di Brenta (EF=5-12) and low around Porto Canale (EF=1-5; Guerzoni *et al.*, 2004). However, site effect depended on the fish category and in particular differences were found between males and females, due more probably to the

analyzed samples than to real differences in induction. From these results, EROD activity may be considered an useful biomarker even if, considering the multifactorial response of individuals, it is important to use several significant biomarkers to accurately evaluate the effects of environmental pollution in the aquatic ecosystem.

V) Luminescence high-throughput methods for determining CYP3A and CYP2C activities in horse liver. In the last part of the thesis, results of kinetic and inhibition studies to evaluate CYP2C and CYP3A activities in horse liver through Glo™ assays were reported. The aim was to evaluate the performances of this technique for drug metabolism or drug-drug interaction studies. Enzyme kinetic parameters for CYP3A and CYP2C activities were respectively 14.5 ± 7.3 and 175.9 ± 16.2 μM for K_m and 0.022 ± 0.0004 and 0.025 ± 0.0009 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein for V_{max} . Ketoconazole (CYP3A inhibitor) evidenced IC_{50} values of 0.035 μM , confirming good specificity of the luciferin (L)-derivative substrate used for CYP3A (L-IPA). Sulfaphenazole (CYP2C inhibitor) evidenced IC_{50} values of 47.2 μM , suggesting the need to conduct further studies to verify substrate specificity (L-H), for instance using other selective inhibitors for the CYP2C subfamily as ibuprofen or diclofenac. Luminescence methods allowed to analyse many samples in short time, to monitor more than one isoform simultaneously in the same plate and showed good sensitivity confirmed by LOD values: 0.2 and 0.11 nM for L-H and L-IPA, respectively. So, these results may represent a good starting point to apply this technique in drug metabolism and drug-drug interaction studies in veterinary species.

CAPITOLO 1

Introduzione

1.0 Il sistema citocromo P450

Il sistema monossigenasico citocromo P450 dipendente è noto anche come sistema ossidasico a funzione mista (Mixed Function Oxidase System, o M.F.O.S.), ed è il complesso enzimatico più versatile esistente in natura.

Nei procarioti questi enzimi si trovano liberi nel citosol, mentre negli eucarioti sono associati alla matrice fosfolipidica del reticolo endoplasmatico liscio (Fig. 1.1) ed alla membrana mitocondriale interna. La presenza dei fosfolipidi favorisce l'interazione tra gli enzimi costituenti il complesso e l'accessibilità del substrato al sistema enzimatico attivo.

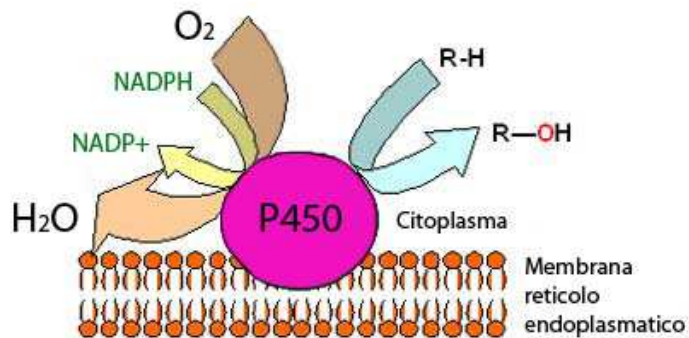


Figura 1.1. *Disposizione spaziale del sistema di ossidasi miste microsomiali sul reticolo endoplasmatico liscio.*

I citocromi P450 (CYP) hanno ottenuto questa denominazione dal loro carattere di emoproteine a dalle loro insolite proprietà spettrali in quanto presentano un massimo di assorbimento tipico del complesso ridotto legato al monossido di carbonio a 450 nm:

citocromo sta per emoproteina, P per pigmento e 450 riflette il picco di assorbimento del complesso CO a 450 nm (Bernhardt, 2006).

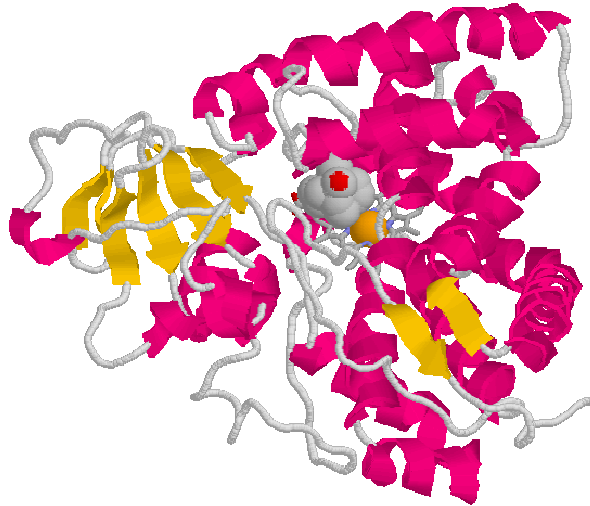


Figura 1.2. Struttura tridimensionale del CYP450.

Il sistema ossidativo è un complesso multienzimatico composto essenzialmente da:

- varie isoforme di citocromo P450, appartenenti ad un'unica superfamiglia genica di emoproteine;
- una reduttasi, necessaria affinché avvenga la reazione monossigenasica, per il trasferimento degli equivalenti riducenti al sito catalitico dell'enzima.

Negli eucarioti gli elettroni sono forniti dal NADPH, mentre nei sistemi batterico e mitocondriale il donatore di elettroni è rappresentato dal NADH.

Per completare la reazione monossigenasica mediante il trasferimento di un secondo elettrone, alcune isoforme di P450 (ad esempio il CYP2E1), oltre alla NADPH-citocromo P450-reduttasi, richiedono la presenza del citocromo b₅ e della sua reduttasi. Il citocromo b₅ è una proteina anfipatica di 15 kDa con un dominio catalitico eme citosolico all'estremità amino-terminale, che è ancorata alla membrana microsomiale da un'alfa elica idrofobica transmembrana alla sua estremità carbossi-terminale. I due domini sono collegati da un dominio *linker* di circa 15 aminoacidi, Ser⁹⁰ – Asp¹⁰⁴ (Clarke *et al.*, 2004; Fig. 1.3).

Negli animali il sistema citocromo P450 è particolarmente abbondante nel fegato, dove, ad oggi, sono state identificate più di 200 isoforme diverse. E' interessante notare

che, pur appartenendo ad un'unica superfamiglia genica, le varie isoforme di CYP differiscono per struttura primaria, peso molecolare, specificità di substrato, chimica e stereochimica dei prodotti, proprietà spettrali. Inoltre esse possono essere espresse costitutivamente o essere indotte da varie molecole naturali o di sintesi. Possono essere specie-specifiche, sesso-specifiche e tessuto-specifiche, e possono anche essere up-regolate in condizioni fisiologiche o patologiche (ad esempio digiuno o diabete).

Particolarmente significativo è il fatto che, nonostante le differenze nella sequenza amminoacidica e nell'attività catalitica derivanti dal processo evolutivo, la struttura tridimensionale e l'assetto funzionale dei CYP450 siano rimasti pressoché inalterati. In particolare, risultano altamente conservati la regione legante l'eme, il sito di trasferimento degli elettroni tra la reduttasi ed il citocromo, e la regione che lega l'ossigeno.

Studi sulla struttura primaria di vari citocromi P450 hanno portato a concludere che questi enzimi sono tutti prodotti genici distinti, costituiti da una singola catena polipeptidica contenente una componente eminica, ed un peso molecolare tra 48 e 57 kDa (corrispondente a circa 500 residui amminoacidici). La catena polipeptidica, nonostante la diversità nella sequenza degli amminoacidi, presenta sempre una regione idrofobica all'estremità aminotermine, di circa 10-15 amminoacidi, che è responsabile, negli eucarioti, dell'ancoraggio del citocromo alla membrana. A questa regione seguono una breve sequenza cationica ed una serie di proline. La restante parte della catena è rivolta verso il citosol e presenta tratti di sequenza idrofobici alternati a tratti idrofilici (Backes, 1993; Ryan e Lewin, 1990).

Analizzando, invece, la struttura secondaria con specifiche tecniche è stato evidenziato che nell'enzima sono presenti tratti amminoacidici ripiegati a formare sia α -eliche che foglietti- β (β_1 - β_5).

Per quanto riguarda la struttura tridimensionale, sono disponibili immagini ai raggi X e modelli computazionali di alcuni citocromi idrosolubili. Si tratta, per lo più, di CYP450 batterici, poiché negli eucarioti si trovano immersi nella membrana fosfolipidica, risultando, quindi, di difficile cristallizzazione.

Dallo studio delle proteine cristallizzate, e dalla successiva comparazione con le sequenze dei CYP450 noti, è emerso che la regione maggiormente conservata è quella che circonda l'eme, detta "core". Essa è implicata nel legame con l'ossigeno e nel trasferimento degli equivalenti riducenti tra la reduttasi ed il citocromo stesso. Tale regione comprende la sequenza consenso che caratterizza i CYP450 (Phe-X-X-Gly-X-

Arg-X-Cys-X-Gly), essenziale per il legame dell'eme all'apoproteina, ed il motivo Glu-X-X-Arg, completamente conservato in tutte le isoforme e probabilmente indispensabile per la stabilizzazione del *core* stesso. Le regioni che presentano la sequenza meno conservata sono, invece, rappresentate dal sito di riconoscimento del substrato e dalla regione amminoterminale.

In quanto emoproteina, ogni citocromo P450 presenta come gruppo prostetico una ferroporfirina IX che si trova a livello del *core*, inserito in una tasca idrofobica. In seno a questa tasca, oltre ad interazioni idrofobiche ed attrazioni coulombiane, si stabilisce un legame di coordinazione fra il ferro dell'eme, al centro dell'anello tetrapirrolico, ed una cisteina dell'apoproteina (Poulos, 1991; Fig. 1.4).

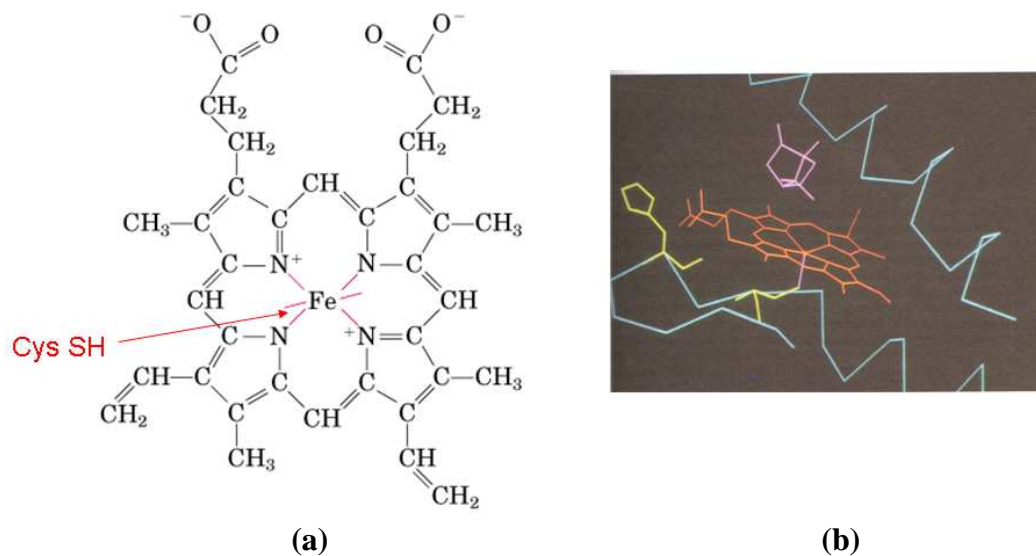


Figura 1.3. a) Schema del gruppo prostetico del citocromo P450; b) modello tridimensionale.

Nelle cellule animali, i citocromi sono localizzati prevalentemente nei mitocondri o nel reticolo endoplasmatico dove, assieme ad altre molecole, formano un complesso deputato al trasporto degli elettroni coinvolti in reazioni di ossido-riduzione.

Il citocromo P450 microsomiale viene considerato l'agente terminale di un sistema ossidativo basato sul trasferimento degli elettroni.

Le reazioni di ossidazione richiedono la presenza di ossigeno molecolare, di NADPH e del sistema ossidasico rappresentato da due enzimi accoppiati, la NADPH citocromo P450 reduttasi e il citocromo P450. I sistemi citocromo P450 catalizzano la seguente reazione:



La NADPH citocromo P450 reduttasi ha una spiccata affinità per il cofattore NADPH ed è una flavoproteina capace di trasferire da uno a due elettroni al citocromo P450.

La reazione ciclica catalizzata dal citocromo P450 è caratterizzata dalla capacità del ferro eminico di mediare reazioni cicliche di ossido - riduzione in relazione sia del substrato, sia dell'ossigeno molecolare. Il substrato (RH) si lega alla forma ossidata del citocromo P450 (Fe^{3+}) per formare un complesso binario enzima - substrato. Il citocromo viene quindi ridotto allo stato di Fe^{2+} per acquisizione di un elettrone messo a disposizione dalla flavoproteina NADPH citocromo P450 reduttasi. Il complesso substrato - citocromo ridotto incorpora una molecola di ossigeno (O_2), cui fa seguito l'acquisizione di un altro elettrone che proviene da NADPH tramite la NADPH citocromo P450 reduttasi o alternativamente da NADH tramite la NADH citocromo b₅ reduttasi. L'inserimento di uno o di entrambi gli elettroni fa passare l'ossigeno molecolare allo stato di ossigeno attivo (O_2^-). Il complesso substrato-citocromo- O_2^- , attraverso una serie di tappe, acquisisce due ioni (H^+) liberando una molecola di H_2O , il substrato idrossilato (ROH) e la forma ossidata del citocromo P450, che è pronto così ad iniziare un nuovo ciclo (Fig. 1.5).

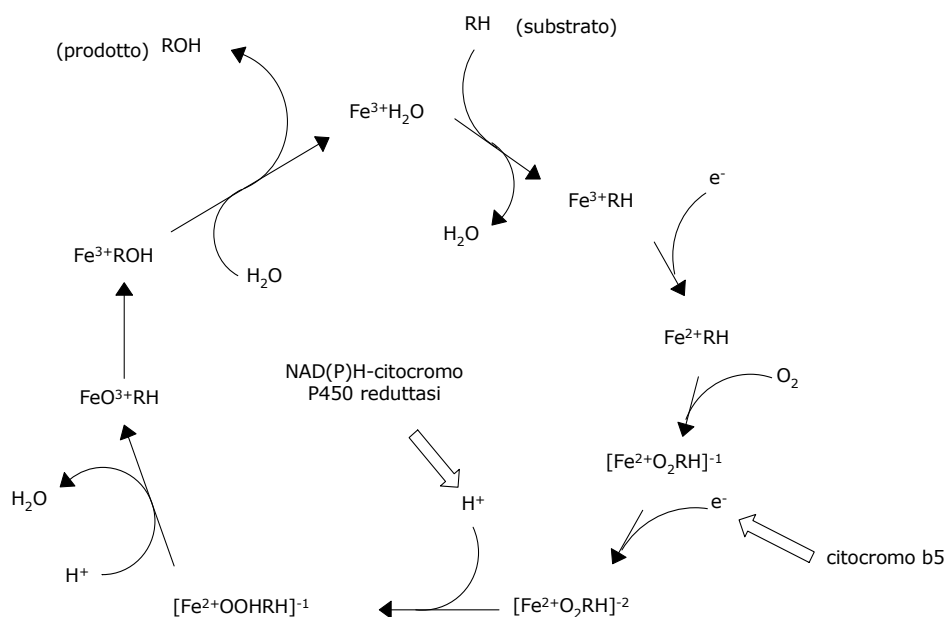


Figura 1.4. Ciclo catalitico del citocromo P450.

1.1 Il ruolo del citocromo P450

Tra i sistemi enzimatici esistenti in natura il sistema monossigenasico citocromo P450 dipendente ha un ruolo predominante nel metabolismo sia di composti esogeni, con azione di bioattivazione o di detossificazione, che endogeni, con la formazione di molecole coinvolte in importanti vie fisiologiche, ad esempio acidi grassi, steroidi, acidi biliari.

L'uomo e le varie specie animali presentano diversi meccanismi di autodifesa nei riguardi dei possibili effetti nocivi derivanti dalla presenza nell'organismo di xenobiotici; tra questi, risulta molto importante la capacità di eliminarli. La sostanza estranea, se di natura organica volatile, può essere immediatamente eliminata attraverso le vie respiratorie senza aver subito alcuna biotrasformazione. Se invece la sostanza viene assorbita dall'organismo, essa viene eliminata principalmente da fegato e reni, con il contributo di altri organi o tessuti (Witkamp, 1992). Affinché gli xenobiotici vengano eliminati, è necessario che siano trasformati da molecole lipofile a molecole idrofile e polari, in modo da potersi solubilizzare negli escreti e secreti ed essere così eliminati attraverso feci, urine, saliva, sudore, ecc. Queste trasformazioni rappresentano

il processo di biotrasformazione e degradazione delle sostanze esogene e costituiscono quello che è conosciuto come il metabolismo dei farmaci.

La biotrasformazione di un farmaco può portare alla formazione di vari metaboliti, che possono essere diversi fra loro e privi dell'attività farmacologica del composto iniziale; a volte però i metaboliti formati possono avere ancora una ridotta attività, oppure presentare tossicità o, infine, divenire attivi soltanto dopo biotrasformazione (Chiesara e Radice, 1997).

Come già accennato, la biotrasformazione dei farmaci può comprendere due fasi.

Gli enzimi di fase I introducono un gruppo polare reattivo (-OH, -COOH, -NH₂) nella molecola del farmaco, catalizzando così reazioni di ossidazione, riduzione e idrolisi. Le reazioni di fase I possono comprendere:

- idrossilazione alifatica, in cui vi è l'inserimento di un atomo di ossigeno nel legame carbonio-idrogeno;
- idrossilazione aromatica, con l'aggiunta di un radicale -OH all'anello aromatico;
- epossidazione degli alcheni, in cui l'ossigeno viene addizionato al doppio legame carbonio-carbonio, con successiva idrolisi.

Le reazioni di ossidazione sono catalizzate da enzimi quali alcool e aldeide deidrogenasi, ma soprattutto dalle monossigenasi citocromo P450 dipendenti e dalle monoossigenasi flaviniche, importanti nel metabolismo di farmaci, xenobiotici e composti endogeni (steroidi, glicocorticoidi, ecc.). Nelle reazioni di idrolisi sono coinvolti enzimi come le amidasi e le epossido-idrolasi, mentre le reazioni di riduzione sono operate da reduttasi microsomiali (es. NADPH citocromo P450 reduttasi) o citosoliche o dallo stesso P450 (con basse tensioni di ossigeno).

Le reazioni di fase I portano quindi alla formazione di composti che rappresentano il substrato ideale per le reazioni di fase II.

Le reazioni di fase II determinano la coniugazione dello xenobiotico con un substrato idrofilico di origine endogena, attraverso enzimi quali la glucuronil-transferasi, la glutatione-transferasi, l'acetil-transferasi o la solfo-transferasi. Lo xenobiotico acquista così maggior solubilità ed elevata ionizzazione a pH fisiologico (Alberti e Villa, 1984). Si tratta dunque di reazioni di tipo biosintetico che si svolgono con dispendio di energia. Ciò avviene mediante attivazione di cofattori o, eccezionalmente, del substrato a intermedi ad alto contenuto energetico. Dato che i

cofattori sono attivati, direttamente o indirettamente, dall'ATP, la loro disponibilità è sostanzialmente legata allo stato energetico di organi e tessuti (Casarett & Doull, 2001).

Tabella 1.1. Principali reazioni di biotrasformazione.

REAZIONI DI FASE I		
OSSIDAZIONI microsomiali (citocromo P450)		
Tipo di reazione	Substrato	Prodotto
Idrossilazione aromatica	Fenitoina	Idrossi-fenitoina
Idrossilazione alifatica	Pentobarbitale	Idrossi-pentobarbitale
Eossidazione	Carbamazepina	Carbamazepina-eossido
Sulfossidazione	Cloropromazina	Cloropromazina-sulfossido
O-dealchilazione	Codeina	Morfina
N-dealchilazione	Diazepam	Nordiazepam
Desulfurazione	Tiopentale	Pentobarbitale
Dealogenazione	Alotano	Cloro, bromo, più radicali liberi
Deidrogenazione	Paracetamolo	N-acetil-benzochinoneimina
OSSIDAZIONI extramicrosomiali (frazione solubile del citoplasma)		
Alcol deidrogenasi	Etanolo	Aldeide acetica
Aldeide deidrogenasi	Aldeide acetica	Acido acetico
Monoaminoossidasi	Dopamina	Ac. diidossifenilacetico
Xantinoossidasi	Basi puriniche	Ac. urico
RIDUZIONI		
Carbonil ridutasi	Aldeidi e chetoni	Alcoli
Chinone ossidoriduttasi	Chinoni	Idrochinoni
Glutazione riduttasi	Glutazione	Glutazione ridotto
IDROLISI		
Esterasi	Acetilcolina	Ac. acetico + colina
Epossido idrolasi*	Epossidi	Diidrioli
Amidasi**	Lidocaina	Xilidina
REAZIONI DI FASE II		
CONIUGAZIONI		
Glucoroniltransferasi*	Ac. glucuronico	Glucuronide (idrossi-fenobarbitale)
Solfotransferasi	Zolfo	Solfato (fenolo)
N - aciltransferasi	Aminoacidi***	Ac. ippurico (ac. benzoico più glicina)
Acetiltransferasi	Ac. Acetico	Acetilisoniazide (isoniazide)
Metiltransferasi	Metile	Caffeina (teofillina)
Glutazione - S - transferasi	Glutazione	GS - acetil - benzo - chinoneimina (paracetamolo)
*reazione microsomiale; **velocità della reazione più lenta rispetto alle esterasi; ***avviene nei mitocondri		

1.2 Isoforme del citocromo P450

Il citocromo è costituito da una superfamiglia di emoproteine, comprendente diverse isoforme, le quali sono caratterizzate da un identico gruppo prostetico, ma risultano differenti nella struttura dell'apoproteina, responsabile a sua volta della più o meno larga specificità per il substrato (Ioannides,1996).

La superfamiglia dei citocromi P450 è stata così suddivisa in famiglie, che presentano un'omologia nella sequenza aminoacidica superiore al 40% e sottofamiglie che presentano un'omologia superiore al 55% e comprendono una o più forme individuali della proteina (<http://drnelson.utmem.edu/clans.html>; Fig. 1.6).

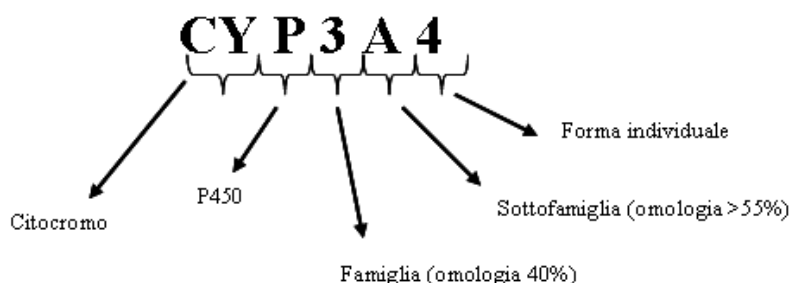


Figura 1.5. Nomenclatura corrente del CYP450.

Ad oggi sono state descritte circa 200 famiglie di CYP, di cui 15 presenti in tutti i mammiferi. Le famiglie maggiormente studiate fino ad ora nei mammiferi sono le prime quattro: le famiglie 1, 2 e 3 sono implicate soprattutto nel metabolismo degli xenobiotici, ma partecipano anche al metabolismo di substrati endogeni; la famiglia 4 metabolizza sia sostanze esogene che endogene. Le altre famiglie, indicate con un numero superiore a 4, metabolizzano soprattutto molecole endogene (Tab. 1.1).

Tabella 1.2. Caratteristiche generali delle prime 4 famiglie di citocromo P450

Famiglia	Sottofamiglia	Attività caratteristica
CYP1	A, B	Metabolismo farmaci (etossiresorufina,...)
CYP2	A, B, C, D, F, G, J, R, S, T, U, W	Metabolismo farmaci e steroidi (aminopirina, progesterone, testosterone, tolbutamide....)
CYP3	A, B, F	Metabolismo farmaci e steroidi (eritromicina, ciclosporina,...)
CYP4	A, B, F	Metabolismo acido arachidonico, acidi grassi, composti aminoaromatici e furanici.

1.3 Citocromo P450 in specie di interesse veterinario

La biotrasformazione degli xenobiotici è un fenomeno molto complesso, soggetto a differenze di specie ed influenzato inoltre da fattori di natura fisiologica (genetica, età, sesso, gestazione, dieta, quadro ormonale), patologica ed ambientale. I meccanismi di biotrasformazione degli xenobiotici e la loro regolazione presentano molte differenze interspecifiche ed intraspecifiche e la conoscenza di questi processi è approfondita per quanto riguarda l'uomo e gli animali da laboratorio, ma è ancora piuttosto limitata per quanto riguarda gli animali di interesse zootecnico per i quali è necessario valutare un maggior numero di variabili.

Negli ultimi anni comunque, i tentativi di indagare sull'attività delle isoforme di citocromo P450 nelle specie di interesse veterinario hanno effettuato un balzo in avanti.

Diverse unità operative hanno affrontato queste tematiche; ad esempio Sivapathasundaram *et al.* (2001) hanno effettuato uno studio per definire l'attività del citocromo P450 nel fegato di bovino rispetto a quello di ratto, valutando sia l'attività catalitica sia l'espressione dell'apoproteina.

Nebbia *et al.* (2003) hanno poi valutato l'espressione dell'apoproteina e le attività catalitiche delle isoforme di citocromo P450 coinvolte nella biotrasformazione degli xenobiotici con microsomi di fegato di cavallo e le hanno comparate con quelle determinate con microsomi di bovino, maiale, pollo, coniglio e di animali da laboratorio (ratti).

In seguito, Szotàková *et al.* (2004) hanno valutato contemporaneamente e comparato le attività delle principali isoforme di citocromo ed enzimi di coniugazione in quattro principali specie da allevamento: maiale, bovino, pecora e capra.

Lo studio delle attività di citocromo P450 nei pesci costituisce invece un capitolo a parte; la maggior parte degli studi è volto a valutare la modulazione di tali attività in seguito ad esposizione ad inquinanti ambientali allo scopo quindi di studiare i fattori ecologici e ambientali che la determinano. Diversi studi hanno documentato ad esempio una correlazione tra l'induzione di CYP1A, i livelli di contaminanti e l'incidenza dei tumori, specialmente nelle specie bentoniche. Ad esempio la trota è stata utilizzata come modello per lo studio dei tumori per documentare il ruolo della modulazione di CYP1A nell'inibizione o nello sviluppo/progressione del cancro (Williams *et al.*, 1998).

I risultati degli studi nelle specie di interesse veterinario hanno comunque evidenziato non solo la necessità di approfondire le conoscenze, ma anche di verificare le condizioni utilizzate che spesso sono quelle messe a punto per l'uomo e gli animali da laboratorio. I dati ottenuti dai diversi gruppi di ricerca sono spesso poi difficili da confrontare in quanto i metodi applicati sono diversi e/o prevedono l'utilizzo di substrati diversi. Inoltre, solo pochi studi includono la determinazione dei parametri di cinetica enzimatica per le varie isoforme di citocromo P450 nelle specie di interesse veterinario (Fink-Gremmels, 2008).

Di conseguenza, anche l'interpretazione dei risultati diventa ambigua proprio a causa delle possibili differenze di affinità che un substrato o un anticorpo possono avere nei confronti di isoforme di uno stesso enzima, che possono essere codificate con differenze anche minime legate alla specie e/o alla razza.

1.4 Fattori modulanti gli enzimi biotrasformativi

1.4.1 Fattori intrinseci

I fattori che modulano la capacità biotrasformativa sono di notevole interesse generale, nonostante gli studi riguardanti questo aspetto siano tuttora molto limitati negli animali domestici. Le differenze nell'espressione e nell'attività degli enzimi biotrasformativi soprattutto nel fegato giustificano variazioni nell'entità del processo biotrasformativo degli xenobiotici che si riscontrano in specie e razze diverse e anche tra i singoli individui.

Le informazioni tuttora disponibili nelle specie da laboratorio e di interesse veterinario comprendono la valutazione di differenze specie-specifiche (Machala *et al.*, 2003; Nebbia *et al.*, 2003; Szotàkovà *et al.*, 2004), ontogenetiche (Gorski *et al.*, 2003; Nebbia *et al.*, 2004), legate alla razza (Dacasto *et al.*, 2005; Giantin *et al.*, 2008), al sesso (Kedderis e Mugford, 1998; Bogaards *et al.*, 2000; Dacasto *et al.*, 2005) ed a condizioni fisio-patologiche (He *et al.*, 2005a e 2005b).

Tra i fattori intrinseci in assoluto più studiati, si annoverano le differenze specie-specifiche, in particolare la diversa suscettibilità nei confronti di diversi composti tossici. Un esempio in medicina veterinaria è costituito dal gatto, carente in attività di

glucuronidazione e quindi sensibile nei confronti di diversi antinfiammatori non steroidei, come ad esempio il paracetamolo (Clarke *et al.*, 1981).

Un minor numero di informazioni riguardano gli effetti legati al sesso; nel ratto e nelle specie aviarie ad esempio è riportato che in generale il maschio metabolizza i composti esogeni molto più rapidamente rispetto alle femmine della stessa specie, determinando una più veloce eliminazione della molecola, ma, anche sono in grado di metabolizzare più rapidamente i composti che richiedono una bioattivazione (Timbrell, 1982; Pampori e Shapiro, 1993).

Infine, anche gli effetti della razza sono stati ampiamente evidenziati nell'uomo: ad esempio, differenze nel metabolismo dei chemioterapici sono stati evidenziati in donne, affette da tumore al seno, appartenenti a razze diverse (Flaws e Bush, 1998). Inoltre, differenze etniche sono state evidenziate anche nella risposta al trattamento con farmaci anti-depressivi (non risposta, intolleranza, risposta rallentata), dovute ad un metabolismo più lento o più veloce di tali farmaci (Roi, 2007). Tali differenze in molti casi sono state ascritte a polimorfismi genetici nella sequenza degli enzimi biotrasformativi e dei recettori che controllano la loro espressione (Nebert e Roe, 2000).

1.4.2 Induzione enzimatica

L'attività degli enzimi biotrasformativi può aumentare in seguito al trattamento con sostanze estranee di natura e di origine diversa come farmaci, pesticidi, sostanze chimiche di origine industriale e prodotti di origine naturale destinati all'alimentazione (ad es. etanolo). L'effetto è detto induzione enzimatico–metabolica ed è il risultato di un aumento della sintesi e/o dell'attività di enzimi biotrasformativi.

Il tempo di latenza della comparsa dell'induzione, l'intensità e la sua durata possono variare in funzione dell'agente inducente, della dose somministrata, della durata dell'esposizione, della razza e del sesso. L'aumento dell'attività metabolizzante indotto da un farmaco si può manifestare con un'accelerazione del metabolismo sia dello stesso induttore che di altri composti strutturalmente non correlati.

Le ricerche condotte per evidenziare i possibili induttori tra i farmaci e le sostanze chimiche hanno dimostrato che la maggioranza di questi composti è lipofila.

Attualmente, sono state definite cinque classi di induttori:

- Fenobarbitale (insetticidi, barbiturici)

- 3-Metilcolantrene (idrocarburi aromatici policiclici, diossine e policlorobifenili)
- Pregnenolone-16 α -carbonitrile (PCN)
- Acido clofibrico
- Isoniazide

I primi quattro agenti inducenti determinano un marcato aumento (>10 volte) nella velocità di trascrizione di una o più isoforme specifiche di citocromo P450.

Il trattamento con fenobarbitale (PB) induce sia ipertrofia del fegato che proliferazione del reticolo liscio endoplasmatico, soprattutto negli epatociti localizzati nella regione centrolobulare; queste modificazioni si accompagnano ad aumento del contenuto di proteine e fosfolipidi e della sintesi di enzimi quali la NADPH citocromo P450 reduttasi e alcune forme isoenzimatiche del citocromo P450. A livello molecolare, il PB sembra attivare il *constitutive androstane receptor* (CAR β), una *DNA-binding protein*, la quale dimerizza con il *retinoid X receptor* (RXR), entra nel nucleo e si lega a specifici elementi responsivi del PB (PBRE) che precedono il gene del citocromo 2B1 e numerosi altri geni correlati, aumentandone l'espressione genica.

Gli induttori appartenenti al secondo gruppo hanno un meccanismo molecolare di induzione metabolica ormai del tutto chiarito (Fig. 1.7).

Essi si legano, ad un recettore, denominato Ah, di circa 280 kDa, che funge da fattore di trascrizione capace di legare il DNA. Nella sua forma inattiva il recettore Ah, si trova nel citosol e forma un complesso solubile, accoppiato con due *heat-shock proteins* (Hsp 90). Il legame del recettore Ah con un ligando provoca un cambiamento conformazionale del recettore che permette al complesso di traslocare nel nucleo. Qui il complesso ligando-Ah si libera per legarsi ad una *Ah related nuclear traslocator* (ARNT) Il complesso Ah-ligando-ARNT interagisce con una regione specifica del genoma, denominata *xenobiotic responsive element* (XRE), che contiene i geni che codificano per diversi enzimi biotrasformativi, tra i quali il più significativo è il citocromo P450 1A.

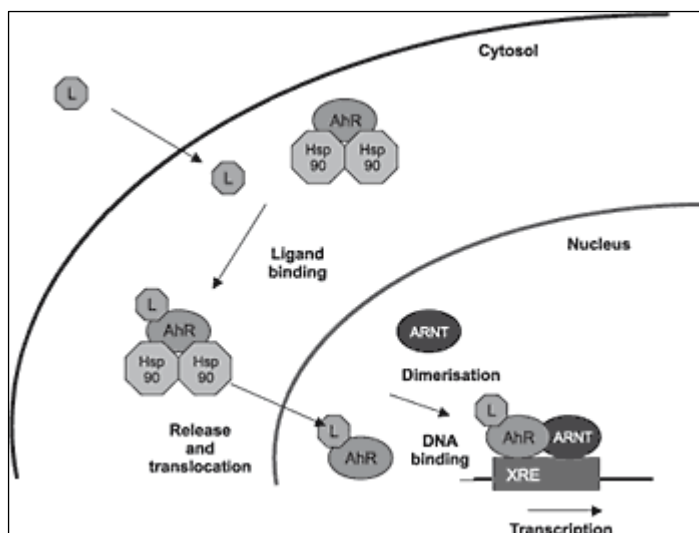


Figura 1.6: Meccanismo dell'induzione mediata dal recettore Ah

Il PCN e gli altri induttori ad esso correlati determinano l'induzione del citocromo 3A1, legandosi ad un recettore orfano denominato *pregnane-X-receptor* (PXR). Il recettore PX, attivato dal ligando, dimerizza con RXR e trasloca nel nucleo dove lega specifici elementi responsive che attivano la trascrizione di CYP3A1 e di altri geni inducibili dal PCN.

Il trattamento con acido clofibrico determina una spiccata induzione di CYP4A1, CYP4A2 and CYP4A3. A questo gruppo appartengono anche antinfiammatori non steroidei, acido nicotinico, deidroepiandrosterone solfato. Il legame di questi composti con il *peroxisome-proliferator-activated receptor* (PPAR α) porta alla formazione di un eterodimero con RXR che si lega ad una sequenza regolatoria del DNA nota come *peroxisome proliferator response element* (PPRE) provocando un aumento della trascrizione di CYP4A e proliferazione dei perossisomi.

L'isoniazide, un antibiotico antitubercolare, provoca un aumento della sintesi di CYP2E1. Al quinto gruppo degli induttori del citocromo P450 appartengono anche l'etanolo, l'acetone, il chetoconazolo (antifungino). Il citocromo 2E1 viene indotto attraverso l'attivazione trascrizionale del gene relativo nonchè la stabilizzazione e l'aumento di efficienza della traduzione dell'mRNA (Casarett & Doull's, 2001).

1.4.3 Inibizione enzimatica

Alcune sostanze sono invece in grado di inibire il metabolismo di numerosi composti anche non correlati. Il fenomeno può avere luogo con diversi meccanismi quali: la distruzione di enzimi preesistenti, l'inibizione della sintesi di enzimi, la loro complessazione o inattivazione. L'inibizione può avvenire anche per competizione per i siti attivi o per i fattori degli enzimi, per blocco delle componenti di trasporto in sistemi multienzimatici o per modificazioni allosteriche nelle strutture enzimatiche. Molte sostanze estranee producono effetti selettivi di tipo inibitorio per alcuni isoenzimi del citocromo P450 in funzione della specie animale e della dose. Inoltre il grado di inibizione è variabile con il tempo e numerosi agenti, che inizialmente inibiscono il citocromo P450, danno successivamente un fenomeno di tipo induttivo (es. l' SKF 525 o il piperonil-butossido).

Numerose sostanze estranee, farmaci e sostanze tossiche, sono capaci di distruggere il citocromo P450 nel fegato mediante diversi meccanismi. Uno, conosciuto sotto il nome di inibizione suicida, è mediato da alcune sostanze ad attività porfirigenica che contengono delle funzioni olefiniche o acetileniche e che formano nel fegato un "pigmento verde" recentemente identificato come prodotto di alchilazione derivato dall'interazione substrato-eme del citocromo P450. La maggioranza di queste sostanze sono inattive per sé e richiedono un'attivazione tramite lo stesso citocromo P450. Da sottolineare che l'azione tossica di queste sostanze sembra estremamente selettiva per il citocromo P450, in quanto le concentrazioni di citocromo b₅ o di altre emoproteine di membrana del reticolo endoplasmatico non sono di solito modificate. Fra le varie sostanze che inibiscono le reazioni catalizzate dal P450 mediante inattivazione suicida, devono essere ricordati alcuni alcani alogenati (CCl₄), alcheni (vinilcloruro, tricloroetilene) e composti ad attività terapeutica contenenti dei gruppi allilici come il secobarbital o acetilenici come il noretindrone acetato.

Altre sostanze inibiscono invece le reazioni di biotrasformazione mediante la riduzione della sintesi sia degli enzimi di biotrasformazione sia degli enzimi necessari alla produzione di cofattori. A questo gruppo, oltre agli inibitori della sintesi proteica, appartengono alcune sostanze più selettive nel loro meccanismo di inibizione. Ad esempio, il 3-amino-1-2-3-triazolo diminuisce la sintesi del citocromo P450 inibendo la sintesi delle porfirine.

Un altro meccanismo di inibizione può essere secondario ad un impoverimento di cofattori necessari alle reazioni di coniugazione, come ad esempio avviene per la metionina-sulfoximina e la buteonina-sulfoximina che inibiscono la sintesi del glutatione.

Numerose sostanze chimiche possono agire direttamente sul sistema ossido-riduttivo del citocromo P450. Il monossido di carbonio, ad esempio, si comporta come ligando per l'eme ridotto e pertanto compete con l'ossigeno molecolare diventando un potente inibitore delle reazioni ossidative e delle reazioni di tipo riduttivo.

Analogo è il meccanismo che sta alla base dell'inibizione legata alla competizione di diversi substrati per i medesimi siti di legame. Questa inibizione avrà come risultato una mutua inibizione metabolica di grado diverso in rapporto con la relativa affinità delle sostanze estranee per il sito di legame (Chiesara & Radice, 1997).

Scopo della tesi

La scarsità degli studi che identificano il ruolo delle diverse isoforme, è uno dei principali problemi riguardanti lo studio degli isoenzimi del CYP450, soprattutto per quanto riguarda le specie di interesse veterinario; finora infatti la maggior parte degli studi effettuati sul citocromo P450 sono stati condotti su uomo, ratto ed animali da laboratorio in genere.

L'importanza della ricerca sui processi di biotrasformazione negli animali allevati a fini produttivi si è poi sviluppata non solo a causa dell'esposizione permanente a contaminanti industriali o agricoli ma anche a causa dell'uso frequente di sostanze farmacologicamente attive. Lo studio delle biotrasformazioni in queste specie, non è solo di rilevanza dunque per la farmacoterapia veterinaria e la tossicologia ma anche per la salute dell'uomo, come consumatore finale.

Alla luce di ciò, lo studio delle attività citocromo P450 dipendenti può essere utile come indicatore indiretto di trattamenti illeciti. E' noto infatti, ad esempio, che gli steroidi possono indurre le attività CYP3A-dipendenti; si potrebbe dunque supporre che un trattamento con sostanze steroidee potrebbe essere messo in evidenza attraverso il monitoraggio dell'escrezione di metaboliti endogeni legati all'attività di questa isoforma. D'altro canto la presenza di isoforme polimorfiche potrebbe condizionare il protocollo di trattamento di un soggetto in quanto potrebbe biotrasformare un farmaco più velocemente di un altro, necessitando così di un dosaggio maggiore, a causa delle differenze intraspecifiche oltre che interspecifiche. In medicina veterinaria, studi sul polimorfismo delle isoforme del CYP450 sono carenti, complicando così l'identificazione delle singole isoforme. Infine, la sensibilità di alcuni organismi (es. pesci) ad inquinanti ambientali si riflette anche in variazioni nell'attività enzimatica citocromo P450-dipendente che può essere dunque utilizzata come biomarcatore di esposizione ad inquinamento.

Dall'analisi della bibliografia emerge inoltre che la maggior parte degli studi riguardanti la presenza e l'attività delle isoforme di P450, condotti in specie di interesse veterinario, sono stati effettuati adottando un protocollo derivato dalle condizioni messe a punto per l'uomo e gli animali da laboratorio. E' necessario dunque verificare, prima di tutto, la validità del protocollo, non solo in relazione alla possibile differenza di

affinità che un substrato può avere nei confronti di isoforme di uno stesso enzima, che possono essere codificate con differenze anche minime legate alla specie e/a alla razza, ma anche in relazione alla possibile differenza nella produzione di metaboliti tra uomo ed animali.

L'identificazione delle isoforme di citocromo P450 specifiche responsabili del metabolismo di xenobiotici è dunque di fondamentale importanza per: comparare il destino metabolico di un farmaco nell'uomo rispetto alle specie animali; predire se il metabolismo di un nuovo agente terapeutico sia sotto il controllo del polimorfismo genetico; esaminare le potenziali interazioni tra diversi agenti terapeutici.

Un altro aspetto di fondamentale importanza è la scelta del metodo analitico da utilizzare per la valutazione dell'attività enzimatica. In passato venivano utilizzati dei metodi spettrofotometrici o fluorimetrici che però sono caratterizzati da bassa specificità e sensibilità. Più recentemente sono stati introdotti dei metodi in *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), che consentono l'identificazione, tramite separazione, degli analiti presenti in una soluzione. Ciò ha permesso di valutare l'attività enzimatica in maniera efficiente, rapida e sensibile a partire da contenuti ridotti di proteina microsomiale. Negli ultimi anni inoltre, sono stati proposti dei metodi in luminescenza denominati Glo® assays caratterizzati da ottima sensibilità e specificità e dalla possibilità di analizzare un numero considerevole di campioni in tempi brevi.

Nel capitolo 2 della tesi sono riportati i risultati relativi alla messa a punto e validazione di due metodi HPLC per la valutazione dell'attività di CYP1A e CYP2C nel fegato di bovino. Indagini in immunoelettroforesi hanno permesso di ottenere dati relativi all'espressione dell'apoproteina. I metodi messi a punto sono stati poi applicati allo scopo di valutare una modulazione dell'attività -CYP1A e CYP2C- dipendente dovuta alla razza.

Il capitolo 3 comprende i risultati di uno studio cinetico, di inibizione chimica ed immunoinibizione volto a caratterizzare l'attività CYP3A-dipendente con microsomi epatici di bovino. Il metodo messo a punto è stato poi applicato (capitolo 4) allo scopo di valutare una modulazione dell'attività CYP3A-dipendente in microsomi epatici di bovini trattati con estradiolo e desametazone ed in epatociti di bovino incubati con anabolizzanti; tale modulazione è stata verificata anche a livello di espressione dell'apoproteina CYP3A.

Il capitolo 5 della tesi si è inserito all'interno di un più ampio Progetto Regionale volto alla valutazione di un possibile impiego di organismi come bioindicatori di

esposizione a contaminanti ambientali e all'individuazione di possibili biomarcatori di esposizione, risposta e/o tossicità utili nella valutazione del rischio ecologico. Recentemente infatti, l'applicazione di regolamenti più restrittivi sull'utilizzo di farmaci, pesticidi ed inquinanti ha portato ad un incremento del numero di studi tossicologici. Questi hanno come obiettivi primari la tutela della salute pubblica e l'ottenimento di dati utili per la stima del rischio tossicologico.

E' stata dunque valutata in HPLC l'attività di CYP1A nel fegato di *Zosterisessor ophiocephalus*, un pesce bentonico della Laguna di Venezia, allo scopo di verificare se la sua modulazione può essere indicativa di inquinamento delle acque.

Nell'ultimo capitolo della tesi (capitolo 6) sono riportati i risultati relativi agli studi di cinetica enzimatica e di inibizione chimica volti alla valutazione delle attività di CYP2C e CYP3A nel fegato di cavallo mediante l'utilizzo di Glo® assays, comprendenti studi di cinetica enzimatica e di inibizione chimica. Lo scopo è stato quello di valutare le performance di questa tecnologia allo scopo di applicarla in studi di metabolismo e di interazioni tra farmaci. Questa parte della tesi è stata svolta presso il Dipartimento di Scienze Biomediche e Sanità Pubblica Veterinaria, Università di Uppsala (Svezia).

L'obiettivo della presente tesi di dottorato è stato dunque quello di aumentare le conoscenze sugli enzimi metabolizzanti i farmaci in specie di interesse veterinario e sulla modulazione della loro attività. Tale modulazione può essere dovuta a variabili quali la razza, l'esposizione a contaminanti oppure la somministrazione di sostanze illecite utilizzate per favorire l'incremento ponderale, la riduzione degli indici di conversione alimentare e quindi per un aumento complessivo del reddito (Johnson, 2007). Le informazioni ottenute con tali studi *in vitro* dunque possono essere utili per valutare gli effetti di interazioni tra farmaci e per il disegno sperimentale di progetti volti all'identificazione di *marker in vivo* di esposizione o trattamento.

CAPITOLO 2

Valutazione dell'attività di CYP1A e CYP2C nel fegato di bovino

2.0 Introduzione

CYP1A è responsabile della biotrasformazione di molti inquinanti ambientali e diversi farmaci utilizzati nell'uomo (es. caffeina) e nelle specie di interesse veterinario (es. estradiolo e benzimidazolo). La sottofamiglia CYP1A comprende due geni, CYP1A1 e CYP1A2, che mostrano un grado di omologia relativamente alto nei mammiferi.

La misurazione dell'attività di etossiresorufina-O-deetilasi (EROD) è attualmente il saggio più utilizzato per la valutazione dell'attività di CYP1A1 (Hanioka *et al.*, 2000), mentre la dealchilazione della metossiresorufina viene in genere utilizzata per monitorare l'attività CYP1A2-dipendente. Microsomi epatici di bovino sono in grado di catalizzare la dealchilazione di entrambi i substrati, e la capacità di dealchilare l'etossiresorufina è particolarmente elevata, rispetto all'attività del ratto; non è chiaro se questa elevata attività CYP1A sia geneticamente determinata o rifletta un'esposizione a sostanze introdotte con la dieta che determinano un'induzione di questa attività enzimatica (Ioannides, 2006).

In passato, per determinare l'attività di EROD, sono stati spesso utilizzati metodi spettrofluorimetrici adattati da quello di Burke e Mayer (1974) e Pohl e Fouts (1980) o che prevedevano l'utilizzo di un lettore a fluorescenza di micropiastre (Kennedy *et al.*, 1993). I limiti di queste metodiche sono sicuramente una bassa sensibilità analitica e la presenza di fluorescenza non-specifica. La tecnica HPLC per valutare l'attività di EROD è stata applicata da Leclercq *et al.* (1996) con microsomi epatici di uomo e da Hanioka *et al.* (2000) con microsomi epatici di uomo, scimmia, ratto e topo ed ha dimostrato una maggior sensibilità rispetto ai metodi solo spettrofluorimetrici.

CYP2C catalizza la biotrasformazione di diversi farmaci come fenitoina, warfarin, anti-infiammatori non steroidei, steroidi come testosterone e progesterone e tolbutamide (TB). Nell'uomo, sono note 4 principali isoforme di questa sottofamiglia: CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 e CYP2C19 che presentano identità aminoacidica >82% (Miners e Birkett, 1998). La TB è un farmaco ipoglicemizzante utilizzato per la cura del diabete mellito nell'adulto. L'idrossilazione del gruppo tolil-metilico è la prima fase del metabolismo; la seguente ossidazione di idrossitolbutamide (OHT) effettuata da alcool ed aldeide deidrogenasi produce carbossitolbutamide. Nell'uomo, è stato dimostrato che la TB è un substrato specifico per l'attività di CYP2C9, la principale isoforma CYP2C

presente nel fegato (Miners *et al.*, 1988). La TB è stata utilizzata come substrato *marker* per CYP2C8/9 anche in studi di metabolismo relativi a specie di interesse veterinario utilizzando microsomi epatici di cane, gatto e cavallo (Chauret *et al.*, 1997). La presenza dell'attività di tolbutamide metil-idrossilasi (TMH) è stata confermata in microsomi di fegato di bovino ed è stata inibita dal sulfafenazolo (SFZ), inibitore di CYP2C9 (Zweers-Zeilmaier *et al.*, 1998a). Proteine cross-reattive con anticorpi anti-CYP2C9 di uomo sono state identificate in microsomi di maiale, capra, pecora e bovino (Szotàkovà *et al.*, 2004).

La maggior parte degli studi riguardanti il citocromo P450 in specie di interesse veterinario applicano protocolli derivati dall'uomo o da specie di laboratorio e non includono procedure di validazione o la definizione di condizioni ottimali di substrato. L'utilizzo di protocolli standardizzati permetterebbe invece di ottenere dati accurati per un confronto inter-laboratorio e di acquisire sensibilità sufficiente per determinare anche bassi livelli di attività enzimatica. In relazione a ciò, lo scopo di tale lavoro è stato quello di completare la validazione di metodi precedentemente messi a punto per determinare l'attività di EROD CYP1A-dipendente e l'attività di TMH CYP2C-dipendente, allo scopo di valutare accuratamente i parametri di cinetica enzimatica K_m e V_{max} . Inoltre la sensibilità di entrambi i metodi è stata verificata con microsomi epatici di vitelli a carne bianca, per cui è noto un basso contenuto di citocromo P450 dovuto alla loro dieta basata su sostituti del latte e basso contenuto di ferro.

Infine, in letteratura sono riportati studi relativi alla valutazione dell'effetto di fattori costitutivi come la specie, l'età o il sesso (Machala *et al.*, 2003; Nebbia *et al.*, 2003; Sivapathasundaram *et al.*, 2003; Szotàkovà *et al.*, 2004; Gusson *et al.*, 2006). Dacasto *et al.* (2005) hanno inoltre valutato l'effetto della razza sul contenuto epatico di apoproteina CYP3A e attività catalitica CYP3A-dipendente con microsomi di bovini di razza Limousine e Piemontese. I metodi messi a punto e validati sono stati dunque utilizzati per valutare le differenze intra-specifiche nell'attività di CYP1A e CYP2C utilizzando microsomi epatici di bovini da carne di razza Charolais (CH), Blonde d'Aquitaine (BD) e Piemontese (PM) allo scopo di confermare che la razza rappresenta un fattore intrinseco che può modulare l'attività degli enzimi che metabolizzano i farmaci. Lo studio di tali differenze può essere di rilevanza non solo per la farmacoterapia veterinaria e la tossicologia ma anche per la salute dell'uomo se i prodotti di origine animale contengono quantità rilevanti di residui. Di conseguenza

studi di metabolismo dei farmaci, effettuati in queste specie possono essere utili per la valutazione del rischio per il consumatore.

2.1 Materiale e metodi

Reagenti e composti chimici

Resorufina (RES) (purezza >99%), 7-etossiresorufina (ETR) (purezza >99%), α -naftoflavone (α -NF), β -NADPH, TB, OHT ($\geq 98\%$), e sulfafenazolo (SFZ, minimo 99%) sono stati acquistati da Sigma Aldrich (Milano, Italia). Metanolo, acetonitrile and acido acetico glaciale (*HPLC grade*) sono stati acquistati da Mallinckrodt-Baker (Milano, Italia). Ammonio acetato e acido cloridrico sono stati acquistati da Fluka (Buchs, Svizzera). L'acqua è stata purificata con un sistema MILLI-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Tutti gli altri reagenti per la determinazione dell'attività catalitica (*analytical grade*) sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

Gli anticorpi utilizzati sono dei policlonali ottenuti in capra anti-CYP1A1/1A2 di coniglio acquistati dalla Oxford Biochemical Research (Milano, Italia) e dei policlonali ottenuti in coniglio anti-CYP2C8/9/19 di uomo e anti-CYP2C12 di ratto acquistati dalla Chemicon International (Prodotti Gianni, Milano, Italia). Anticorpi anti-IgG di capra e anti-IgG di coniglio coniugati con la perossidasi di cavallo sono stati acquistati da Sigma Aldrich (Milano, Italia). Tutti gli altri reagenti per l'Immunoblotting erano *molecular biology grade*.

Animali

Sono stati utilizzati vitelli a carne bianca di circa 32 settimane di razza Frisona (n=6, circa 220 kg) che provenivano da allevamenti autorizzati ed erano stati allevati in condizioni sperimentali controllate per assicurare l'assenza di trattamenti terapeutici o illeciti prima della macellazione. Inoltre sono stati utilizzati bovini da carne di circa 18-20 mesi di razza Charolais (n=10, circa 700 kg), Blonde d'Aquitaine (n=7, circa 600 kg) e Piemontesi (n=8, circa 650 kg) provenienti da allevamenti privati della regione Piemonte.

Preparazione di microsomi epatici

I lobi caudati dei fegati sono stati raccolti al macello immediatamente dopo la macellazione e perfusi con KCl 1,15% freddo. L'omogenato è stato preparato a partire da circa 10 g di campione utilizzando un potter con pestello in Teflon (Heavy Stirrer, ALC, Vetrotecnica, Padova, Italia) in tampone fosfato freddo 0,1 M (PBS) pH 7.4 e KCl 1,15% (1:1; v/v) e centrifugato a 9000g a 4°C per 20 min. Il surnatante è stato raccolto e centrifugato a 105000g per 60 min a 4°C per ottenere i microsomi. Il pellet microsomiale è stato sospeso in PBS 0,1 M (pH 7.4) e conservato a -80°C.

Le concentrazioni delle proteine microsomiali sono state determinate con il metodo di Lowry (Lowry *et al.*, 1951) utilizzando la siero albumina bovina come standard. L'analisi è stata effettuata con uno spettrofotometro UV-Vis (UV-7800, JASCO, Tokyo, Giappone), a 750 nm.

HPLC

La cromatografia liquida ad alta pressione o cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) è una tecnica cromatografica che permette di separare due o più composti presenti in una miscela sfruttando l'equilibrio di affinità tra una "fase stazionaria" posta all'interno della colonna cromatografica e una "fase mobile" che fluisce attraverso essa.

Una sostanza più affine alla fase stazionaria rispetto alla fase mobile impiega un tempo maggiore a percorrere la colonna cromatografica (tempo di ritenzione), rispetto ad una sostanza con bassa affinità per la fase stazionaria ed alta per la fase mobile. Il campione da analizzare è iniettato all'inizio della colonna cromatografica dove è "spinto" attraverso la fase stazionaria dalla fase mobile applicando pressioni dell'ordine delle centinaia di atmosfere.

Per ottenere un'elevata efficienza nella separazione è necessario che le dimensioni delle particelle del riempimento siano molto ridotte (di solito hanno diametri compresi da 3 a 10 µm), per questo motivo è indispensabile applicare un'elevata pressione se si vuole mantenere una ragionevole velocità di flusso dell'eluente e quindi un tempo di analisi adeguato. Alla fine della colonna è applicato un rivelatore (IR, UV-VIS, spettrofluorimetro, spettrometro di massa) e un calcolatore che permettono un'analisi in continuo dell'uscita della colonna e quindi di poter quantificare e/o identificare le sostanze iniettate. I vantaggi principali di questa tecnica sono: la dimensione ridotta della colonna che evita problemi di deviazioni longitudinali (movimenti della fase mobile longitudinali) e di percorsi alternativi; velocità di eluizione (passaggio della fase mobile attraverso la colonna) costante e regolabile; velocità di esecuzione ridotta; piccole quantità di composto necessaria all'analisi (nell'ordine dei 5-10 µg di campione solubilizzato in apposito solvente) tutto a favore di una maggiore accuratezza e precisione.

Analisi in HPLC

EROD

L'analisi è stata effettuata utilizzando un sistema HPLC JASCO (Tokyo, Giappone) costituito da pompa (PU-980), degasatore (DG1580-53), autocampionatore (AS-1555), rivelatore fluorimetrico (FP-920) ed un software cromatografico (Borwin ver. 1.5, JMBS Developments, Grenoble, France). I campioni (10 µL) sono stati iniettati in una colonna (LUNA C₁₈, 5 µm, 150 mm × 4.6 mm ID; Phenomenex, Bologna, Italia). La colonna è stata mantenuta a 23 ± 2 °C. L'eluizione isocratica è stata effettuata ad un flusso di 0,8 mL/min con tampone fosfato 25 mM (PBS; pH 7.0): metanolo (58:42, v/v). La RES è stata rivelata in fluorescenza a 530 nm (eccitazione) e 580 nm (emissione).

TMH

L'analisi è stata effettuata utilizzando un sistema HPLC JASCO (Tokyo, Giappone) costituito da pompa (PU-2089 PLUS), degasatore (PU-2089 PLUS), autocampionatore (AS-2055 PLUS), rivelatore UV-Vis (UV-2070 PLUS) e un software cromatografico (Borwin ver. 1.5, JMBS Developments, Grenoble, France). I campioni (50 µL) sono stati iniettati in una colonna (LUNA C₈, 5 µm, 250 mm × 3 mm ID; Phenomenex, Bologna, Italia) dotata anche di una pre-colonna (SecurityGuard C₈, 4mm x 2 mm ID; Phenomenex, Bologna, Italia) che sono state mantenute a 23 ± 2 °C. L'eluizione è stata effettuata ad un flusso di 0,5 mL/min con una fase mobile costituita da ammonio acetato 10 mM (pH 4.3) (A) – acetonitrile (B). La separazione è stata ottenuta applicando un gradiente al 20% di B per 14 min, aumentato al 50% di B in 2 min, mantenuto costante per 7 min, diminuito al 20% B in 2 min and poi mantenuto costante per 5 min fino alla fine della corsa (30 min). TB e OHT sono stati rivelati in UV-Vis a 230 nm.

Preparazione di soluzioni stock e soluzioni di lavoro

Le soluzioni stock sono state preparate come segue: RES (4 mM), ETR (0,8 mM) e SFZ (4 mM) in metanolo; TB (10 mM) e OHT (1 mM) in acetonitrile:acqua (50:50, v/v) e conservate in aliquote a -20 °C; α-NF (3 mM) in dimetilsolfossido (DMSO) e

conservate in aliquote a 4 °C. Le soluzioni standard di RES (0,01–2 µM) sono state preparate a partire da diluizioni seriali di soluzioni stock 4 mM con PBS 50 mM (pH 7.4) e metanolo (50:50, v/v). Le soluzioni standard di OHT (0,5–5 µM) sono state preparate a partire da diluizioni seriali della soluzione stock 1 mM con acetonitrile:acqua (50:50, v/v).

Preparazione degli standard di calibrazione

Quantità note di soluzioni di lavoro di RES (0,8–160 µM) in 50 mM PBS (pH 7.4) sono state aggiunte a microsomi epatici di bovino inattivati dal calore (55 °C per 5 min) per ottenere gli standard di calibrazione di 0,01–2 µM. Quantità note di soluzioni di lavoro di TB in PBS 0,1 mM (pH 7.4) (20–200 µM) sono state aggiunte a microsomi epatici di bovino inattivati dal calore (55 °C per 5 min) per ottenere gli standard di calibrazione di 0,5–5 µM.

Validazione del metodo

Accuratezza e precisione

L'accuratezza e la precisione sono state determinate dall'analisi degli standard di calibrazione. Accuratezza e precisione *intra-day* sono state valutate dal risultato dell'analisi di sei replicati di standard di calibrazione di RES 0,01, 0,0156, 0,0313, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1 e 2 µM e di OHT 0,5, 1, 1,5, 2 e 5 µM nell'arco della stessa giornata. Accuratezza e precisione *inter-day* sono state determinate analizzando gli standard di calibrazione riportati sopra due volte in tre giorni consecutivi. La precisione è riportata come la % di deviazione standard relativa (RDS), e l'accuratezza (%) è espressa come $([\text{quantità calcolata}/\text{quantità predetta}] \times 100)$ (Elbarbry *et al.*, 2006).

Limite di quantificazione (LOQ) e limite di rilevazione (LOD)

Il LOQ è stato determinato come la concentrazione più bassa per cui la precisione, espressa come RDS %, era <20% e l'accuratezza, espressa come differenza relativa tra il valore misurato e quello reale, era <20%. Il LOD era la media analitica del risultato di 20 campioni bianchi più 3 volte la DS.

Recuperi

Il recupero è stato determinato tramite il confronto dell'area dei picchi ottenuti dall'iniezione di soluzioni standard di RES e TB (0,01–2 μM e 0,5–5 μM , rispettivamente) e le soluzioni ottenute dall'estratto dell'incubazione microsomiale addizionata con le soluzioni di lavoro, in assenza di β -NADPH.

Incubazione con microsomi

EROD

L'incubazione conteneva ETR (0,0156–2 μM), proteina microsomiale epatica di bovino (0,2 mg/mL), magnesio cloruro 0,1 M, β -NADPH 10 mM e PBS 50 mM (pH 7.4) in un volume finale di 400 μL . Dopo una preincubazione di 1 min a 37 °C, la reazione è stata avviata con l'aggiunta di β -NADPH e dopo 3 min a 37 °C in un bagnetto termostato in agitazione (SW-21C, Julabo Labotechik, GMBH, Seelbach, Germania), è stata bloccata con l'aggiunta di 400 μL di metanolo freddo. I campioni sono stati agitati con vortex, tenuti in ghiaccio per 15 min e poi centrifugati a 3500 g per 20 min a 4 °C (Centrifuga refrigerata Eppendorf 5810R, Milano, Italia). Il surnatante è stato trasferito in vials per l'analisi in HPLC. Per l'inibizione, l' α -NF (0,04, 0,1 e 1 μM , in DMSO) è stato aggiunto nell'incubazione contenente ETR 2 μM , proteine microsomiali di bovino 0,2 mg/mL, MgCl_2 0,1 M, β -NADPH 10 mM e PBS 50 mM (pH 7.4) in un volume finale di 400 μL . Per valutare l'effetto inibitorio del DMSO, sono stati utilizzati campioni con la stessa quantità del solo solvente ed i risultati finali sono stati pertanto espressi come percentuali delle attività di controllo.

Le concentrazioni di RES sono state determinate comparando le aree dei picchi del metabolita con quelle della curva di calibrazione. La velocità di formazione del metabolita è stata espressa come nmol di RES formata per min di tempo di incubazione e per mg di proteina microsomiale.

TMH

L'incubazione conteneva TB (75–2000 μM), proteina microsomiale epatica di bovino (1,25 mg/mL), MgCl_2 0,1 M, β -NADPH 10 mM e PBS 0,1 M (pH 7.4) in un

volume finale di 400 μ L. Dopo una pre-incubazione a 37 °C per 5 min, la reazione è stata avviata con l'aggiunta di β -NADPH e dopo 30 min a 37 °C in un bagnetto termostato in agitazione (SW-21C, Julabo Labotechik, GMBH, Seelbach, Germania), è stata bloccata con l'aggiunta di 2 mL di acetonitrile freddo. I campioni sono stati agitati per 15 min utilizzando un agitatore orbitale (KS 130 BASIC, IKA, Vetrotecnica, Padova, Italia). Sono stati raccolti da ciascun campione i 2 mL della fase organica ed evaporati sotto vuoto a 40°C con un evaporatore (EZ2 PLUS, GeneVac, STEPBIO, Bologna, Italia). Il residuo è stato ripreso in 400 μ L di PBS 0,1 M (pH 2) e, dopo essere stato miscelato con vortex per 3 min, è stato trasferito in vials e iniettato in HPLC. Per l'inibizione, la mix di incubazione (1,25 mg/mL di proteine microsomiali epatiche di bovino, $MgCl_2$ 0,1 M, β -NADPH 10 mM e PBS 0,1 M pH 7.4) è stata pre-incubata per 2 min con SFZ (10, 50 e 100 μ M, in metanolo/acqua), in un volume finale di 400 μ L. La reazione è stata avviata con l'aggiunta del substrato TB 1,5 mM. Per valutare l'effetto inibitorio del metanolo, sono stati utilizzati campioni con la stessa quantità del solo solvente e i risultati sono stati espressi come percentuali delle attività di controllo.

Le concentrazioni di OHT sono state determinate comparando le aree dei picchi del metabolita con quelle della curva di calibrazione. La velocità di formazione del metabolita è stata espressa come nmol di OHT formata per min di tempo di incubazione e per mg di proteina microsomiale.

Immuno-elettroforesi

L'immuno-elettroforesi si divide in due fasi principali: l'elettroforesi e l'immunoblotting.

La prima fase permette di separare le proteine presenti nella sospensione microsomiale in esame in base al loro peso molecolare mediante la migrazione in un gel di poliacrilamide in presenza di un campo elettrico; affinché la velocità di migrazione sia determinata esclusivamente dalla massa, le proteine vengono sottoposte ad un processo di denaturazione che provoca la distensione delle catene polipeptidiche, tramite il calore e il legame con il sodio-dodecil solfato (SDS). In seguito le proteine vengono trasferite dal gel alla membrana di nitrocellulosa, sempre in presenza di un campo elettrico, come descritto da Towbin et al. (1979) e Laemmli et al. (1970).

Nella seconda fase, denominata immunoblotting, le membrane di nitrocellulosa vengono sottoposte a due incubazioni consecutive: la prima ha lo scopo di individuare l'antigene di interesse, nel nostro caso una particolare famiglia di CYP, e si realizza tramite l'utilizzo di un anticorpo primario specifico (mono- o policlonale) che si legherà esclusivamente con la banda che contiene l'antigene omologo. La seconda incubazione, invece, serve a rivelare la reazione antigene-anticorpo avvenuta in precedenza e a renderla visibile utilizzando un anti-anticorpo marcato con un enzima che, dopo

l'aggiunta del substrato cromogeno, darà luogo alla colorazione della banda di nostro interesse (Poli et al., 2005).

La chemiluminescenza, che si origina sulla superficie della membrana di nitrocellulosa dopo il contatto con il substrato cromogeno, è una reazione chimica che produce energia rilasciata sotto forma di luce per un periodo di tempo limitato (6-24 ore); tale emissione luminosa viene utilizzata per impressionare una lastra fotografica (fase di impressione), allo scopo di ottenere un risultato definitivo e stabile.

Elettroforesi in gel di acrilamide

I campioni sono stati diluiti con tampone di conservazione (glicerolo 20%, v/v in TP 0,1 M, pH 7.4) e poi con tampone di denaturazione (SDS 2%, p/v, Tris-HCl 62,5 mM pH 6.8, glicerolo 10%, v/v, β-mercaptoetanololo 0,05%, v/v, blu di bromofenolo 0,25%, p/v in acqua in rapporto 1:1), in modo tale da avere una concentrazione proteica ottimale (30 µg/pozzetto) in un volume finale di 10 µL.

Dopo la corsa elettroforetica, i gel venivano trasferiti su una membrana di nitrocellulosa tramite la tecnica del Western Blot. Il tampone di trasferimento aveva la seguente composizione: Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,01% e MeOH 20% in acqua

La fase di transfer è stata condotta in agitazione ed a voltaggio costante (100 V per 1h). Dopo il trasferimento la membrana è stata colorata con il Red Ponceau che permette un controllo qualitativo dell'elettroforesi e del trasferimento; a seguito di un lavaggio in acqua MilliQ, la membrana è stata incubata *overnight* in tampone di saturazione (latte scremato in polvere 3%, p/v e Tween 20, 0,05% in PBS 1X) in agitazione.

Immunoblotting

La membrana è stata poi incubata con l'anticorpo primario, anti-CYP1A1/1A2 di coniglio ottenuto in capra (diluito 1:100) e anti-CYP2C8/9/19 di uomo e anti-CYP2C12 di ratto ottenuti in coniglio (diluiti 1:1000). Dopo questa fase, la membrana è stata sottoposta a 3 lavaggi consecutivi di 20 min ciascuno, con 30 mL di PBS 1X, PBS 1X e 0,5% Tween 20, PBS e Tween 20 0,05%. La membrana è stata poi incubata con l'anticorpo secondario, anti-capra (diluito 1:5000) e anti-coniglio (diluito 1:4000). A seguito di ulteriori lavaggi il complesso antigene-anticorpo è stato evidenziato tramite

una reazione di chemiluminescenza rilevata tramite l'utilizzo del kit Supersignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate.

Densitometria e normalizzazione delle bande

Per poter esprimere i risultati come dati semiquantitativi, sui quali effettuare successivamente l'analisi statistica, le lastre ottenute con la tecnica dell'immuno-elettroforesi, sono state dapprima sottoposte a scansione (hp scanjet serie 5590) ed in seguito è stata condotta un'analisi densitometrica utilizzando il programma ImageJ 1.34s (NIH). I valori di densità ottenuti per ciascun campione sono stati rapportati a quelli del controllo interno (R), in modo da ottenere la normalizzazione dei risultati, che potranno quindi essere espressi in Unità Arbitrarie di proteina (U.A.).

Analisi dei dati

Le curve standard e di calibrazione sono state calcolate utilizzando un'analisi di regressione lineare con il metodo dei minimi quadrati; pendenze, intercette e coefficienti di regressione lineari (r^2) sono stati determinati per ciascuna curva (Microsoft Excel, 2000). I parametri di cinetica enzimatica K_m e V_{max} sono stati calcolati utilizzando l'equazione di regressione non lineare di Michaelis–Menten (GraphPad Prism, versione 4.02; San Diego, CA, USA). Per l'analisi statistica, sono stati applicati l'unpaired t test e il test ANOVA. In caso di variazioni significative è stato eseguito il post-test Tukey (GraphPad InStat, versione 3.0; San Diego, CA, USA). Il livello di significatività è stato posto a $p < 0,05$. I dati ottenuti sono stati inoltre oggetto di analisi per l'identificazione degli *outliers* (valori che si discostano dagli altri appartenenti allo stesso gruppo o per errori umani o per diversità biologica e quindi appartenenza ad una diversa popolazione) mediante l'utilizzo del test statistico di Grubbs, chiamato anche metodo *extreme studentized deviate*.

2.2 Risultati

Validazione del metodo

Per quanto riguarda il saggio di EROD, le precisioni *intra-* ed *inter-day* (RDS %) erano sempre <10% ed i recuperi erano $89 \pm 8,2\%$ e $89 \pm 10,3\%$ *intra-* ed *inter-day*, rispettivamente (Tab. 2.1). LOQ e LOD erano 0,1 and 0,022 pmol in colonna, rispettivamente.

Tabella 2.1. Accuratezza e precisione intra- ed inter-day per l'attività di EROD.

	Concentrazione (μM)	<i>n</i>	Accuratezza (%)	SD	RSD (%)
<i>Intraday</i>	0,01	6	83	7,6	9,1
	0,0156	6	72	4,9	6,8
	0,0313	6	86	7,2	8,4
	0,0625	6	91	4,8	5,3
	0,125	6	95	1,8	1,9
	0,25	6	94	1,9	2,0
	0,5	6	97	2,2	2,3
	1	6	97	2,9	3,0
	2	6	87	1,3	1,5
<i>Interday</i>	0,01	6	85	8,3	9,7
	0,0156	6	68	5,5	8,1
	0,0313	6	81	6,5	8,0
	0,0625	6	91	6,6	7,2
	0,125	6	94	2,2	2,4
	0,25	6	97	3,5	3,6
	0,5	6	100	3,6	3,6
	1	6	100	3,1	3,1
	2	6	86	1,9	2,2

Per quanto riguarda il saggio di TMH, i valori di precisione (RDS %) erano sempre <10,2% ed i recuperi erano $76 \pm 4,9\%$ e $73 \pm 2,9\%$, *intra-* ed *inter-day*, rispettivamente (Tab. 2.2). LOQ e LOD erano 25 e 5,5 pmol in colonna, rispettivamente.

Tabella 2.2. Accuratezza e precisione *intra-* ed *inter-day* per l'attività di TMH.

	Concentrazione (μM)	<i>n</i>	Accuratezza (%)	DS	RDS (%)
<i>Intraday</i>	0,5	6	82	4,5	5,4
	1	6	78	6,3	8,1
	1,5	6	71	6,8	9,5
	2	6	71	3,1	4,4
	5	6	78	2,4	3,0
<i>Interday</i>	0,5	6	74	7,5	10,1
	1	6	69	6,4	9,2
	1,5	6	70	5,0	7,1
	2	6	76	4,2	5,6
	5	6	74	4,4	5,9

Cinetica enzimatica

ETR è stata utilizzata nell'intervallo 0,0156-2 μM (8 livelli di concentrazione, 10 replicati). I risultati del plot Michaelis Menten sono riportati in Fig. 2.1 ($r^2 = 0,97$) ed i valori di K_m e V_{max} (media \pm ES) sono risultati pari a $0,23 \pm 0,051 \mu\text{M}$ e $0,488 \pm 0,035$ nmol/min/mg proteina, rispettivamente (Fig. 2.1).

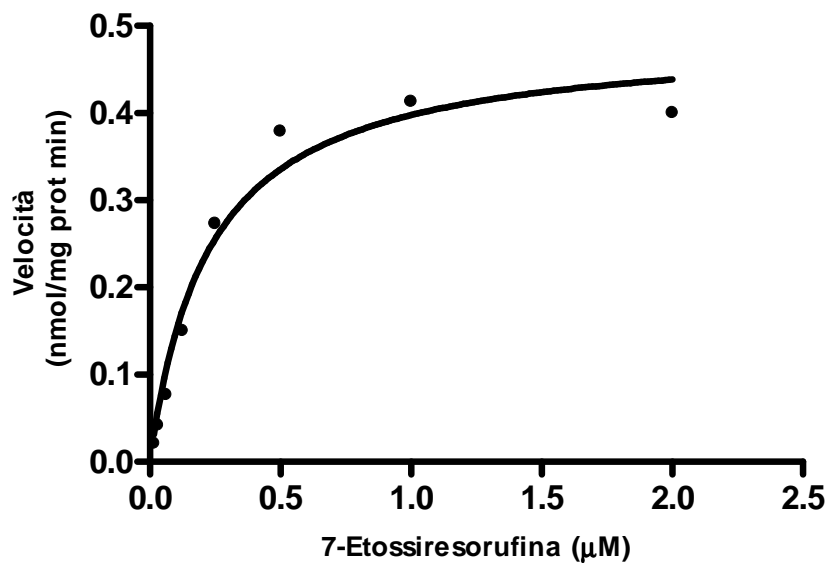


Figura 2.1. Michaelis–Menten plot (ciascun punto è la media di 10 replicati). Le reazioni sono state effettuate con ETR 0,0156–2 µM, 0,2 mg/mL di proteina microsomiale e 3 min di incubazione.

TB è stata utilizzata nel range 75-2000 µM (9 livelli di concentrazione, 10 replicati). I risultati del plot di Michaelis–Menten sono riportati in Fig. 2.2 ($r^2 = 0,986$) ed i valori di K_m e V_{max} (media±ES) sono risultati pari a $1010 \pm 155,7$ µM e $0,089 \pm 0,006$ nmol/min/mg proteina, rispettivamente (Fig. 2.2).

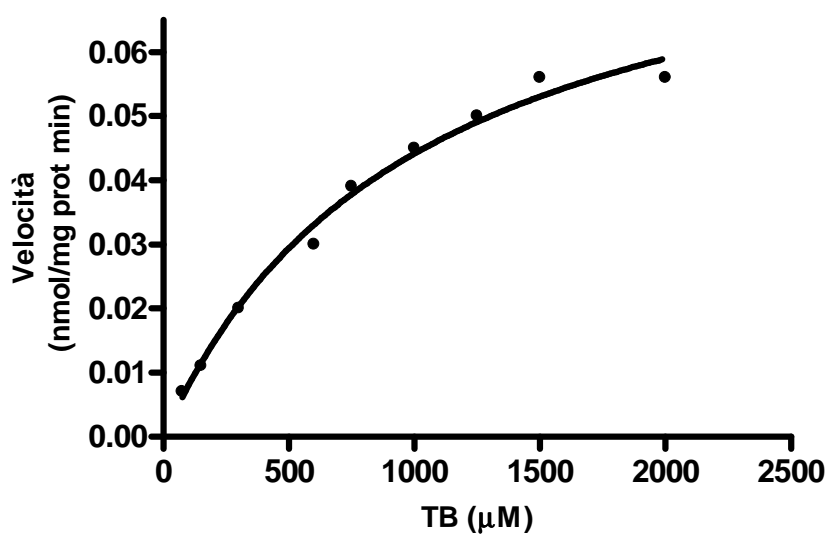


Figura 2.2. Michaelis–Menten plot (ciascun punto è la media di 10 replicati). Le reazioni sono state effettuate con TB 75–2000 µM, 1,25 mg/mL di proteina microsomiale e 10 min di incubazione.

Studi di inibizione

Le tabelle 1.3 e 1.4 mostrano i risultati ottenuti negli studi di inibizione. Utilizzando ETR 2 μM ed $\alpha\text{-NF}$ 0,04, 0,1 e 1 μM , l'inibizione era concentrazione-dipendente e con $\alpha\text{-NF}$ 1 μM , c'era solo il 6% di attività residua (Tab.1.3). Utilizzando TB 1,5 mM, con SFZ 100 μM , veniva misurata solo il 41% dell'attività di TMH e concentrazioni di SFZ ≥ 50 μM non inibivano l'attività di TMH in maniera concentrazione-dipendente (Tab.1.4).

Tabella 1.3. Inibizione dell'attività di EROD con $\alpha\text{-NF}$.

Concentrazione inibitore (μM)	n^a	EROD (nmol/min/mg prot)
$\alpha\text{-NF}$ 0	3	$0,327 \pm 0,019$ (100) ^b
$\alpha\text{-NF}$ 0,04	3	$0,211 \pm 0,012$ (65) ^b
$\alpha\text{-NF}$ 0,1	3	$0,147 \pm 0,010$ (45) ^b
$\alpha\text{-NF}$ 1	3	$0,021 \pm 0,001$ (6) ^b

2 μM ETR, 0,2 mg prot/mL (I risultati dell'attività sono espressi come media \pm DS)

^a Pool di 10 animali

^b I numeri in parentesi rappresentano la percentuale dell'attività di controllo.

Tabella 1.4. Inibizione dell'attività di TMH con SFZ.

Concentrazione inibitore (μM)	n^a	TMH (nmol/min/mg prot)
SFZ 10 μM	3	$0,022 \pm 0,0015$ (72) ^b
SFZ 50 μM	3	$0,011 \pm 0,0006$ (48) ^b
SFZ 100 μM	3	$0,007 \pm 0,0007$ (41) ^b

1,5 mM TB, 1,25 mg prot/mL. (I risultati dell'attività sono espressi come media \pm DS)

^a Pool di 10 animali

^b I numeri in parentesi rappresentano la percentuale dell'attività di controllo.

Attività di EROD e TMH nei vitelli a carne bianca

La media dei risultati per l'attività di EROD e TMH ottenuti con microsomi epatici di vitelli a carne bianca (VC) era $0,061 \pm 0,024$ e $0,025 \pm 0,010$ nmol/min/mg prot, rispettivamente (Tab. 1.5).

Tabella 1.5. Attività di EROD e TMH in VC.

Campione	Hb (g/dL)	Citocromo P450 (nmol/min/mg prot)	EROD (nmol/min/mg prot)	TMH (nmol/min/mg prot)
K2	5	0,179	0,069	0,034
K11	4,6	0,084	0,030	0,011
K23	4,5	0,114	0,084	0,029
K24	4,7	0,280	0,032	0,034
K30	5,9	0,278	0,078	0,014
K32	4,7	0,172	0,075	0,003
Media± DS	4,9 ± 0,52	0,185 ± 0,081	0,061±0,024	0,025±0,010

ETR 0,5 µM, 0,2 mg prot/mL.

TB 1,5 mM, 1,25 mg prot/mL.

Immunoblotting

I risultati ottenuti dall'analisi densitometrica dell'Immunoblotting per quanto riguarda l'espressione proteica di CYP1A e CYP2C hanno evidenziato una differenza nei microsomi dei bovini di razza Charolais (CH) vs vitelli a carne bianca (VC), anche se non statisticamente significativa (Figg. 2.3-2.4).

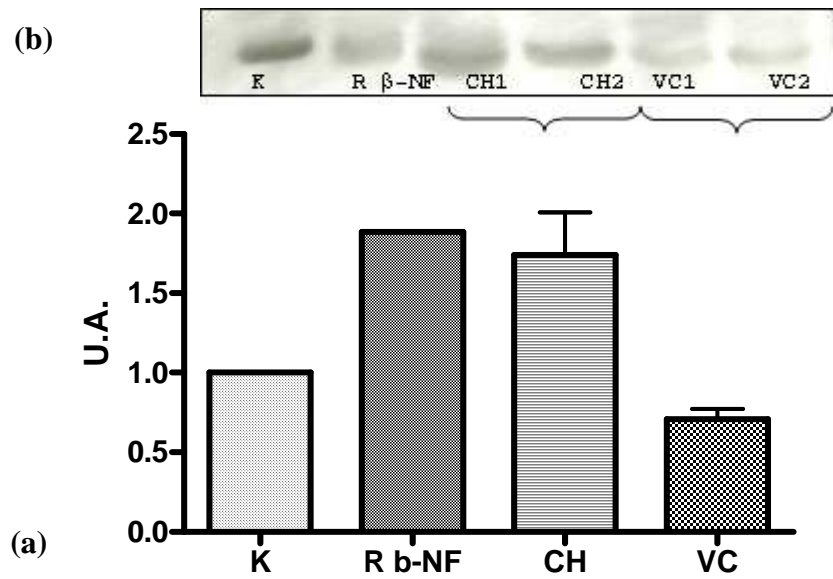


Figura 2.3. (a) Analisi densitometrica dell'immunolettroforesi di CYP1A; i risultati sono espressi come fold-change (media \pm ES; K: bovino di controllo; R β -NF: ratto indotto con β -naftoflavone; CH: bovini di razza Charolais; VC: vitelli a carne bianca); (b) Immunoblotting rappresentativo di CYP1A.

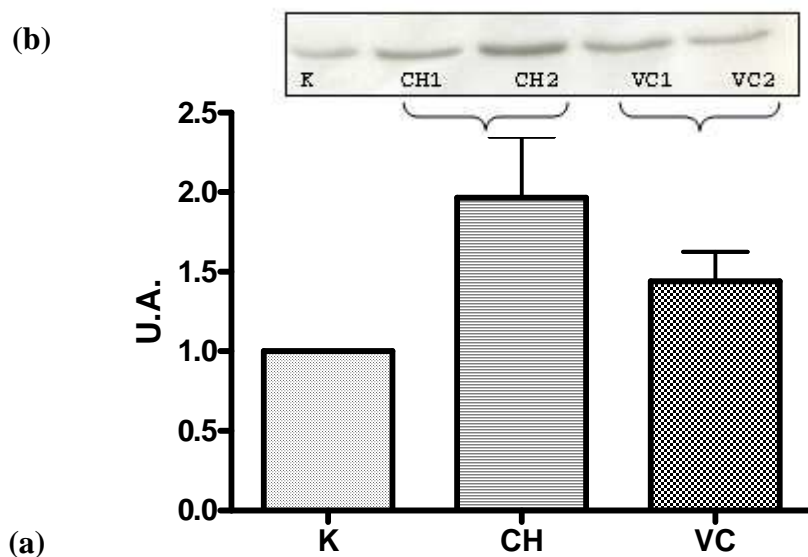


Figura 2.4. (a) Analisi densitometrica dell'immunolettroforesi di CYP2C, espressi come fold-change (media \pm ES; K: ratto di controllo; CH: bovini di razza Charolais; VC: vitelli a carne bianca); (b) Immunoblotting rappresentativo di CYP2C.

Attività di EROD in bovini di razza Charolais (CH), Blonde d'Aquitaine (BD) e Piemontese (PM)

L'elaborazione statistica dei risultati ha evidenziato che l'attività di EROD con microsomi epatici di bovini di razza CH è significativamente maggiore rispetto a quella determinata con microsomi epatici di bovini di razza PM ($p < 0,05$; Fig. 2.5).

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata per quanto riguarda l'attività di TMH (Fig. 2.6).

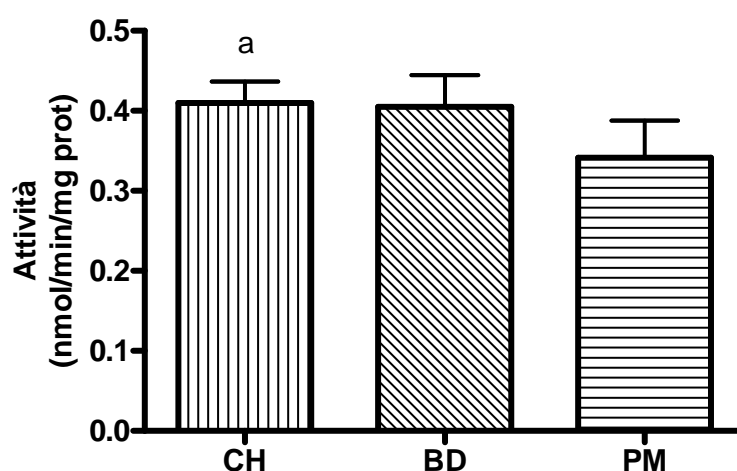


Figura 2.5. Attività di EROD in bovini di razza Charolais (CH), Blonde D'Aquitaine (BD) e Piemontese (PM); ^a: $p < 0,05$). I risultati sono espressi come media \pm ES.

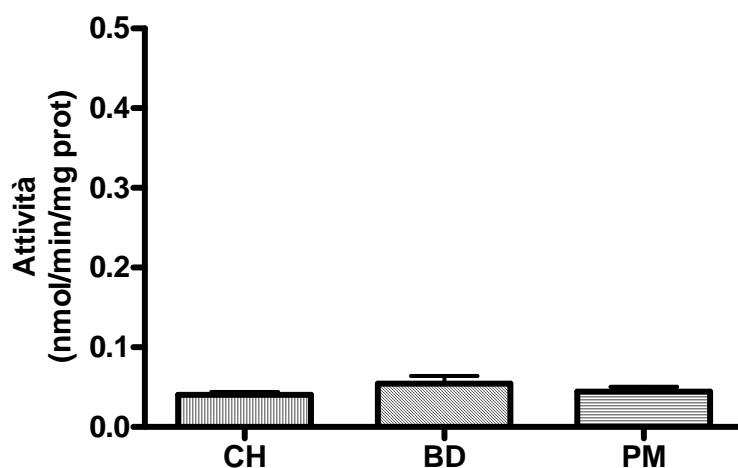


Figura 2.6. Attività di TMH in bovini di razza Charolais (CH), Blonde D'Aquitaine (BD) e Piemontese (PM). I risultati sono espressi come media \pm ES.

2.3 Discussione

L'approccio utilizzato più frequentemente per studiare le attività degli enzimi P450-dipendenti in specie di interesse veterinario è di utilizzare il ratto e l'uomo come specie modello, semplicemente perchè sono state ampiamente studiate. Comunque, l'estrapolazione di dati ottenuti da queste specie a quelle di interesse veterinario rimane difficile a causa delle ben note e documentate differenze di specie nell'attività, nell'espressione e nella regolazione del citocromo P450 (Guengerich, 1997; Nebbia, 2001; Ioannides, 2006).

Questo studio invece comprende la validazione di due metodi analitici messi a punto per la prima volta in microsomi epatici di bovino, allo scopo di valutare l'attività di CYP1A1 e CYP2C9 (Hanioka *et al.*, 2000; Palamanda *et al.*, 2000). Riguardo a ciò, per ciascun substrato di P450 (ETR e TB, rispettivamente), sono state valutate le principali costanti di cinetica enzimatica (K_m e V_{max}).

Il metodo adottato per la determinazione dell'attività di EROD ha mostrato specificità, sensibilità, accuratezza e precisione. Il LOD ottenuto era più basso di quello riportato da altri saggi che prevedevano l'utilizzo della tecnica HPLC, 0,057 e 0,04 pmol in colonna (Leclercq *et al.*, 1996; Hanioka *et al.*, 2000, rispettivamente). Nell'analisi di cinetica enzimatica, sono stati utilizzate 8 concentrazioni di ETR nell'intervallo di 0,0156-2 μM in accordo con i valori utilizzati in letteratura (Hanioka *et al.*, 2000; Sivapathasundaram *et al.*, 2001; Walsky e Obach, 2004). I parametri di cinetica enzimatica sono stati determinati accuratamente in quanto il range di concentrazioni utilizzate andava da 1/3 a 3 del valore di K_m (Bjornsson *et al.*, 2003).

E' stata valutata la specificità di α -NF, un noto inibitore di CYP1A ed i risultati ottenuti con α -NF 1 μM hanno dimostrato un forte effetto inibitorio come riportato in letteratura. Nell'intervallo utilizzato, l'inibizione era concentrazione-dipendente, diversamente da quanto osservato da Sivapathasundaram *et al.* (2001), che hanno utilizzato concentrazioni di inibitore più alte di 1 μM . Inoltre, è ben noto che la maggior parte degli inibitori chimici, a concentrazioni >1 μM perdono la propria selettività (Bourriè *et al.*, 1996).

Quindi, i risultati ottenuti indicano che l'attività di EROD può essere considerata un *marker* dell'attività di CYP1A nel bovino. È necessario inoltre sottolineare che la sottofamiglia CYP1A è inducibile da molti sostanze presenti nelle piante (Ioannides,

1998). Inoltre, è una delle famiglie di citocromo P450 più attive nella bioattivazione di sostanze chimiche come gli idrocarburi aromatici policiclici, una classe di inquinanti ambientali ubiquitari che subiscono processi di bioattivazione (Ioannides e Parke, 1990). Quindi, è stata data molta importanza alla valutazione dell'attività di CYP1A in specie di interesse veterinario, a causa della loro possibile e prolungata esposizione a sostanze inducenti CYP1A presenti nella dieta e contaminanti ambientali. Un elevato pattern di espressione di CYP1A nel fegato di bovino potrebbe dunque predisporre questi animali all'effetto tossico e cancerogeno di tali xenobiotici.

Nello studio di cinetica enzimatica per l'attività di TMH, TB è stata utilizzata nel range di 75-2000 μM in accordo agli studi effettuati nell'uomo (Miners *et al.*, 1988; Hickman *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 2000; Yuan *et al.*, 2002; Walsky e Obach, 2004). I parametri di cinetica enzimatica ($K_m = 1010 \pm 155.7 \mu\text{M}$ e $V_{\max} = 0,089 \pm 0,006 \text{ nmol/min/mg prot}$), sono confrontabili con quelli riportati in studi condotti sull'uomo ($K_m = 133-348 \mu\text{M}$ e $V_{\max} = 0,387-0,434 \text{ nmol/min/mg prot}$). E' evidente che l'efficienza di biotrasformazione nel bovino è più bassa, 3-7 volte per la K_m e 4-5 per la V_{\max} .

Recentemente è stato dimostrato che nel fegato di bovino sono espressi geni CYP2C8-, CYP2C9-, CYP2C18-, CYP2C19-like e proteine CYP2C che cross-reagiscono con anticorpi policlonali di uomo/roditore (Giantin *et al.*, 2008). Nell'uomo sono stati utilizzati diversi substrati per misurare l'attività catalitica di ciascuna isoforma CYP2C: paclitaxel, TB and *S*-mefenitoina per CYP2C8, CYP2C9 e CYP2C19, rispettivamente (Rahman *et al.*, 1994; Walsky e Obach, 2004). Nel bovino invece, l'attività di CYP2C è stata valutata utilizzando la 7-metossi-4-trifluorometilcumarina (Szotàkovà *et al.*, 2004), a volte l'aminopirina (Cantiello *et al.*, 2008; in press), o la TB stessa (Zweers-Zeilmaker *et al.*, 1998a). Come affermato sopra, nell'uomo, TB è ampiamente utilizzata come substrato *marker* per CYP2C9, che è l'isoforma CYP2C più espressa a livello epatico (Miners *et al.*, 1988), dove rappresenta circa il 17-20% del totale delle proteine P450 (Parkinson, 1996). Per verificare ulteriormente e confermare i risultati ottenuti, è stato effettuato uno studio di inibizione utilizzando il SFZ, un inibitore selettivo per CYP2C9 nell'uomo (Miners e Birkett, 1998). I risultati ottenuti hanno confermato quelli riportati precedentemente da Zweers-Zeilmaker *et al.* (1998a) in microsomi epatici di bovino. I farmaci antidiabetici ad uso orale a base di sulfonilurea, come la TB, sono strutturalmente correlate agli antibatterici sulfamidici, che sono frequentemente utilizzati in medicina veterinaria e questa similarità strutturale

potrebbe ben spiegare l'interazione metabolica osservata tra TB e SFZ (Zweers-Zeilmaker *et al.*, 1997). Quindi l'attività di TMH potrebbe essere utilizzata come *marker* per l'attività di CYP2C9-like nel bovino, anche se non si può escludere il coinvolgimento di altre isoforme CYP2C.

L'applicabilità di entrambi i metodi è stata valutata comparativamente in microsomi epatici di vitelli a carne bianca (VC), che sono stati alimentati con una dieta a base di sostituti del latte e basso contenuto di ferro e di bovini da carne, animali sessualmente maturi e con capacità metabolizzanti completamente formate.

I VC sono caratterizzati generalmente da basse attività citocromo P450-dipendenti. Il principale responsabile di questo pattern di biotrasformazione è il basso contenuto totale di citocromo P450, conseguenza della dieta a basso contenuto di ferro utilizzata in questo tipo di allevamento. Questa dieta è costituita solo da sostituti del latte e da un'integrazione di paglia e altri nutrienti in accordo con i Regolamenti UE volti a garantire il benessere animale (REF). Nel presente studio, il contenuto totale di P450 era $0,185 \pm 0,081$ nmol/mg prot, più basso di quello misurato di bovini di razza CH ($0,628 \pm 0,09$ nmol/mg prot; risultati non pubblicati); inoltre, il contenuto di emoglobina dei VC era $4,9 \pm 0,52$ g/dL, più basso di quello riportato per il bovino da carne (8-15 g/dL; Kaneko *et al.*, 1997). Riguardo all'attività di EROD e TMH, i microsomi dei VC hanno evidenziato attività significativamente più basse ($0,061 \pm 0,024$ e $0,025 \pm 0,010$ nmol/min/mg prot, rispettivamente) se comparate a quelle dei bovini di razza CH ($0,400 \pm 0,03$ nmol/min/mg prot, $p < 0,0001$ e $0,054 \pm 0,002$ nmol/min/mg prot, $p < 0,001$). Questo comportamento è stato confermato anche dall'analisi densitometrica dell'Immunoblotting. Di conseguenza, la sensibilità di entrambi i metodi ha permesso la determinazione di bassi livelli di attività enzimatiche come nel caso dei VC. Quindi, le attività EROD e TMH potrebbero essere utilizzate come *marker* per la valutazione dell'attività di CYP1A e CYP2C9 nei microsomi di fegato del VC e del bovino da carne.

Per verificare l'esistenza di differenze intra-specifiche nell'attività enzimatica, i metodi messi a punto sono stati utilizzati per valutare le attività di EROD e TMH utilizzando microsomi epatici di bovini di razza CH, BD, e PM. I risultati ottenuti per l'attività di EROD hanno evidenziato una maggior attività nei bovini di razza CH vs PM ($p < 0,05$). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata evidenziata

nell'espressione dell'apoproteina CYP1A. In contrasto, per quanto riguarda l'espressione genica di CYP1A1/2-like, CH hanno mostrato quantità inferiori, in termini di abbondanza relativa di mRNA CYP1A1- e CYP1A2-like, se comparati con PM ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, rispettivamente) e con BA (solo per CYP1A1; $p < 0,001$; Giantin *et al.*, 2008). Inoltre, è stata evidenziata una correlazione positiva tra l'attività di EROD e l'espressione di CYP1A2 ($r_s = 0,79$) mentre non è stata evidenziata una correlazione statisticamente significativa tra l'attività di EROD e l'espressione di CYP1A1.

Sorprendentemente, la razza CH ha evidenziato un basso livello di espressione genica di CYP1A ma al contrario una più elevata attività catalitica CYP1A-dipendente. Una possibile spiegazione per questo comportamento potrebbe essere la maggior efficienza del ciclo catalitico in questa razza, ipotesi confermata dall'elevata attività catalitica di NADPH citocromo c reduttasi riscontrata in questo stesso gruppo (Giantin *et al.*, 2008). Recentemente è stato osservato un comportamento simile per CYP3A nel cavallo (Tydèn *et al.*, 2007). E' noto infatti che l'NADPH reduttasi è un componente necessario nel ciclo delle monossigenasi e che elevati livelli di reduttasi promuovono il ciclo catalitico degli enzimi P450 fornendo elettroni al CYP stesso. Un'altra ipotesi potrebbe essere la presenza di fenomeni post-traduzionali (ad es. fosforilazione) o post-trascrizionali (es. micro-RNA). Per quanto riguarda i primi, Oesch-Bartlomowicz e Oesch (2005) hanno dimostrato che CYP2B e CYP2E possono essere fosforilati dalla protein chinasi A (PKA); questa reazione dipende dai residui fosforilabili di serina presenti nella sequenza del CYP. Di conseguenza, la presenza di polimorfismi genetici nella sequenza del CYP può indirettamente influenzare l'attività della PKA determinando una variazione in termini quantitativi della risposta o una diversa specificità di substrato. Per quanto riguarda invece i fenomeni post-trascrizionali, Tsuchiya *et al.* (2006) hanno evidenziato come i micro-RNA possano modulare l'azione di CYP1B1: elevati livelli di CYP1B1 in tessuti tumorali possono essere dovuti ad un'inibizione dell'espressione di un micro-RNA, denominato miR-27b. Infine, non si può escludere l'ipotetica presenza di *single nucleotide polymorphism* (SNPs) nella sequenza di tali enzimi; recentemente, un'attività metabolica superiore in bovini CH rispetto ai German Holstein è stata attribuita a SNPs in alcuni geni funzionali di fegato e intestino (Schwerin *et al.*, 2006).

Nessuna differenza è stata invece evidenziata nell'attività di TMH. Questi risultati sono in accordo con i dati di espressione dell'apoproteina CYP2C e di

espressione genica di *CYP2C19-like* per cui è stata evidenziata una correlazione positiva con l'attività di TMH ($r_s = 0,82$; Giantin *et al.*, 2008)

I risultati ottenuti hanno comunque confermato l'esistenza di differenze intra-specifiche dovute alla razza nel metabolismo dei farmaci. Tali differenze potrebbero influenzare la biodisponibilità e l'efficacia clinica di xenobiotici (Sallovitz *et al.*, 2002), e potrebbero essere di particolare interesse nelle specie di interesse veterinario per l'ipotetica presenza di residui potenzialmente tossici negli alimenti di origine animale. Inoltre, la presenza di risultati non univoci per quanto riguarda espressione genica, proteica ed attività catalitica suggeriscono che al momento non è possibile stabilire se tale effetto intervenga a livello pre- o post-trascrizionale o post-traduzionale.

2.4 Conclusioni

Questo studio ha permesso la standardizzazione dei protocolli con concentrazioni di substrato ottimizzate, che sono più basse di quelle riportate in precedenza in letteratura per le specie di interesse veterinario. Di conseguenza, questi protocolli possono essere utilizzati per determinare l'attività di EROD e di TMH in microsomi epatici di bovino, con la possibilità di effettuare un confronto dei dati sia *inter-* che *intra-* laboratorio. I metodi messi a punto e validati sono risultati semplici, efficienti e sensibili, permettendo dunque la valutazione di campioni con bassa attività enzimatica. Possono dunque essere applicate per misurare l'attività di EROD e di TMH nel fegato di specie con bassa attività come ad esempio i pesci o i vitelli a carne bianca o in tessuti diversi dal fegato, caratterizzati da un'attività metabolica inferiore, come ad esempio intestino, polmone o rene.

PUBBLICAZIONI

Articoli su rivista:

1. GIANTIN M., CARLETTI M., CAPOLONGO F., **PEGOLO S.**, LOPPARELLI R.M., GUSSON, F., NEBBIA C., CANTIELLO M., MARTIN P., PINEAU T., DACASTO M.(2008).

Effect of breed upon cytochrome P450s and phase II enzymes expression in cattle liver.
Drug Metabolism and Disposition **36**, 885-893.

2. **PEGOLO S.**, MERLANTI R., GIANTIN M., DACASTO M., MONTESISSA C., CAPOLONGO F. (2008)

High performance liquid chromatography determination of cytochrome P450 1A and 2C activities in bovine liver microsomes.

The Veterinary Journal, Sep **22**; doi:10.1016/j.tvjl.2008.08.006

Comunicazioni a congresso:

1. **PEGOLO S.**, DE BONA C., MERLANTI R., GIANTIN M., MONTESISSA C., DACASTO M., CAPOLONGO F. (2007)

HPLC method for the determination of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in bovine liver microsomes.

Book of abstracts of the 15th International Conference on Cytochromes P450, Biochemistry, Biophysics and Functional Genomics (Bled, Slovenia-June 17-21, 2007); pag.121.

2. GRANATA A., **PEGOLO S.**, DE BONA C., MERLANTI R., MONTESISSA C., DACASTO M., CAPOLONGO F. (2007)

Validation of a HPLC method for the determination of cytochrome P450 2C (CYP2C) activity in bovine liver microsomes.

Book of abstracts of the 15th International Conference on Cytochromes P450, Biochemistry, Biophysics and Functional Genomics (Bled, Slovenia-June 17-21, 2007); pag.153.

CAPITOLO 3

Valutazione dell'attività di idrossilazione del testosterone nel fegato di bovino: studio di cinetica enzimatica e di inibizione.

3.0 Introduzione

La superfamiglia del citocromo P450 catalizza il metabolismo di numerosi composti, dalla biotrasformazione di composti endogeni naturali come steroidi e colesterolo alla detossificazione di composti esogeni, come farmaci e inquinanti ambientali (Guengerich, 1996). Questi enzimi sono caratterizzati da un'ampia ma univoca specificità per il substrato, con molte isoforme in grado di metabolizzare gli stessi composti, spesso con diversa efficienza e in siti diversi (Gonzalez, 1992).

CYP2B comprende nell'uomo una sola isoforma CYP2B6, espressa a livelli inferiori all'1% nel fegato, mentre nel ratto sono state individuate due isoforme, CYP2B1 e CYP2B2. Questa sottofamiglia estremamente inducibile (essenzialmente dal fenobarbitale) è coinvolta nella bioattivazione di composti cancerogeni (come le nitrosamine), ma anche nel metabolismo di sostanze endogene come steroidi e acidi grassi. I substrati *marker* utilizzati più spesso per valutare l'attività di CYP2B nelle specie di interesse veterinario sono la pentossiresorufina (O-deetilazione; PROD) e il testosterone (idrossilazione in posizione 16; TST).

Nel bovino, sono stati riportati bassi valori di PROD e inoltre, questa isoforma è considerata scarsamente coinvolta nell'idrossilazione del TST (Sivapathasundaram *et al.*, 2001; Ioannides, 2006), ma recentemente, è stato dimostrato che microsomi epatici di vitelli a carne bianca sono in grado di produrre oltre ai metaboliti del TST idrossilati in posizione 6 β - e 2 β (6 β - e 2 β -OH TST), anche quantità rilevabili di 16 β -OH TST (Capolongo *et al.* 2003); inoltre, è stata ottenuta una buona correlazione tra l'attività di 16 β -testosterone idrossilasi (16 β -OHT) e l'espressione genica di CYP2B nel fegato di bovino da carne (Giantin *et al.* 2008), confermando i dati riportati nel topo da Peffer *et al.* (2007).

In microsomi epatici di bovino, anticorpi anti-CYP2B di ratto hanno evidenziato la presenza di due proteine (Nebbia *et al.*, 2003), ma altri autori hanno riportato la presenza di un'unica banda cross-reattiva di peso molecolare simile a quella del ratto (Sivapathasundaram *et al.*, 2001).

La sottofamiglia CYP3A è caratterizzata da una specificità di substrato molto ampia; il sito di legame con il substrato è sufficientemente ampio da accomodare composti di elevato peso molecolare come i macrolidi ma anche sufficientemente versatile da contribuire al metabolismo di molecole di piccole dimensioni come il

paracetamolo. Tra le diverse isoforme che la compongono, nell'uomo CYP3A4 è la più importante per il metabolismo degli xenobiotici, poiché costituisce il 30% del CYP totale e partecipa al metabolismo di più del 50% dei farmaci utilizzati nell'uomo (You, 2004). Le altre isoforme presenti nell'uomo sono il CYP3A5, presente prevalentemente nel fegato ma riscontrabile anche in polmone, colon ed esofago (Donato, 2004), ed il CYP3A7, originariamente individuato nel fegato del feto, ma espresso anche in placenta, endometrio, ghiandole surrenali e prostata nell'individuo adulto (Zhu e Lee, 2005). Nel fegato dell'uomo, è stato dimostrato come l'attività di idrossilazione del TST in posizione 6 β possa essere un *marker* per la valutazione dell'attività di CYP3A. Nelle specie di interesse veterinario i substrati utilizzati sono invece molteplici: l'eritromicina, l'etil morfina e la triacetiloleandomicina che nel bovino vengono demetilate e la stessa attività di idrossilazione del TST in posizione 6 β (Ioannides, 2006). Recentemente, è stata evidenziata una correlazione tra l'attività di 6 β - e 2 β -OHT e l'espressione genica di CYP3A4-*like* che ha suggerito come il TST possa essere un substrato specifico e utile per studiare l'espressione di CYP3A nel bovino (Giantin *et al.*, 2008).

In diversi studi, l'Immunoblotting ha consentito di identificare la presenza di proteine correlabili al CYP3A nel fegato di bovino, utilizzando anticorpi anti-CYP3A1 e CYP3A2 di ratto (Sivapathasundaram *et al.*, 2001; Nebbia *et al.*, 2003) e anti-CYP3A4 di uomo (Sivapathasundaram *et al.*, 2001; Szotàkovà *et al.*, 2004).

Anche se alcune reazioni sono catalizzate quasi esclusivamente da un unico isoenzima, altre possono essere catalizzate da diversi isoenzimi. Ciò rende la determinazione della specificità di un isoenzima estremamente difficile. Non è sufficiente dimostrare che un isoenzima purificato catalizzi una data reazione ma è necessario determinare il contributo di un isoenzima alla reazione di interesse in presenza di tutto il complemento di enzimi. Senza alcun dubbio, uno dei modi più efficienti per definire ciò è effettuare degli studi di immunoinibizione utilizzando anticorpi contro specifici isoenzimi. Inoltre, tali anticorpi oltre al loro utilizzo per determinare le specificità di substrato delle diverse isoforme di citocromo P450, possono essere impiegati anche per l'identificazione, la localizzazione e la quantificazione di queste proteine. Nelle specie di interesse veterinario, c'è solo un esempio in cui questo approccio è stato usato (Nakamura *et al.*, 1995) mentre il più comune è quello di utilizzare anticorpi rivolti contro isoforme di uomo o ratto (Bogaards *et al.*, 2000; Skaanild e Friis, 2002) che mancano di specificità e rendono

difficile e ambigua l'interpretazione dei risultati. Problemi di cross-reattività sono stati comunque evidenziati anche utilizzando proteine ricombinanti purificate come immunogeni. Questo avviene perché alcuni di questi anticorpi possono riconoscere regioni di elevata omologia nei relativi citocromi P450. Utilizzando come immunogeno un peptide che si lega ad una specifica regione della proteina, si possono generare invece anticorpi con minor potenziale di cross-reattività.

In medicina veterinaria, la caratterizzazione del sistema P450 è tuttora incompleta; inoltre, i substrati utilizzati sono stati selezionati sulla base delle conoscenze derivate dall'uomo o dalle specie di laboratorio senza la presenza di studi di cinetica enzimatica o di inibizione. Definire il contributo di un'isoforma di P450 nel metabolismo di un farmaco specifico è importante sia per la farmacologia e la tossicologia veterinarie sia per la salute dell'uomo, come consumatore di derrate di origine animale.

Quindi, lo scopo di questo studio è stato quello di definire la cinetica delle reazioni di idrossilazione del TST *in vitro*, con microsomi epatici di bovino; inoltre sono stati utilizzati inibitori chimici e un anticorpo anti-peptide nei confronti di CYP3A4 di bovino per definire il coinvolgimento di CYP3A e potenzialmente di CYP2B in queste reazioni enzimatiche.

3.1 Materiale e metodi

Reagenti e composti chimici

2 β OH-TST, 16 β OH-TST, 6 β OH-TST e TST sono stati acquistati dalla Steraloids (Newport, RI). β -NADPH, chetoconazolo (KTZ), 9-etinilfenantrene (9-EPh) e orfenadrina (ORPH) sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich (Milano, Italia). Metanolo, acetonitrile (*HPLC grade*) e diclorometano (DCM) sono stati ottenuti dalla Mallinckrodt-Baker (Milano, Italia).

L'acqua è stata purificata da un sistema MILLI-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Tutti gli altri reagenti erano *analytical grade* e sono stati acquistati dalla Sigma (Milano, Italia).

Il peptide (C-VKRIKESRLKDNQKPRVDFLQ- amide) e l'anticorpo policlonale anti-peptide (A3796) contro l'isoforma CYP3A4 di bovino (NP_001092837) sono stati prodotti dalla Biogenes (Berlino, Germania). Gli anticorpi di capra anti-IgG di coniglio (AP132P) erano della Chemicon International (Temecula, CA, USA). Tutti gli altri reagenti per l'Immunoblotting erano dell'Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) e *molecular biology grade*.

Animali e preparazione dei microsomi epatici

I microsomi sono stati ottenuti dal fegato di 6 bovini incroci tra razze francesi da carne di circa 15-18 mesi come descritto precedentemente (Capitolo 2).

Gli animali provenivano da allevamenti autorizzati ed erano stati allevati in condizioni sperimentali controllate, per assicurare l'assenza di trattamenti terapeutici o illeciti prima della macellazione.

E' stato ottenuto un pool dei microsomi epatici e la concentrazione proteica è stata determinata con il metodo di Lowry *et al.* (1951), utilizzando la siero albumina bovina come standard.

Metodo analitico

E' stato sviluppato un saggio in HPLC per la determinazione dell'attività di idrossilazione del TST, tramite quantificazione dei metaboliti 6 β -, 16 β - e 2 β -OH TST. L'analisi è stata effettuata utilizzando un sistema HPLC JASCO (Tokyo, Giappone) costituito da pompa (PU-2089 PLUS), degasatore (PU-2089 PLUS), autocampionatore (AS-2055 PLUS), rivelatore UV-Vis (UV-2070 PLUS) e software cromatografico (JASCO-Chrompass ver. 1.8, JASCO, Tokyo, Giappone). I campioni (10 μ L) sono stati iniettati in una colonna XTerra C₁₈ (5 μ m, 150 mm \times 3 mm ID; Waters, Milano, Italia) dotata di pre-colonna Xterra MS Guard Column (3.0 \times 20 mm, 5 μ M; Waters, Milano, Italia). La colonna è stata mantenuta a 23 \pm 2 °C. L'eluizione è stata effettuata ad un flusso di 0,5 mL/min con una fase mobile costituita da acqua (A) – acetonitrile (B)-metanolo (C). La separazione è stata ottenuta applicando un gradiente al 10% B e 10% C per 10 min, aumentato al 20% di B in 30 min, mantenuto costante per 5 min, aumentato al 40% di B in 10 min, mantenuto costante per 5 min, aumentato al 70% di B e 20% C in 1 min, mantenuto costante per 1 min, diminuito al 10% di B e 10% C in 1 min fino alla fine della corsa (60 min). TST, 6 β OH-TST, 16 β OH-TST e 2 β OH-TST sono stati rivelati in UV-Vis a 247 nm.

Determinazione delle costanti di cinetica enzimatica

La determinazione dei valori apparenti di K_m e V_{max} è stata ottenuta variando le concentrazioni di substrato (10 replicati per 6 livelli di concentrazione). L'incubazione conteneva TST (10–500 μ M), proteine microsomiali epatiche di bovino (0,2 mg/mL), magnesio cloruro 0,1 M, β -NADPH 10 mM e PBS 0,1 M (pH 7.4) in un volume finale di 400 μ L. I campioni sono stati incubati a 37 °C per 10 min in un bagnetto termostato in agitazione (SW-21C, Julabo Labotechik, GMBH, Seelbach, Germania) e poi la reazione è stata bloccata con l'aggiunta di 3 mL di DCM freddo. I campioni sono stati agitati per 20 min utilizzando un agitatore orbitale (KS 130 BASIC, IKA, Vetrotecnica, Padova, Italia). Sono stati raccolti da ciascun campione i 3 mL della fase organica ed evaporati sotto vuoto a 35°C utilizzando un sistema di evaporazione (EZ2 PLUS, GeneVac, STEPPIO, Bologna, Italia). L'estratto è stato ripreso in metanolo:acqua

(20:80, v/v) e dopo aver agitato con vortex accuratamente, è stato trasferito in vials e iniettato in HPLC.

Le velocità di formazione dei metaboliti sono state espresse come nmol/min/mg proteina.

Studi di inibizione chimica

Per gli studi di inibizione chimica, 0.01-20 μM KTZ (in metanolo, 6 livelli di concentrazione) o 0.5-100 μM 9-EPh (in dimetilsolfossido, 7 livelli di concentrazione) sono stati aggiunti al TST (250 μM) nell'incubazione. Le incubazioni sono state condotte come riportato precedentemente per la determinazione delle costanti di cinetica enzimatica.

Per quanto riguarda l'inibizione con 50-1500 μM ORPH (in acqua, 7 livelli di concentrazione), sono stati applicati due protocolli: protocollo di inibizione competitiva; protocollo con pre-incubazione allo scopo di valutare l'eventuale presenza di un'inibizione metabolismo-dipendente ovvero se l'ORPH possa essere metabolizzata dal P450 in specie reattive in grado di inibire l'attività degli enzimi microsomiali. Per quanto riguarda gli studi di inibizione competitiva, ORPH è stata aggiunta assieme al TST (250 μM) nell'incubazione e la reazione è stata avviata con l'aggiunta di β -NADPH. Nel protocollo con pre-incubazione, ORPH è stata pre-incubata con β -NADPH per 10 min a 37°C e la reazione è stata avviata con l'aggiunta del substrato.

Gli esperimenti di inibizione sono stati effettuati in triplicato ed i controlli costruiti con solvente/acqua. La quantità di solvente organico era < 2,5% (v/v).

Western Blot

I microsomi epatici di bovino (30 μg) sono stati separati in gel NuPage® 4-12% Bis-Tris (1.0 mm \times 12 pozzetti) utilizzando il MOPS buffer in una SureLock™ Mini – Cell, in accordo con le istruzioni del produttore. Come marcatore di peso molecolare è stato utilizzato il ChemiBlot™ (2230-S; Chemicon International, Temecula, CA, USA). Le proteine sono state poi trasferite tramite il sistema iBlot™ Dry Blotting utilizzando iBlot™ Transfer Stack Mini con membrane di nitrocellulose integrate, in accordo con le istruzioni del produttore. Le membrane sono state incubate con il Blocking Reagent

della Chemicon International (Temecula, CA, USA) a temperatura ambiente per 1 h e poi incubate con l'anticorpo anti-peptide contro il CYP3A4 di bovino (1:1000). In seguito, sono state incubate con gli anticorpi secondari di capra anti-IgG di coniglio coniugati con perossidasi (diluizione finale 1:5000). Le concentrazioni di anticorpo primario e secondario sono state ottimizzate verificando diverse diluizioni (da 1:500 a 1:2500 e da 1:5000 a 1:10000, rispettivamente). I controlli sono stati ottenuti utilizzando il siero pre-immune di coniglio (diluizioni finali da 1:1000 a 1:2000) per controllare l'assenza di bande intorno al peso molecolare di interesse. La rilevazione delle bande è stata effettuata utilizzando il kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate della Pierce Chemical (Rockford, IL, USA), in accordo con le istruzioni del produttore. Le bande immunopositive sono state evidenziate tramite il software HP photo & imaging software ver. 2.5 per lo scanner HP Scanjet 5590.

Immunoinibizione

L'immunoinibizione è stata effettuata pre-incubando i microsomi per 30 min a temperatura ambiente con IgG purificate anti-peptide in una *range* compreso tra 0,06 e 0,97 mg/IgG/mg proteina (5 livelli di concentrazione). La reazione è stata avviata con l'aggiunta di tampone fosfato, β -NADPH e TST (250 μ M). Gli esperimenti di immunoinibizione sono stati effettuati in triplicato. I controlli sono stati incubati senza anticorpo ma con la stessa quantità di tampone Tris-Glicina pH 7.5, contenente NaCl 250 mM e thimerosal 0.02 %.

I risultati sono stati espressi come percentuale delle attività di controllo.

Analisi di dati

Le curve standard e di calibrazione sono state calcolate utilizzando un'analisi di regressione lineare con il metodo dei minimi quadrati; pendenze, intercette e coefficienti di regressione lineari (r^2) sono stati determinati per ciascuna curva (Microsoft Excel, 2000). La valutazione dei parametri di cinetica enzimatica e di inibizione e l'analisi statistica sono state effettuate utilizzando (GraphPad Prism, versione 4.02, San Diego, CA, USA). K_m e V_{max} sono state calcolate utilizzando l'equazione di regressione non lineare di Michaelis–Menten. I valori di IC_{50} sono stati calcolati utilizzando l'equazione di regressione non lineare Dose-Risposta log

(inibitore) vs risposta. Le differenze statisticamente significative sono state valutate tramite F test (livello di significatività $p < 0,05$). Per descrivere la cinetica enzimatica come mono- o bi-fasica (ovvero se uno o più enzimi partecipavano alla reazione), è stato adottato il di Eadie–Hofstee plot. Il runs test è stato effettuato per valutare le deviazioni dalla linearità (GraphPad Prism, version 4.02, San Diego, CA, USA).

3.2 Risultati

Performance del metodo analitico e cinetica enzimatica

I tempi di ritenzione medi di 6 β -, 16 β - e 2 β -OH TST erano rispettivamente 28,5 \pm 0,7, 37,5 \pm 0,5 e 42,0 \pm 0,6min e la corsa durava 60 min (Fig. 3.1).

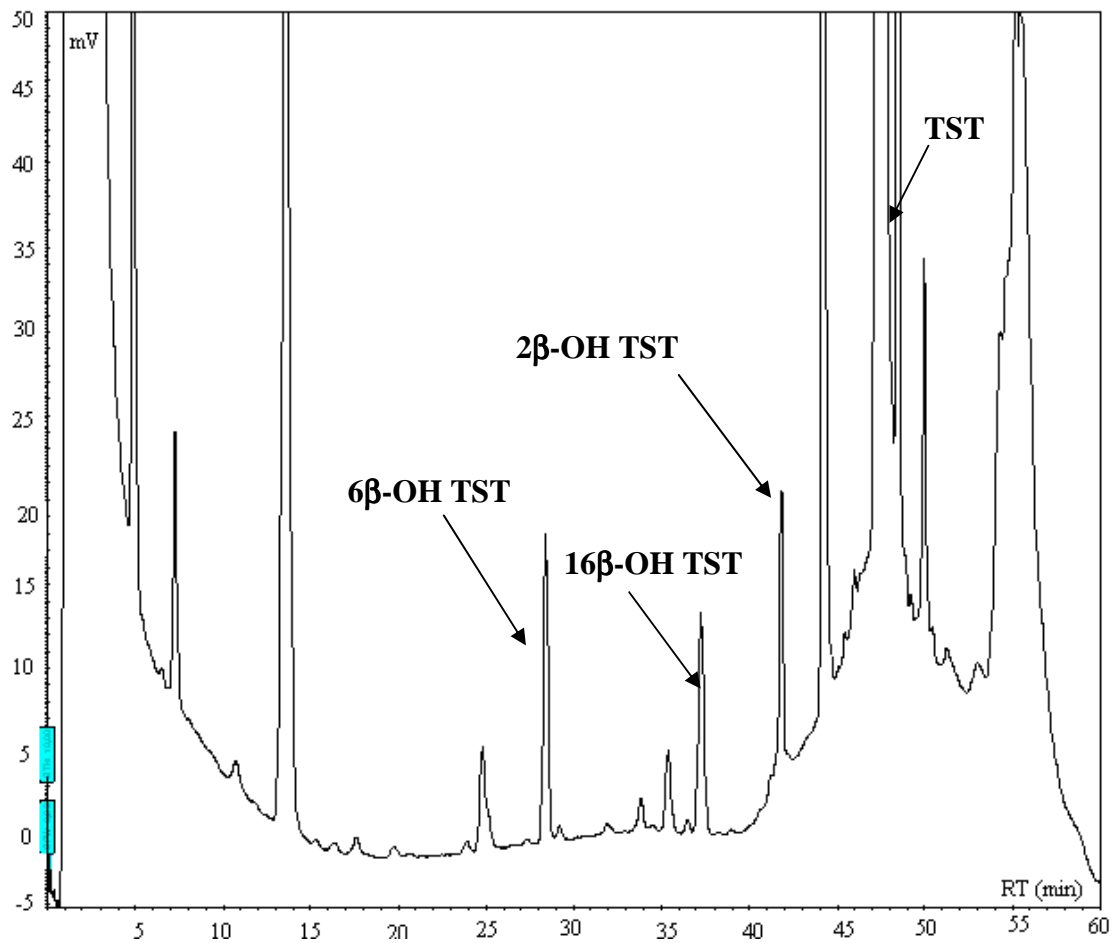


Figura 3.1: Cromatogramma di un'analisi in HPLC che mostra la separazione dei metaboliti del TST (250 μ M) ottenuti in un'incubazione con microsomi epatici di bovino e NADPH per 10 min a 37°C.

La linearità del metodo analitico è stata dimostrata in un range di soluzioni standard e di standard di calibrazione tra 0,1 e 10 μM ($r^2 > 0,99$; 3 replicati per 6 livelli di concentrazione). La precisione *intra-* ed *inter-day* (espressa come deviazione standard relativa percentuale) era $< 10\%$ e l'accuratezza (espressa come differenza relativa tra il valore misurato e quello reale) era $< 20\%$ sia *intra-* che *inter-day* ($n=6$). Il limite di quantificazione, calcolato come la concentrazione più bassa per cui precisione e accuratezza erano $< 20\%$, era 0,1 μM per tutti i metaboliti del TST.

Utilizzando microsomi epatici di bovino e un tipico approccio di cinetica enzimatica, sono state determinate le costanti di cinetica enzimatica K_m e V_{max} per le attività di 6 β -, 16 β - e 2 β -OHT che sono risultate $93,4 \pm 13,8$, $36,4 \pm 6,1$ e $110,8 \pm 15,2$ μM (media \pm ES) per la K_m e $0,558 \pm 0,03$, $0,280 \pm 0,013$ e $0,338 \pm 0,017$ nmol/min/mg prot (media \pm ES) per la V_{max} ($r^2 = 0,99, 0,98, 0,99$, rispettivamente; Fig. 3.2). La K_m di 16 β -OHT era significativamente diversa da quelle di 6 β -OHT e 2 β -OHT ($p < 0,01$). La V_{max} di 6 β -OHT era significativamente diversa da quelle di 16 β -OHT ($p < 0,001$) e 2 β -OHT ($p < 0,01$); inoltre, la V_{max} di 16 β -OHT era significativamente diversa da quella di 2 β -OHT ($p < 0,05$).

Il plot di Eadie-Hofstee ha evidenziato come queste attività enzimatiche seguano nel bovino un andamento cinetico mono-fasico ($r^2 = 0,95, 0,86, 0,97$, per 6 β -, 16 β - e 2 β -OHT, rispettivamente; Fig. 3.3). Il runs test ha confermato l'adeguatezza del modello utilizzato per interpolare i dati ($p=0,4, 0,8$ e 1 , per 6 β -, 16 β - e 2 β -OHT, rispettivamente).

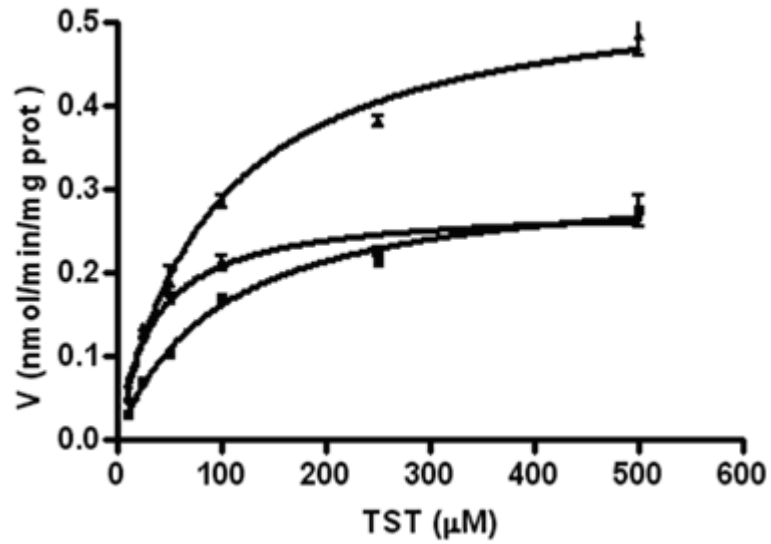


Figura 3.2: Plot di Michaelis–Menten plot per le attività di idrosilazione del TST in microsomi epatici di bovino (pool di 6 animali; ciascun punto è la media di 10 replicati): (▲)6β-OHT; (●)16β-OHT; (■)2β-OHT.

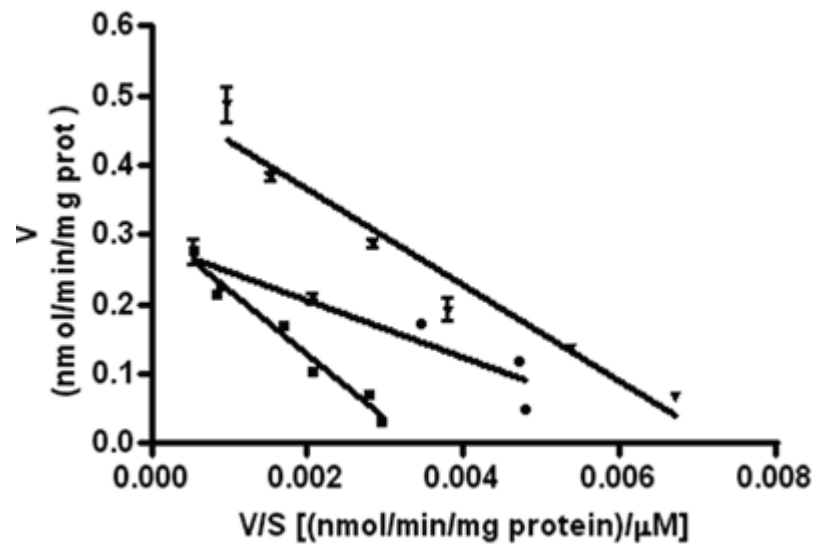


Figura 3.3. Plot di Eadie-Hofstee (ciascun punto è la media di 10 replicati): (▲)6β-OHT; (●)16β-OHT; (■)2β-OHT.

Studi di inibizione chimica

I risultati dell'inibizione chimica effettuati con il KTZ, inibitore di CYP3A, hanno evidenziato una forte inibizione delle attività di 6 β -, 16 β - e 2 β -OHT con valori di IC₅₀ (*best-fit-values* e intervalli di confidenza al 95%) pari a 0,16 (da 0,046 a 0,28), 0,09 (da 0,034 a 0,25) e 0,09 (da 0,03 a 0,26) μ M μ M, rispettivamente; Fig. 3.4). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata evidenziata tra i valori.

9-EPh, inibitore di CYP2B, ha inibito le attività di 6 β -, 16 β - e 2 β -OHT con valori di IC₅₀ (*best-fit-values* e intervalli di confidenza al 95%) di 51,4 (da 20,5 a 130,4), 5,7 (da 3,2 a 10,9) e 3,4 (da 2,1 a 6,8) μ M, rispettivamente (Fig. 3.5). Differenze statisticamente significative sono state evidenziate tra i valori di IC₅₀ di 6 β -OHT vs quelli di 16 β -OHT ($p < 0,01$) e 2 β -OHT ($p < 0,001$).

I risultati ottenuti con ORPH con il protocollo di inibizione competitiva sono riportati in Fig. 3.6a. ORPH ha inibito le attività di TST-idrossilasi con valori di IC₅₀ > 1000 μ M. I risultati ottenuti con il protocollo di pre-incubazione hanno evidenziato un'inibizione non concentrazione-dipendente in contrasto con i risultati del protocollo competitivo e hanno suggerito l'assenza di inibizione metabolismo-dipendente (Fig. 3.6b)

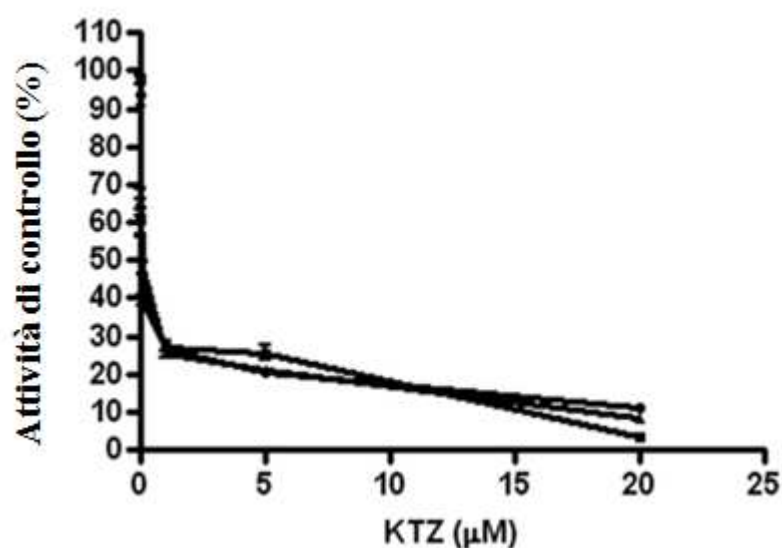


Figura 3.4. Effetti del KTZ sull'idrossilazione del TST in microsomi epatici di bovino: (▲)6 β -OHT; (●)16 β -OHT; (■)2 β -OHT.

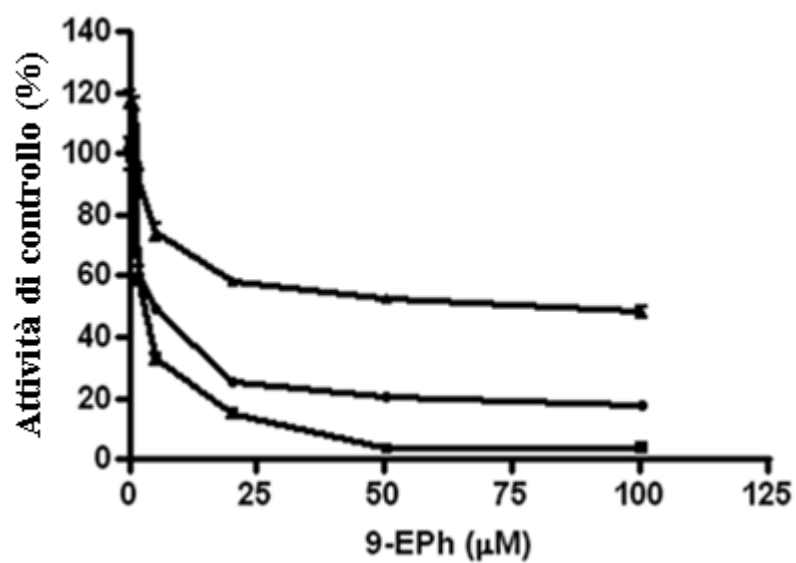


Figura 3.5. Effetti del 9-EPh sull'idrossilazione del TST con microsomi epatici di bovino: (▲)6β-OHT; (●)16β-OHT; (■)2β-OHT.

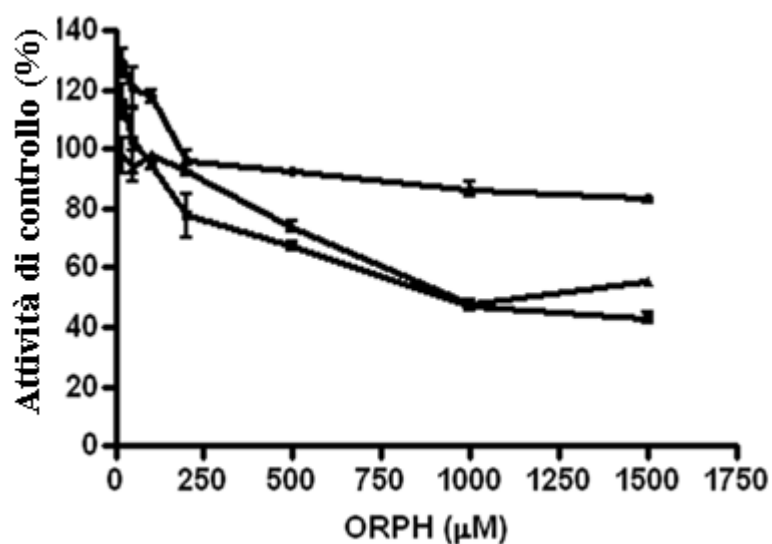


Figura 3.6a. Effetti dell' ORPH sull'idrossilazione del TST con protocollo di inibizione competitiva: (▲)6β-OHT; (●)16β-OHT; (■)2β-OHT.

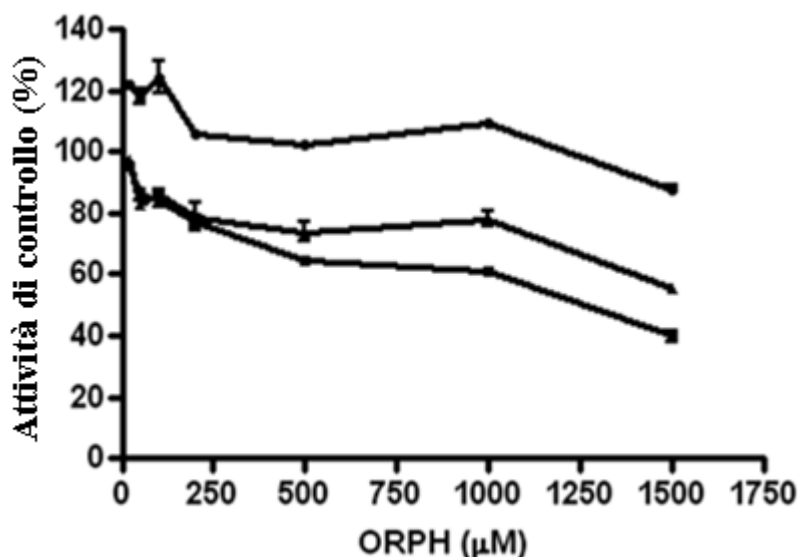


Figura 3.6b. Effetti dell' ORPH con protocollo di inibizione con pre-incubazione: (▲)6β-OHT;(●)16β-OHT;(■)2β-OHT.

Selezione del peptide e immunoinibizione

Il peptide (VKRIKESRLKDNQKPRVDFLQ), corrispondente agli aminoacidi 253-273 dell'isoforma CYP3A4 di bovino, è stato selezionato sulla base di una bassa omologia di sequenza tra le principali isoforme di citocromo P450 di bovino, di un'elevata probabilità di superficie e idrofilicità. Inoltre, questa sequenza di 21 aminoacidi di CYP3A4 di bovino ha mostrato un buon allineamento con una sequenza di 21- aminoacidi (253-273) di CYP3A4 di uomo che è stata utilizzata per produrre efficienti anticorpi inibitori (Wang and Lu, 1997).

L'anticorpo anti-peptide contro CYP3A4 di bovino ha inibito fortemente le attività di TST-idrossilasi nel fegato di bovino con valori di IC_{50} (*best-fit values* e intervalli di confidenza al 95%) di 0,28 (da 0,18 a 0,46), 0,20 (da 0,16 a 0,26) e 0,16 (da 0,13 a 0,20) mg IgG/mg proteina, rispettivamente (Fig. 3.7). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata evidenziata nei valori ottenuti.

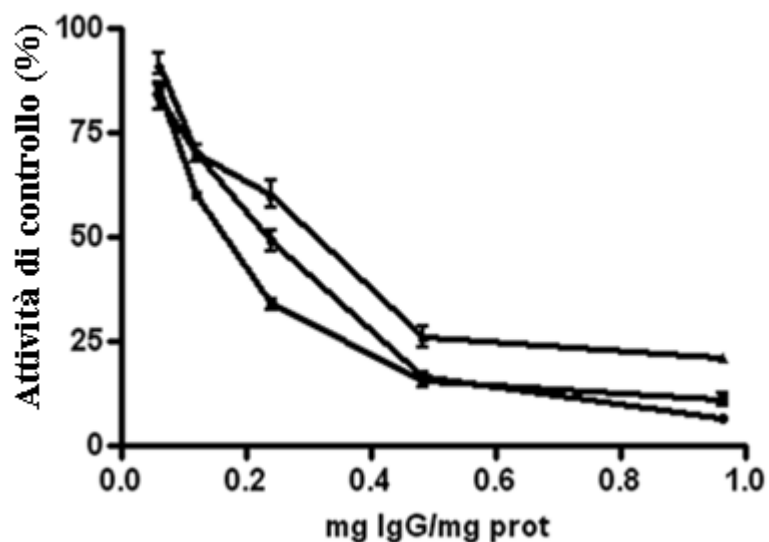


Figura 3.7: Effetti dell'anticorpo anti-peptide contro CYP3A4 di bovino sull'idrossilazione del TST in microsomi epatici di bovino (pool di 6 animali; ciascun punto è la media di 3 replicati): (▲6β-OHT; ●) 16β-OHT; (■)2β-OHT.

Western Blot

L'analisi in Western Blot è stata effettuata per determinare la reattività dell'anticorpo anti-peptide con i microsomi epatici di bovino. L'anticorpo anti-peptide sembrava riconoscere due proteine intorno ai 55 KDa di peso molecolare (Fig. 3.7). Nessuna banda significativa è stata evidenziata nel siero pre-immune di coniglio intorno al peso molecolare di interesse (Fig. 3.8).

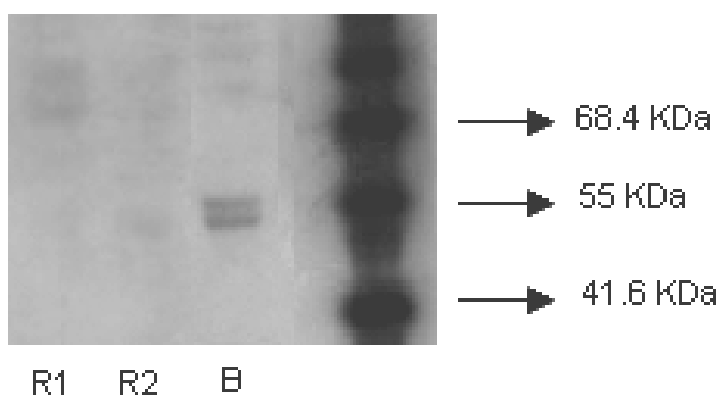


Figura 3.8. Analisi in Western Blot di CYP3A con microsomi epatici di bovino (pool di 6 animali; R1: siero pre-immune di coniglio, 1:1000; R2: siero pre-immune di coniglio, 1:2000; B: microsomi epatici di bovino).

3.3 Discussione

In letteratura, sono presenti studi relativi alla valutazione delle attività di idrossilazione del TST nel bovino (Zweers-Zeilmaker *et al.*, 1998b; Sivapathasundaram *et al.*, 2001; Szotàková *et al.*, 2004) ma nessuno di questi include studi accurati di cinetica enzimatica o di inibizione.

Nel presente lavoro invece sono stati determinati i parametri di cinetica enzimatica per le attività di 6 β -, 16 β - and 2 β -OHT con microsomi epatici di bovino e sono stati effettuati studi di inibizione chimica e di immunoinibizione.

I risultati dello studio di cinetica enzimatica hanno evidenziato che il valore di K_m di 16 β -OHT (36,4 μ M) era significativamente più basso di quelli di 6 β -OHT (93,4 μ M) e 2 β -OHT (110,8 μ M). Siccome il parametro K_m riflette l'affinità del substrato per un enzima, si potrebbe supporre una maggiore affinità apparente del TST per isoforma/e responsabili della sua idrossilazione in posizione 16 β . I valori di V_{max} di 16 β -OHT (0,280 nmol/min/mg prot) e 2 β -OHT (0,338 nmol/min/mg prot) erano significativamente più bassi di quello di 6 β -OHT (0,558 nmol/min/mg prot). La velocità massima è direttamente proporzionale alla concentrazione di un enzima e quindi può essere utilizzata per valutarla. Quindi, si può supporre un probabile minor contenuto di isoenzima/i responsabili dell'idrossilazione del TST in posizione 16 β e 2 β .

Sono stati determinati anche i valori di *clearance* intrinseca (Cl_{int} , V_{max}/K_m) ed i risultati ottenuti (media \pm ES) erano $0,0076 \pm 0,0002$, $0,0072 \pm 0,0003$ e $0,0040 \pm 0,0002$ ml/mg proteina/min rispettivamente per 6 β -, 16 β - e 2 β -OHT. I valori di Cl_{int} di 6 β - e 16 β -OHT erano significativamente diversi da quello di 2 β -OHT ($p < 0,001$). La Cl_{int} indica la velocità di cattura del substrato da parte di un enzima (Northrop, 1998) e di conseguenza fornisce una misura dell'efficienza enzimatica, permettendo di confrontare enzimi diversi. Di conseguenza, la conversione del TST in 6 β - e 16 β -OH TST sembrerebbe essere caratterizzata da una maggiore efficienza. Infine, il plot di Eadie-Hofstee e il runs test hanno evidenziato che all'interno del *range* di concentrazioni di TST studiate, un solo enzima o enzimi con valori di K_m simili sono responsabili dell'idrossilazione del TST in posizione 6 β , 16 β e 2 β , rispettivamente.

Il KTZ, un inibitore selettivo di CYP3A4 nell'uomo a basse concentrazioni, ha inibito tutte le attività TST-idrossilasi in microsomi epatici di bovino con valori di IC_{50}

(0.16, 0.09 e 0.09 μM per 6 β -, 16 β - e 2 β -OHT, rispettivamente) paragonabili a quelli dei saggi che hanno considerato l'attività 6 β -OHT nell'uomo ($\text{IC}_{50}=0.11 \mu\text{M}$; Guo *et al.*, 2000).

9EPh è stato utilizzato come inibitore di CYP2B ed ha evidenziato un pattern di inibizione simile per 16 β - e 2 β -OHT, mentre l'attività di 6 β -OHT è stata inibita solo fino al 52% anche con la concentrazione più elevata di inibitore (100 μM). 9EPh è considerato un inibitore selettivo di CYP 2B1, 2B2, 2B4,2B11, 2B6, e 2b-10. Il sito di attacco del gruppo fenantril-acetilico sembrerebbe essere in corrispondenza della sequenza F297-L307 di CYP2B1 di ratto. Confrontando le sequenze inattivate dal 9EPh, CYP 2B1, 2B2, 2B4, 2B6, 2b-10 e 2B11, sono quasi identiche nel segmento che include la sequenza F297-L307. Sembrerebbe dunque che questi isoenzimi leghino il 9EPh ottimizzando l'orientamento dell'intermedio chetene in prossimità di un aminoacido che è importante dal punto di vista catalitico (T) nel sito attivo dell'enzima (Roberts *et al.*, 1997). La sequenza vicino al residuo T è conservata anche in CYP2B di bovino anche se è localizzata in una posizione diversa (F245-L255), in quanto la proteina bovina non possiede una sequenza di 51 aminoacidi corrispondenti ai residui 58-109. Comunque, è necessario sottolineare che nel bovino la sequenza F303- L313 di CYP3A4 è piuttosto simile a F245-L255 di CYP2B; di conseguenza, non si può escludere una possibile interazione di 9EPh con CYP3A4. I risultati ottenuti con il 9EPh sembrerebbero suggerire un maggior potere inibitorio del 9EPh per isoforma/e di citocromo P450 responsabili dell'idrossilazione del TST in posizione 16 β e 2 β rispetto alla posizione 6 β .

Utilizzando l' ORPH, inibitore di P4502B1 nel ratto (Reidy *et al.*, 1989), è stata osservata un'inibizione parziale con valori di $\text{IC}_{50} \geq 1000 \mu\text{M}$ confermando quanto riportato da Guo *et al.* (1997) in microsomi epatici di uomo. Questi autori hanno evidenziato che l'ORPH inibisce moderatamente anche l'attività di CYP3A a concentrazioni pari a 1000 μM , provando che ORPH, ma in generale gli inibitori del citocromo P450, possono avere diversi effetti e specificità in specie diverse.

Per confermare ulteriormente i risultati ottenuti, è stato utilizzato un anticorpo anti-peptide contro CYP3A4 di bovino. L'anticorpo prodotto contro la sequenza omologa di CYP3A4 di uomo ha inibito significativamente (>90%) l'attività di idrossilazione del TST in posizione 6 β in microsomi epatici di uomo (Wang e Lu, 1997).

Innanzitutto, è stata verificata la specificità dell'anticorpo anti-peptide prodotto incubandolo con microsomi epatici di bovino; i risultati ottenuti hanno evidenziato la presenza di due bande in assenza di rumore di fondo. Per determinare la specificità dell'anticorpo primario, l'anticorpo è stato pre-adsorbito con lo specifico peptide sintetico che era stato usato come antigene per lo sviluppo dell'anticorpo. La banda a più alto peso molecolare svaniva completamente mentre quella a più alto peso molecolare svaniva quasi completamente (*data not shown*). Da questi risultati possiamo presumere che le bande corrispondano a diversi membri della sottofamiglia CYP3A che mostra un'elevata similarità nella sequenza peptidica. Inoltre, lanciando un BLAST utilizzando la sequenza peptidica come *query*, solamente sequenze di CYP3A di bovino oppure di altre specie producevano un allineamento significativo.

Infine, i risultati dell'immunoinibizione hanno evidenziato una forte inibizione delle attività di idrossilazione del TST: >80% per 6 β -OHT e >90% per 16 β - e 2 β -OHT suggerendo il coinvolgimento predominante di CYP3A nell'idrossilazione del TST nel fegato di bovino.

3.4 Conclusioni

In conclusione, questo studio ha proposto un metodo accurato ed un protocollo standardizzato per la valutazione delle attività di TST-idrossilasi in microsomi epatici di bovino, che include anche la determinazione dei parametri di cinetica enzimatica per la prima volta in questa specie per queste attività enzimatiche. Inoltre, un approccio combinato, che prevedeva l'impiego di inibitori chimici e di anticorpi specifici e inibitori, ha suggerito il coinvolgimento predominante di CYP3A nella produzione dei tre principali metaboliti idrossilati del TST nel fegato di bovino; CYP2B sembrerebbe non essere coinvolto oppure il bovino potrebbe possedere un basso contenuto epatico di questa isoforma tale da renderne il ruolo irrilevante se confrontato con CYP3A. Questo lavoro rappresenta uno dei pochi esempi di studi che hanno caratterizzato accuratamente una specifica attività citocromo P450 in specie di interesse veterinario.

PUBBLICAZIONI

Articoli su rivista:

PEGOLO S., GIANTIN, M., DACASTO, M., MONTESISSA, C. AND CAPOLONGO, F. (2010).

Testosterone hydroxylation in bovine liver: enzyme kinetic and inhibition study.
Xenobiotica, doi:10.3109/00498250903540875

Comunicazioni a congresso:

1. PEGOLO S., MONTESISSA C. AND CAPOLONGO F.

Is 16 beta-hydroxytestosterone a marker for CYP2B activity in cattle?

Book of abstracts of the FEBS Advanced Course, Cytochrome P450 Systems: from Structure to Application, Kranjska Gora, Slovenia 23-28 September 2008, p. 180.

CAPITOLO 4

**Effetti di trattamenti illeciti su CYP3A nel fegato del
bovino da carne e in colture primarie di epatociti di
bovino**

4.0 Introduzione

L'uso di sostanze ad azione ormonale come promotori di crescita negli animali da produzione è vietato all'interno dell'Unione Europea sin dal 1988. Nel 1996 la direttiva 96/22/CE (emendata dalla Direttiva 2003/74/CE, attualmente in vigore) ha posto in generale delle restrizioni più severe sull'uso di sostanze ad azione ormonale negli animali da produzione ed ha ribadito il completo divieto d'uso di promotori di crescita. L'adozione di questa misura è basata sull'Opinione dello *Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health* (SVCH) del 30 aprile 1999 (e successive revisioni del 2000 e 2002) che ha evidenziato il potenziale rischio per la salute umana derivante dai residui di ormoni nella carne bovina e i suoi derivati. Periodicamente la decisione di confermare il divieto viene valutata in base alle nuove informazioni scientifiche disponibili; nel 2007 l'*European Food Safety Authority* (EFSA) ha confermato le conclusioni delle precedenti opinioni dello SVCH.

Per sorvegliare l'effettiva applicazione delle norme sul divieto di utilizzo dei promotori di crescita ad azione ormonale e, più in generale, del corretto utilizzo del farmaco veterinario, la Direttiva 96/23/CE richiede agli Stati appartenenti all'Unione Europea di adottare un piano nazionale di sorveglianza, che in Italia è stato denominato Piano nazionale Residui (PNR), per la ricerca di residui e sostanze negli animali vivi, nei loro tessuti ed escreti e nei prodotti di origine animale. Le modalità di attuazione del PNR sono definite dal Decreto Legislativo 16 marzo 2006, n. 158.

L'utilizzo dei promotori di crescita ad azione ormonale nel settore dell'allevamento dei bovini da carne, anche se in UE è una pratica illegale, è dettato dagli effetti che tali sostanze sono in grado di generare in termini di incremento ponderale, di riduzione degli indici di conversione alimentare e quindi di aumento complessivo del reddito.

Si è verificata un'evoluzione sia nella scelta dei principi attivi utilizzati che sulle modalità di somministrazione. Courtheyn *et al.* (2002) hanno indicato alcune tra le strategie più diffuse per sfuggire ai controlli che possono essere così riassunte: uso di dosi individuali molto basse attraverso la combinazione di prodotti diversi della stessa categoria (esempio: diversi androgeni ed estrogeni nello stesso cocktail); uso di dosi basse di composti appartenenti a gruppi differenti che hanno effetti addizionali o sinergici (esempio: corticosteroidi e β -agonisti in cocktail); uso di prodotti che non

vengono ricercati nelle analisi ufficiali o uso di prodotti sintetizzati *ex novo*; uso di ormoni naturali o loro precursori, la cui somministrazione esogena risulta essere molto difficile da dimostrare. Nella maggior parte dei casi gli anabolizzanti sono somministrati ai bovini sottoforma di esteri (benzoato, propinato, palmitato, etc...) in soluzioni iniettabili a lento rilascio, come impianti sottocutanei o per via orale. Gli steroidi naturali maggiormente utilizzati, a scopo anabolizzante, negli animali da reddito sono principalmente l'estradiolo, il progesterone e il testosterone mentre, tra quelli di sintesi, si annoverano trenbolone acetato, melengestrololo, 17 β -boldenone (BOLD) e glucorticoidi come il desametasone (DES).

a) ESPERIMENTO DESAMETAZONE ED ESTRADIOLO

Estrogeni

L'estradiolo (E2) e l'estrone sono i principali estrogeni presenti rispettivamente negli animali non gravidi e gravidi; vengono prodotti principalmente a livello ovarico, sotto il controllo delle gonadotropine ipofisarie. L'ormone luteinizzante (LH) stimola le cellule tecali del follicolo a secernere testosterone, il quale viene convertito successivamente ad estradiolo per azione dell'aromatasi nelle cellule della granulosa, sotto l'influenza dell'ormone follicolo stimolante (Kaltenbach *et al.*, 1984). Essendo molecole lipofile, gli estrogeni diffondono passivamente attraverso le membrane cellulari ma, una volta entrati nel circolo ematico, il loro trasporto richiede il legame con alcune proteine plasmatiche, tra le quali la *sex hormone-binding protein* e l'albumina. Solo la frazione circolante libera degli steroidi, non legata a proteine, rappresenta quella biologicamente attiva (You, 2004).

Il meccanismo di azione di base degli estrogeni è lo stesso degli androgeni e prevede l'interazione diretta tra l'ormone e specifici recettori per gli estrogeni (ER α ed ER β).

Il ruolo primario degli estrogeni è sempre stato considerato quello di garantire la funzionalità dell'apparato riproduttore femminile; in particolare questi ormoni sono responsabili dell'accrescimento delle ghiandole endometriali e dei dotti della ghiandola mammaria; delle modificazioni istologiche dell'epitelio vaginale durante il ciclo estrale;

della regolazione della secrezione delle gonadotropine, fra cui il rilascio pre-ovulatorio dell'LH, del rilascio della prostaglandina F₂- α da parte dell'utero (Stabenfeldt, 2002). Tra gli altri effetti che concernono la riproduzione si annoverano l'induzione delle manifestazioni comportamentali tipiche dell'estro nella femmina e, in parte, anche nel maschio (Ball e Balthazart, 2004). Gli estrogeni svolgono funzioni importanti anche nel testicolo, dal momento che vengono sintetizzati nelle cellule del Sertoli, sotto lo stimolo delle gonadotropine, secondo un meccanismo di regolazione endocrina simile a quello della femmina. Diversi studi hanno dimostrato che, nel topo, la delezione dei geni codificanti l'aromatasi ed ER interferisce negativamente con la spermatogenesi e la steroidogenesi (Akingbemi, 2005).

I farmaci ad attività estrogenica impiegati nel bovino sono per lo più costituiti da esteri sintetici dell'estradiolo, quali l'estradiolo benzoato, il valerato e il *p*-idrossibenzoato.

Dopo somministrazione per via parenterale, tali esteri vengono rapidamente assorbiti, convertiti in estradiolo tramite idrolisi, metabolizzati ed escreti, in maniera analoga all'ormone naturale. Nei ruminanti, il metabolita principale è il 17 α estradiolo, la cui escrezione avviene per via biliare e fecale (>75%; EMEA, CVMP-oestradiol, 1999). Nell'ambito della medicina veterinaria, l'uso terapeutico degli estrogeni nell'ambito degli animali destinati alla produzione di alimenti per l'uomo, è regolamentato dal D.L.vo 158/06 che prevede due deroghe rispetto al divieto di utilizzo delle sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze β -agoniste (art. 2 e art.3). Nel decreto si afferma che è possibile la somministrazione di medicinali veterinari contenenti E2 e/o suoi derivati sottoforma di esteri "per il trattamento di macerazione o mummificazione fetale dei bovini o della piometria per i bovini" (art. 4, comma 1, d) oppure per "l'induzione dell'estro nei bovini, negli equini, negli ovini e nei caprini, fino al 14 ottobre 2006" (art.5, comma 1, c). Attualmente dunque l'unico utilizzo consentito è quello contemplato dall'articolo 4. Come tutti gli ormoni steroidei utilizzati come promotori della crescita, gli estrogeni stimolano l'accrescimento tramite un'azione diretta sulle cellule muscolari; in particolare, ciò si realizza attraverso una modulazione della trascrizione di specifici geni del muscolo che porta poi ad un incremento della sintesi proteica e un aumento del volume delle masse muscolari (Schmidely, 1993). L'estradiolo manifesta un ulteriore effetto auxinico, che consegue alla sua azione indiretta di modificazione dell'attività di altri ormoni coinvolti nei

meccanismi di regolazione della crescita, quali l'ormone della crescita (GH) e l'*insulin-like growth factor* (IGF-1). L'interazione tra gli estrogeni e l'ipofisi anteriore è classicamente considerato come il principale meccanismo responsabile della loro azione anabolizzante; infatti bovini da carne trattati con estrogeni o composti estrogeno-simili nella fase di finissaggio hanno evidenziato, rispetto ai soggetti di controllo, un incremento del peso dell'ipofisi, delle dimensioni e del numero delle cellule acidofile (responsabili della produzione e della secrezione di GH) e, conseguentemente, delle concentrazioni plasmatiche di GH (Griffin, 1999). Uno studio di Kamanga *et al.* (2004), in cui colture cellulari primarie ottenute dal muscolo semimembranoso di bovino incubate con E2 ha evidenziato un aumento dei profili di espressione genica di IGF-1, di ER α e dell'*IGF-binding protein 3* (IGFBP3).

Teoricamente, l'assunzione massima giornaliera di E2 è pari a 4,3 ng; questo dato consegue al fatto che estrogeni e/o loro metaboliti sono normalmente presenti negli alimenti di origine animale, in quantità che variano a seconda di specie, sesso, età, alimentazione e stato fisiologico dell'animale. E' stato dimostrato che, conseguentemente all'uso di E2, tale valore può aumentare di un fattore pari a 4,6 (Daxenberger *et al.*, 2001).

Brevemente per quanto riguarda il metabolismo di E2, nel fegato umano circa l'80% viene convertito in 2-idrossi estradiolo (2-OH E2), mentre il rimanente 20% diviene 4-idrossi estradiolo (4-OH E2) soprattutto in sede extraepatica; accanto a queste due vie metaboliche principali, grazie all'azione di diverse isoforme di citocromo P450, si forma anche una serie di metaboliti minori idrossilati (6 α -, 6 β -, 7 α -, 12 β -, 15 α -, 15 β -, 16 α -, 16 β -idrossi estrogeno; Tsuchiya *et al.*, 2005). In particolare, nell'uomo la sottofamiglia CYP3A è ampiamente coinvolta nel metabolismo degli estrogeni.

Glucocorticoidi

I glucocorticoidi sono ormoni steroidei prodotti nella zona fascicolata della corteccia surrenale consecutivamente all'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Tale attivazione richiede l'increzione, a livello ipotalamico, del fattore di rilascio della corticotropina (CRH) e, a posteriori, il rilascio dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) da parte dell'ipofisi anteriore, il cui *target* è rappresentato dalla corteccia del surrene. I glucocorticoidi intervengono in questo meccanismo di controllo, stabilendo un *feedback*

negativo; in particolare, inibiscono l'espressione genica e l'increzione di CRH a livello ipotalamico ed interferiscono con l'increzione di ACTH a livello dell'ipofisi (Vegiopoulos e Herzig, 2007).

I principali glucocorticoidi naturali sono il cortisolo, il cortisone e l'11-deidrocorticosterone. I glucocorticoidi esercitano un'ampia gamma di effetti fisiologici inclusi un'attività immunosoppressiva e anti-infiammatoria ed una regolazione del metabolismo intermedio di carboidrati, proteine e lipidi (Courtheyn *et al.*, 2002). I glucocorticoidi sono tra i farmaci antinfiammatori maggiormente impiegati in tutte le condizioni patologiche in cui vi sia un'abnorme attività del sistema immunitario.

Il desametasone (DES) è un glucocorticoide di sintesi, derivato dal cortisolo, impiegato in medicina veterinaria come antinfiammatorio in numerose specie animali e, nei ruminanti, anche come induttore del parto o per il trattamento della chetosi. Il DES, da solo o in associazione, costituisce il principio attivo di numerose preparazioni farmaceutiche autorizzate in medicina veterinaria. L'uso consentito è quello terapeutico individuale, per patologie che di solito interessano solo alcuni animali di allevamento, il suo impiego non è previsto per trattamenti prolungati, per evitare la comparsa dei numerosi effetti collaterali dei glucocorticoidi e per evitare il rischio della presenza di residui nelle derrate alimentari, neppure per trattamenti di massa.

Questi ormoni esplicano le loro funzioni principali grazie all'interazione con uno specifico recettore citoplasmatico, il recettore per i glucocorticoidi (GR). Il legame tra l'ormone ed il recettore provoca la conversione di quest'ultimo alla forma attiva, per esposizione del sito di legame con il DNA del recettore stesso, che consegue alla sua dissociazione dalla *heat shock protein 90* (HSP-90). Nella forma attiva, il complesso ormone-recettore può entrare nel nucleo, legarsi al DNA e, quindi, regolare la trascrizione di geni *target* (Derendorf e Hochhaus, 1995). In seguito, con un meccanismo di interazione genica e modificazione della sintesi di proteine, viene modificato il patrimonio fisiologico di numerosi enzimi intracellulari quali ad esempio le ciclossigenasi. Attraverso questo meccanismo il DES, per esempio esercita effetti antinfiammatori attraverso l'inibizione della sintesi delle prostaglandine, dei leucotrieni, del fattore di aggregazione piastrinica e di altri mediatori. I glucocorticoidi influenzano il metabolismo glucidico aumentando la gluconeogenesi e l'accumulo del glicogeno epatico ed inibendo l'utilizzo periferico del glucosio; stimolano il catabolismo proteico; influenzano quello lipidico, ridistribuendo il grasso corporeo ed avendo un'azione permissiva sulla lipolisi provocata dalle catecolamine; concorrono a modulare anche il

metabolismo del calcio inibendone l'assorbimento a livello intestinale ed aumentandone l'escrezione perché antagonizzano il trasporto mediato dalla vitamina D. Tra gli effetti indesiderati più frequenti, evidenti durante i trattamenti terapeutici antinfiammatori con DES nell'uomo e negli animali, sono presenti fenomeni ipertensivi, modifiche della glicemia e della glicosuria, la riduzione delle difese immunitarie, il rallentamento dei processi di cicatrizzazione (Schimmer *et al.*, 2006). E' noto che dosi elevate di glucocorticoidi per periodi prolungati possono causare atrofia muscolare e ridotto accrescimento. D'altra parte è comprovato che il DES, utilizzato a dosaggi subterapeutici, aumenta l'ingestione di cibo e il peso corporeo, diminuisce gli indici di conversione e la ritenzione di azoto, aumenta la ritenzione di acqua e limita la deposizione di grasso (Istasse *et al.*, 1989).

Conseguentemente, questi ormoni, utilizzati a basse dosi, sono i composti attualmente più sfruttati in Europa per ottenere illegalmente un miglioramento delle performance produttive degli animali in allevamento, soprattutto se impiegati in associazione con altre sostanze. Ad esempio, la presenza dei glucocorticoidi nelle preparazioni illegali contenenti β -agonisti e steroidi sessuali sembra aumentare l'effetto ripartitivo e anabolizzante di questi ultimi, in particolare impedendo una diminuzione del numero dei recettori β -adrenergici e alterando l'escrezione degli stessi β -agonisti (Abraham *et al.*, 2004)

Il DES e gli altri corticosteroidi non possono dunque essere impiegati a scopo auxinico negli animali da reddito nel territorio dell'Unione Europea ma sono ampiamente sfruttati in campo terapeutico per le loro proprietà antinfiammatorie; sono stati perciò stabiliti per queste sostanze dei tempi di sospensione, pari a 60 giorni per la carne di bovini trattati con DES nonché dei limiti massimi di residuo (LMR), stabiliti dal regolamento 2377/90/CE.

La tabella 4.1 riporta i valori di riferimento dei LMR per il latte ad altre matrici alimentari in diverse specie.

Tabella 4.1. Limiti massimi di residuo (LMR) rinvenibili nel latte ed in altre matrici alimentari in bovino, suino, equino.

<i>Principio attivo</i>	<i>Specie animale</i>	<i>Tessuto</i>	<i>LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$)</i>
<i>Desametazone</i>	Bovino	Muscolo	0,75
	Suino	Fegato	2,0
	Equino	Rene	0,75
	Bovino	Latte	0,3

Per quanto riguarda il metabolismo del DES, le reazioni di biotrasformazione nell'uomo sembrano privilegiare la formazione di metaboliti idrossilati in posizione 6 e 2. Nei ruminanti, il DES è principalmente idrossilato in posizione 6 e ridotto al gruppo 3-carbonile; poi, sia il composto parentale, sia il metabolita subiscono glucuronidazione o solfatazione (Al Katheeri *et al.*, 2006; Vincenti *et al.*, 2009). Nell'uomo, il chetoconazolo inibisce completamente la formazione del 6 α -e 6 β -idrossi DES, e ciò indica che la formazione di questi due metaboliti è strettamente dipendente dall'attività di CYP3A (Gentile *et al.*, 1996).

Numerosi studi (Silver *et al.*, 1990, Waxman *et al.*, 1990, Sidhu e Omiecinsky, 1995) hanno confermato che gli steroidi influenzano l'inducibilità di mRNA, proteina e attività citocromo P450. Tra le varie isoforme modulate dagli estrogeni c'è CYP3A. Nell'uomo, il 17 α -etinilestradiolo (17EE) inattiva CYP3A4 grazie al legame covalente di un suo intermedio reattivo con gli aminoacidi dell'apoproteina specifica; come conseguenza si osserva una modulazione dell'espressione di CYP3A4 e della sua attività di idrossilazione del TST in posizione 6 β (Lin *et al.*, 2002). Anche altri studi suffragano l'inibizione ad opera degli estrogeni nei confronti di alcune isoforme di CYP3A nell'uomo; in particolare Williams *et al.* (2004) hanno evidenziato una *down-regulation* di CYP3A4 e CYP3A43 da parte degli estrogeni nell'endometrio umano.

Per quanto riguarda il DES, è stata evidenziata la sua capacità di agire come fattore permissivo o soppressivo sull'induzione di CYP2B1/2, CYP3A1, CYP2A1 e probabilmente anche CYP2C11 in colture primarie di epatociti di ratto. In particolare per quanto riguarda CYP3A1, concentrazioni di DES tra 32 e 100 nM aumentavano i

livelli di induzione da fenobarbitale mentre concentrazioni pari a 1 μ M determinavano una riduzione dell'inducibilità di tale isoforma (Ringel *et al.*, 2002).

E' stato infatti dimostrato che concentrazioni submicromolari di DES sono in grado di indurre, in epatociti primari umani, l'espressione di CYP3A4 mediata dall'attivazione di *pregnane x receptor* (PXR) e dall'aumento dei livelli dell'eterodimero PXR:RXR α che sembrerebbe essere dipendente dall'azione diretta del DES sul recettore per i glucocorticoidi (GR). L'eterodimero PXR:RXR α trasloca poi nel nucleo e successivamente si lega agli *xenobiotic response elements* nei promotori di CYP3A, attivandone la trascrizione genica (Pascussi *et al.*, 2000a). Inoltre, Pascussi *et al.* (2000b) hanno evidenziato che la quantità di mRNA di CAR aumenta in seguito all'incubazione, in epatociti primari umani, con il DES, che a sua volta consente il potenziamento, a livello trascrizionale, dell'induzione fenobarbitale-dipendente di CYP3A4.

In questo esperimento dunque, si è inteso valutare l'effetto di un trattamento a base di DES, somministrato *per os*, da solo o in associazione con E2 (somministrato per via intramuscolare) sull'espressione dell'apoproteina CYP3A e sull'attività CYP3A-dipendente. L'obiettivo è stato, non solo verificare l'applicabilità del metodo HPLC messo a punto e del substrato TST per valutare una modulazione dell'attività CYP3A-dipendente, ma anche ottenere ulteriori evidenze sperimentali rispetto ai risultati di studi precedentemente condotti dal nostro gruppo di ricerca sul vitello a carne bianca (Cantiello *et al.*, 2009) e sul vitellone (Giantin *et al.*, 2010).

b) ESPERIMENTO BOLDENONE E ADD

Androgeni

Gli androgeni sono steroidi a 19 atomi di carbonio che si trovano prevalentemente nel maschio: i due principali composti sono l'androstenedione, che si forma nella corteccia surrenale ed il testosterone (TST), che si forma solo nelle gonadi. Nel maschio l' androgeno più importante è il testosterone, nella femmina quello a maggiore concentrazione plasmatica è l'androstenedione, seguito dal DHEA (deidroepiandrosterone), dall'androstenediolo e infine dal testosterone. Gli androgeni circolano nel plasma in massima parte legati a proteine; queste forme sono inattive

perché solo la forma libera degli androgeni (quella non legata) è metabolicamente attiva e pertanto può entrare/uscire nel comparto intracellulare delle cellule bersaglio. Nel testicolo, la maggior parte degli enzimi steroidogenici si trova nelle cellule del Leydig; sotto l'influenza dell'ormone luteinizzante (LH) e dell'ormone follicolo-stimolante (FSH), il progesterone viene idrossilato a 17α -idrossiprogesterone e quest'ultimo, per perdita della catena laterale e ossidazione in C17 diviene androstenedione e successivamente TST, dopo riduzione dello stesso C17. Il TST entra nel torrente circolatorio dove si lega a particolari proteine plasmatiche come le *sex hormone binding proteins* (SHBG) o l'albumina. Il TST può essere convertito in diidrotestosterone (DHT) in molti tessuti: il DHT è l'ormone maschile più potente ed agisce legandosi ad un recettore specifico intracellulare, il recettore per gli androgeni (AR): la formazione del complesso ormone-recettore comporta una trasformazione conformazionale del recettore stesso, che lo attiva e lo rende capace di interagire con specifiche sequenze nucleotidiche del DNA, andando a modificare la trascrizione dei geni associati.

Il TST è indispensabile per il mantenimento della spermatogenesi, il comportamento sessuale e la libido. Espleta anche una funzione sullo sviluppo corporeo: in molte specie animali, i maschi hanno dimensioni superiori a quelle delle femmine, fino ad arrivare a dimorfismi evidenti. Infatti, gli androgeni agiscono sull'ossificazione delle epifisi ossee, promuovono lo sviluppo delle masse muscolari e lo sviluppo laringeo e possiedono una netta azione anabolizzante proteica. In particolare, gli androgeni determinano un aumento del peso corporeo, dovuto essenzialmente ad un aumento del deposito proteico a livello cellulare nel muscolo ed una diminuzione del grasso corporeo (Choo *et al.*, 1991). Fondamentale è anche il loro ruolo nella differenziazione del comportamento sessuale e nello sviluppo dei caratteri sessuali secondari.

Il 17β -boldenone (BOLD) è uno steroide di sintesi ad attività androgenica con spiccate proprietà anabolizzanti che si differenzia dal testosterone esclusivamente per la presenza di un doppio legame in posizione 1 (Fig. 4.1). Altri steroidi correlati al composto parentale BOLD, sono l'androsta-1,4-diene-3,17-dione (ADD), spesso somministrato *per os* come precursore per il suo assorbimento rapido ed il 17α -boldenone (17α -BOLD), la forma inattiva del BOLD

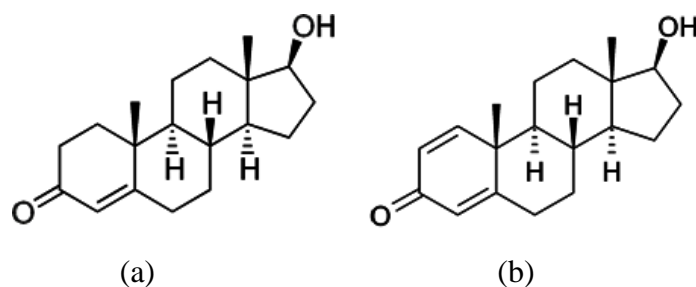


Figura 4.1. (a) Struttura del TST; (b) Struttura del BOLD.

E' inoltre noto che il BOLD e l'ADD sono utilizzati dagli atleti e nei cavalli da competizione per incrementare le prestazioni sportive e nel bovino per incrementare la crescita e la conversione alimentare.

La segnalazione della presenza di esteri del BOLD in siti di iniezione nelle carcasse di animali macellati e il sequestro di preparazioni con miscele a base di esteri di BOLD e ADD destinate ad aziende zootecniche dimostra infatti che, in virtù degli effetti favorevoli sull'incremento ponderale e sul miglioramento degli indici di conversione alimentare, il BOLD è impiegato come promotore della crescita anche nell'allevamento del bovino da carne (Arts *et al.*, 1996).

Il fegato è il tessuto target delle principali reazioni metaboliche di conversione di BOLD in ADD e *vice versa*. Gli enzimi responsabili potrebbero essere gli stessi coinvolti nella conversione dei 17-ketosteroidi nei corrispondenti 17 β -idrossisteroidi come l'androstenedione, l'estrone o l'ADD in 17 β -testosterone, 17 β -estradiolo e BOLD, rispettivamente. Questi enzimi catalizzano l'ossidazione del BOLD in ADD principalmente con il NAD come cofattore, e la riduzione di ADD in BOLD, principalmente con il NADPH come cofattore (Merlanti *et al.*, 2007). Inoltre la presenza di 6 β -idrossi-BOLD, prodotto a partire da entrambi i composti suggerisce che enzimi citocromo P450 potrebbero essere coinvolti nella biotrasformazione, come per il TST (Merlanti *et al.*, 2007). In particolare, si è dimostrato che l'idrossilazione in posizione 6 β nell'uomo è catalizzato selettivamente da CYP3A4 (Rendic *et al.*, 1999).

Tra i sistemi *in vitro* per lo studio del metabolismo epatico P450 dipendente nelle specie di interesse veterinario, sono frequentemente utilizzate le colture primarie di epatociti. Le colture primarie di epatociti isolati dal fegato di bovino rappresentano un sistema più completo rispetto alle frazioni subcellulari; la presenza di un

compartimento intracellulare intatto che mantiene integre le sue funzioni permette un più accurato studio delle vie metaboliche e permette di valutare sia le reazioni di fase I che le reazioni di fase II. Gli epatociti in coltura primaria conservano livelli di enzimi di fase I pari all'80-90% per circa 96-120 ore (Ekins *et al.*, 1997). Inoltre, questo sistema *in vitro* è stato efficacemente impiegato per valutare l'effetto di sostanze anabolizzanti sul metabolismo citocromo P450-dipendente (Ringel *et al.*, 2002; Pascussi *et al.*, 2000b).

L'obiettivo del presente studio è stato quello di valutare, in microsomi ottenuti da colture primarie di epatociti di bovino incubati con BOLD, ADD e con l'associazione BOLD-ADD, un'eventuale modulazione dell'espressione dell'apoproteina CYP3A e di verificare l'applicabilità del metodo HPLC e del substrato TST per determinare gli effetti di tali sostanze sull'attività CYP3A-dipendente.

Entrambe le prove sperimentali descritte si proponevano dunque di aumentare le conoscenze relative alla modulazione dell'attività citocromo P450-dipendente; inoltre le informazioni ottenute con tali studi *in vitro* possono essere utili per il disegno sperimentale di progetti volti all'identificazione di *marker in vivo* di trattamento (ad esempio metaboliti nelle urine).

a) ESPERIMENTO DESAMETAZIONE ED ESTRADIOLO

4.1 Materiali e metodi

Reagenti e composti chimici

Desametazone sodio fosfato (Desashock®) ed estradiolo benzoato (Estradiolo AMSA®) sono stati acquistati dalla Fort Dodge Animal Health (Bologna, Italy) e dall'AMSA s.r.l. (Roma, Italia), rispettivamente.

4-Androsten-2 β , 17 β -diol-3-one, (2 β OH-TST), 4-androsten-16 β , 17 β -diol-3-one (16 β OH-TST), 4-androsten-6 β , 17 β -diol-3-one (6 β OH-TST), 4-androsten-17 β - OL 3-one (TST) e 4-androsten-3,17-dione (AND) sono stati acquistati dalla Steraloids (Newport, RI, USA).

Acetonitrile, metanolo e diclorometano (*HPLC grade*) sono stati acquistati dalla Mallinckrodt-Baker (Milano, Italia).

Tutti gli altri reagenti, sali (*analytical grade*) e solventi (*HPLC grade*) sono stati acquistati dalla Mallinckrodt-Baker, o dalla Sigma Aldrich.

Gli anticorpi monoclonali anti-CYP3A1/3A2 di ratto erano della Oxford Biochemical Research (Milano, Italia). Anticorpi di pecora anti-IgG di topo coniugati con la perossidasi di cavallo sono stati acquistati dalla Chemicon International (Prodotti Gianni, Milano, Italia). Tutti gli altri reagenti per l'Immunoblotting erano *molecular biology grade*.

Animali

La sperimentazione è stata condotta su 18 bovini, nati da incroci tra razze francesi da carne, di 15-18 mesi d'età, di peso tra 392 e 542 kg, stabulati presso l'azienda Agricola "Caron" di Brugine (PD), stabilimento utilizzatore dell'IZS delle Tre Venezie.

La sperimentazione è stata eseguita secondo le linee guida previste dalla normativa italiana sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (D.Lgs. 116/92) e il progetto è stato sottoposto all'approvazione preventiva del Ministero della

Salute. Gli animali sono stati stabulati e allevati nel rispetto delle linee guida europee sul benessere animale.

Gli animali sono stati divisi in tre gruppi, ciascuno comprendente 6 soggetti (Tab 4.2) e poi collocati in box multipli (comprendenti ciascuno 3 bovini) provvisti di pavimentazione con lettiera permanente. La suddivisione è avvenuta sulla base del peso iniziale degli animali per ottenere la maggior omogeneità possibile tra i diversi gruppi e all'interno di ciascun box.

Tabella 4.2. Suddivisione dei bovini nei tre gruppi di trattamento.

<i>GRUPPO</i>	<i>TRATTAMENTO</i>
<i>K</i>	Placebo
<i>D</i>	Desametazone
<i>DE</i>	Desametazone + Estradiolo

Il DES (gruppo D) è stato somministrato, *per os*, alla dose di 0,75 mg/capo/die di principio attivo diluiti in 0,5 L/capo d'acqua. Il trattamento si è protratto per 43 giorni consecutivi ed è stato sospeso il giorno prima della macellazione.

Al gruppo DE è stato somministrato il DES come descritto sopra e l'E2 è stato somministrato per via intramuscolo, alla dose di 20 mg/capo di principio attivo, rispettivamente il 1°, 15° e 30° giorno dall'inizio della sperimentazione. Gli animali di controllo (gruppo K) non hanno ricevuto alcun trattamento (Fig. 4.2).

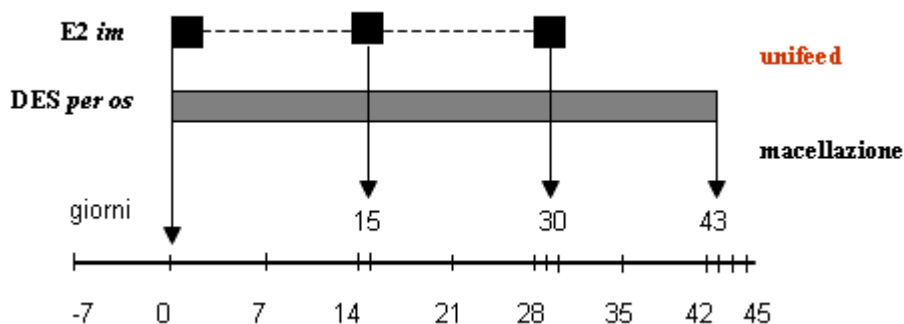


Figura 4.2. Schema del trattamento.

Preparazione dei microsomi epatici

I microsomi sono stati preparati come descritto precedentemente (Capitolo 2). La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo di Lowry *et al.* (1951), utilizzando BSA come standard.

Attività enzimatica

L'idrossilazione del TST (250 μM) in posizione 2 β , 16 β e 6 β è stata determinata con il metodo HPLC descritto nel capitolo 3.

Immunoblotting

Aliquote di proteine microsomiali (30 μg) sono state separate in 10% SDS-PAGE e trasferite su membrane di nitrocellulosa (Laemmli, 1970; Towbin *et al.*, 1979).

Le membrane sono state prima incubate con monoclonali anti-CYP3A1/2 di ratto (diluizione 1:500). Poi, sono state incubate con anticorpi di pecora anti IgG di topo (diluizione 1:5000) coniugati con perossidasi.

La rilevazione delle bande è stata effettuata utilizzando un kit di chemiluminescenza (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Pierce Chemical, Rockford, IL). L'analisi densitometrica è stata effettuata utilizzando il software ImageJ 1.34s.

Due ulteriori campioni, costituiti da ratti di controllo e indotti desametasone, sono stati fatti correre su minigel per permettere l'analisi densitometrica dei risultati e come *marker* molecolari.

Analisi di dati

Le curve standard e di calibrazione sono state calcolate utilizzando un'analisi di regressione lineare con il metodo dei minimi quadrati; pendenze, intercette e coefficienti di regressione lineari (r^2) sono stati determinati per ciascuna curva (Microsoft Excel, 2000).

Per l'analisi statistica, è stato applicato il test ANOVA. In caso di variazioni significative è stato eseguito il *post-test* Tukey (GraphPad InStat, versione 3.0; San Diego, CA, USA). Il livello di significatività è stato posto a $p < 0,05$. I dati ottenuti sono

stati inoltre oggetto di analisi per l'identificazione degli *outliers* (valori che si discostano dagli altri appartenenti allo stesso gruppo o per errori umani o per diversità biologica e quindi appartenenza ad una diversa popolazione) mediante l'utilizzo del test statistico di Grubbs, chiamato anche metodo *extreme studentized deviate*.

4.2 Risultati

Attività enzimatica

I risultati ottenuti hanno evidenziato un'induzione statisticamente significativa nelle attività di 6 β - e 16 β -OHT in D e DE vs K ($p < 0,05$) e nell'attività di 2 β -OHT in D e DE vs K ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, rispettivamente; Fig. 4.3).

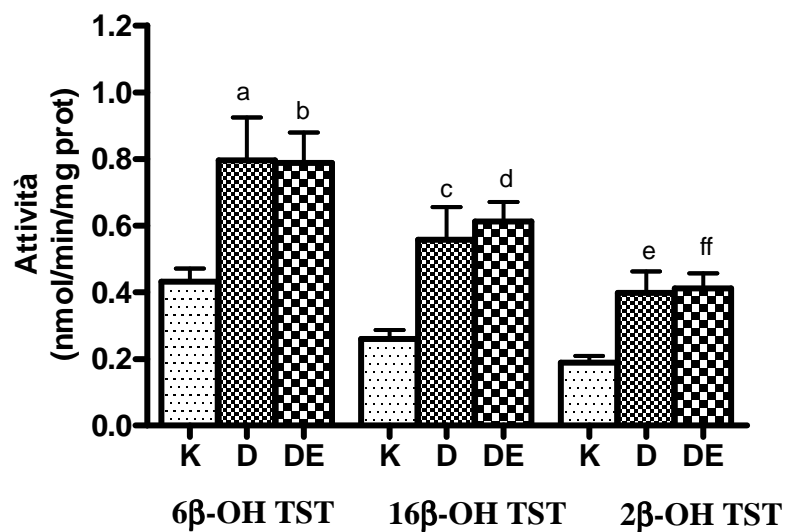


Figura 4.3. Attività di idrossilazione del TST in microsomi epatici di bovini indotti con DES e DES+E2 (K: controllo; D: bovini indotti con DES; DE: bovini indotti con DES+E2). I dati sono espressi come media \pm ES.

a, b, c, d, e: $p < 0,05$; ff: $p < 0,01$

Immunoblotting

Per quanto riguarda la proteina, è stato riscontrato un aumento dell'espressione di CYP3A in D e DE vs K ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, rispettivamente) (Fig. 4.4).

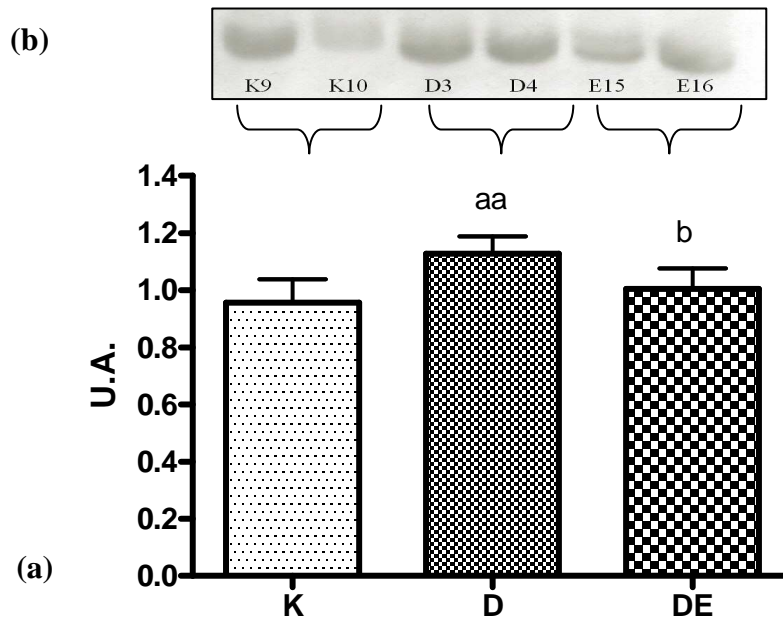


Figura 4.4. (a) Analisi densitometrica dell'immunolettroforesi di CYP3A, espressi come fold -change (media \pm ES; K: ratto di controllo; D: bovini indotti con DES; DE: bovini indotti con DES+E2); (b) Immunoblotting rappresentativo di CYP3A.

^{aa}: $p < 0,01$; ^b: $p < 0,05$

4.3 Discussione

Lo studio della sottofamiglia CYP3A è particolarmente interessante, non solo perché si tratta dell'isoforma maggiormente espressa nel fegato, ma anche per il suo contributo al metabolismo di un ampio gruppo di xenobiotici (You *et al.*, 2004).

Nell'uomo, corticosteroidi e DES vengono metabolizzati da CYP3A in 6 β -idrossi derivati, per ottenere metaboliti inattivi e velocemente eliminabili. Nel bovino, i corticosteroidi fisiologici sono simili a quelli umani; inoltre, il DES è frequentemente utilizzato nella comune pratica clinica veterinaria, spesso co-somministrato con altri farmaci. Dunque, anche nel bovino CYP3A potrebbe avere un ruolo nelle potenziali e significative a livello terapeutico interazioni tra farmaci. Ciò sarebbe di particolare interesse per quei glucocorticoidi utilizzati a scopo illecito nell'allevamento bovino come promotori della crescita (PdC), essenzialmente per la scarsità di dati riguardanti la possibile modulazione dell'espressione e della regolazione di CYP3A. Nel presente studio dunque, sono stati valutati gli effetti del trattamento con DES da solo o in associazione con l'estradiolo.

Dai risultati ottenuti nel capitolo 3, non solo sono state confermate definitivamente le attività di 6 β -e 2 β -OHT come *marker* per la valutazione dell'attività di CYP3A nel fegato di bovino, ma è stato anche dimostrato che il 16 β -OH TST è un substrato *marker* specifico per tale isoforma. Più volte infatti è stata sottolineata l'importanza di utilizzare dei substrati specifici per valutare l'attività enzimatica al fine di ottenere dei dati accurati da correlare con quelli di espressione genica e proteica.

E' stata dunque evidenziata un'induzione dell'attività catalitica di CYP3A nei gruppi D e DE, confermando quanto riportato in letteratura per l'uomo (McCune, 2000). I risultati ottenuti in termini di attività enzimatica sono stati anche avvalorati dall'analisi densitometrica dell'Immunoblotting, che ha mostrato un aumento significativo nell'espressione dell'apoproteina in D e DE vs K ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, rispettivamente). Si è poi indagato se la modulazione osservata a livello post-trascrizionale fosse mantenuta anche a livello pre-trascrizionale e per quanto riguarda i dati di espressione genica di CYP3A4-like, è stata evidenziata una modulazione in senso positivo nel trattamento con il solo DES, ma significativa soltanto nel gruppo DE (Giantin *et al.*, 2010).

Per quanto riguarda i recettori coinvolti nella regolazione dell'espressione di CYP3A, è stato evidenziato un aumento significativo dell'espressione di CAR e RXR α

nel gruppo DE; per quanto riguarda CAR in DE vs D e per quanto riguarda RXR α in DE vs K ($p < 0,05$ in entrambi i casi; Giantin *et al.*, 2010). A tal proposito, Kawamoto *et al.* (2000) hanno dimostrato infatti che in colture primarie di epatociti di topo il recettore CAR può essere attivato dal 17 β -estradiolo, ed in più Kiyosawa *et al.* (2007) hanno evidenziato che in ratti immaturi ovariectomizzati, composti con attività estrogeno-simile, sono in grado di modulare l'espressione genica per mezzo dell'attivazione di CAR e PXR.

Infine, il GR e il recettore per gli estrogeni (ER), i due recettori steroidei coinvolti nel meccanismo di azione e nella regolazione di queste stesse molecole, sono stati indotti dal trattamento con i due composti. GR è stato modulato nel gruppo DE vs D ($p < 0,05$), mentre ER nel gruppo DE vs K ($p < 0,05$) e nel gruppo DE vs D ($p < 0,01$; Giantin *et al.*, 2010)

Un recente studio ha riportato che i recettori GR ed ER, importanti per il loro ruolo in condizioni fitopatologiche, possono interagire con un meccanismo di *cross-talk*, anche se il meccanismo molecolare alla base di questo processo non è ancora ben chiaro: gli autori hanno evidenziato che il 17 β -estradiolo può avere proprietà antinfiammatorie paragonabili a quelle dei glucocorticoidi e che antagonisti specifici per ER sono in grado di attenuare gli effetti antinfiammatori del DES in ratti ovariectomizzati (Cuzzocrea *et al.*, 2007).

E' importante sottolineare che il DES agisce secondo un processo bifasico: a concentrazioni nanomolari, il CYP3A4 viene indotto indipendentemente dallo xenobiotico grazie all'attivazione GR-mediata di PXR; a concentrazioni micromolari, invece, il DES lega e attiva il PXR, che a sua volta induce il CYP3A4 per la presenza di alte concentrazioni del ligando specifico (Pascussi *et al.*, 2003). Il DES pertanto interviene in maniera duplice nella regolazione dell'espressione del CYP3A: controllando l'espressione del PXR, in condizioni fisiologiche, tramite GR ed attivando il PXR in condizioni di stress o di somministrazione esogena di farmaco (Pascussi *et al.*, 2003; El Sankary *et al.*, 2002). Spesso inoltre gli effetti del DES non risultano univoci; sono state infatti riportate differenze ascrivibili alla tipologia di trattamento (cocktail o singolo principio attivo), alla dose, alla durata del trattamento nonché alla via e alla modalità di somministrazione (sottocutanea, intramuscolare o *per os*). Per quanto riguarda CYP3A, esperimenti condotti nel laboratorio hanno ad esempio evidenziato come nel vitellone il trattamento con il solo DES *per os* alla dose di 0.75 mg/capo/giorno

per 54 giorni non determini variazioni di rilievo (Giantin *et al.*, 2010); per via intramuscolare invece alla dose di 1,32 g/capo per due volte alla distanza di 21 giorni è stato evidenziato un *trend* all'inibizione (in termini sia di espressione genica di CYP3A quanto di attività catalitica CYP3A-dipendente; Giantin *et al.*, 2010 e Capolongo, dati personali). Inoltre, se la somministrazione avviene *per os* alla stessa dose, ma con modalità e per tempi diversi, si è riscontrata tanto un'assenza di effetto (risultati sopracitati) quanto un'induzione (dopo 43 giorni di trattamento e distribuzione del DES nell'unifeed; presenti risultati e Giantin *et al.*, 2010).

I risultati ottenuti hanno confermato che CYP3A viene modulato dal trattamento con DES e l'associazione DES+estradiolo; tale modulazione è stata evidenziata come un trend all'induzione mantenuto sia a livello pre-trascrizionale che post-trascrizionale.

Emerge comunque la necessità, per quanto riguarda le specie di interesse veterinario, di effettuare degli studi *in vitro/in vivo* volti a chiarire il meccanismo d'azione, il destino metabolico e la distribuzione del DES (ma più in generale dei promotori della crescita, specie se somministrati in associazione), con particolare riferimento alle isoforme di citocromo P450 metabolismo che sembrano essere modulate dal trattamento con tali sostanze. Tali studi sono necessari anche per valutare il rischio potenziale per il consumatore per la presenza di residui non controllati nei tessuti edibili.

b) ESPERIMENTO EPATOCITI BOLDENONE E ADD

4.4 Materiali e metodi

Reagenti e composti chimici

4-Androsten-2 β , 17 β -diol-3-one, (2 β OH-TST), 4-androsten-16 β , 17 β -diol-3-one (16 β OH-TST), 4-androsten-6 β , 17 β -diol-3-one (6 β OH-TST), 4-androsten-17 β - OL 3-one (TST) sono stati acquistati dalla Steraloids (Newport, RI, USA).

Acetonitrile, metanolo e diclorometano (*HPLC grade*) sono stati acquistati dalla Mallinckrodt-Baker (Milano, Italia).

Tutti gli altri reagenti, sali (*analytical grade*) e solventi (*HPLC grade*) sono stati acquistati dalla Mallinckrodt-Baker, o dalla Sigma Aldrich.

Gli anticorpi monoclonali anti-CYP3A1/2 di ratto erano un dono del Dr. H.V. Gelboin National Institute of Health and Cancer (Bethesda, Maryland, USA), mentre gli anticorpi di pecora anti-IgG di topo coniugati con perossidasi di cavallo erano della Chemicon International, (Prodotti Gianni, Milano, Italia). Tutti gli altri reagenti per l'Immunoblotting erano *molecular biology grade*.

Preparazione dei microsomi dagli epatociti

I microsomi sono stati ottenuti da colture primarie di epatociti di bovino incubate per 24 h con BOLD 100 μ M (concentrazione finale), ADD 100 μ M e BOLD:ADD 90:10 μ M, rispettivamente. La preparazione è stata condotta come descritto nel capitolo 2 e la concentrazione proteica è stata determinata con il metodo BCA (Micro BCA *Protein Assay kit*", THERMO Scientific, Celbio, Milano, Italia).

Attività enzimatica

Idrossilazione del TST

L'idrossilazione del TST (250 μ M) in posizione 2 β , 16 β e 6 β è stata misurata nei microsomi ottenuti da epatociti incubati con PdC per 24 h con il metodo HPLC descritto nel capitolo 3.

Espressione proteica

SDS-PAGE e Immunoblotting

Aliquote di proteine microsomiali (30 µg) ottenute dagli epatociti dopo 24 h sono state separate in 10% SDS-PAGE e trasferite su membrane di nitrocellulosa (Laemmli, 1970; Towbin *et al.*, 1979). Su ciascun minigel è stato caricato un campione ulteriore: proteine microsomiali ottenute dal fegato di ratti di controllo (non trattati).

Le membrane sono state prima incubate con anticorpi monoclonali anti-CYP3A1/2 di ratto (diluizione 1:500). Poi, sono state incubate con degli anticorpi di pecora anti-IgG di topo coniugati con perossidasi (diluizione 1:5000).

La rilevazione delle bande è stata effettuata utilizzando un kit di chemiluminescenza (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Pierce Chemical, Rockford, IL). L'analisi densitometrica è stata effettuata utilizzando il software ImageJ 1.34s.

Analisi di dati

Le curve standard e di calibrazione sono state calcolate utilizzando un'analisi di regressione lineare con il metodo dei minimi quadrati; pendenze, intercette e coefficienti di regressione lineari (r^2) sono stati determinati per ciascuna curva (Microsoft Excel, 2000).

Per l'analisi statistica, è stato applicato il test ANOVA. In caso di variazioni significative è stato eseguito il *post-test* Tukey (GraphPad InStat, versione 3.0; San Diego, CA, USA). Il livello di significatività è stato posto a $p < 0,05$. I dati ottenuti sono stati inoltre oggetto di analisi per l'identificazione degli *outliers* (valori che si discostano dagli altri appartenenti allo stesso gruppo o per errori umani o per diversità biologica e quindi appartenenza ad una diversa popolazione) mediante l'utilizzo del test statistico di Grubbs, chiamato anche metodo *extreme studentized deviate*.

4.5 Risultati

Idrossilazione del TST

I risultati ottenuti hanno evidenziato un trend inibitorio negli epatociti incubati con promotori di crescita rispetto a K. In particolare, le attività di 6 β e 16 β OHT sono state inibite in ADD (A) e BOLD (B) vs K mentre l'attività di 2 β -OHT in A vs K ($p < 0,05$; Fig. 4.5).

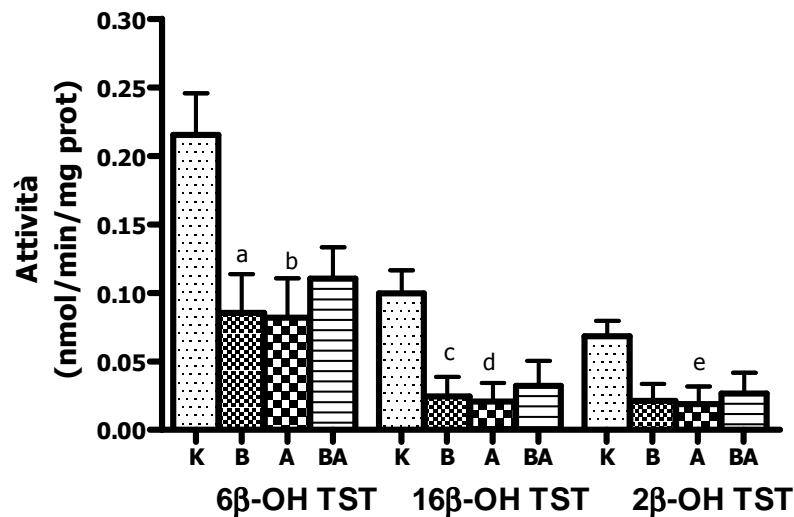


Figura 4.5. Attività di idrossilazione del TST con microsomi epatici di colture primarie di epatociti di bovino esposti a BOLD e ADD (K: controllo; B: boldenone; A: ADD; BA: boldenone+ADD). I dati sono espressi come media \pm ES di due colture.

a,b,c,d,e : $p < 0,05$

Immunoblotting

Per quanto riguarda l'espressione dell'apoproteina, non è stata riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa nell'espressione di CYP3A (Fig. 4.6).

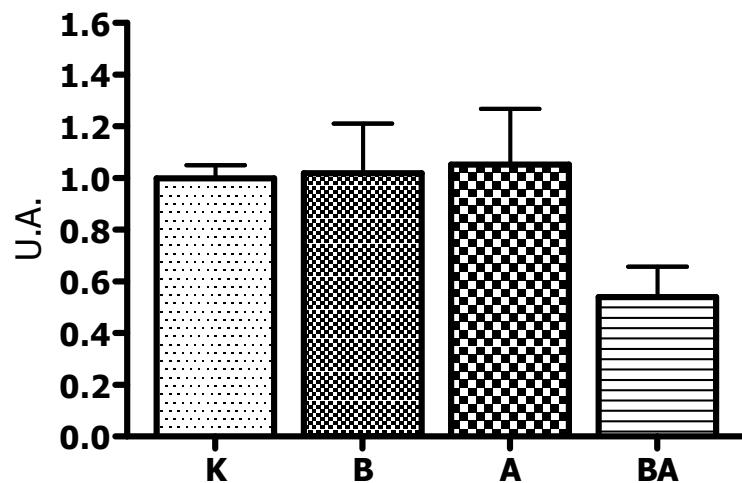


Figura 4.6 Analisi densitometrica dell' Immunoblotting di CYP3A (K: controllo; B: boldenone; A: ADD; BA: boldenone+ADD). I dati sono espressi come $media \pm ES$ in Unità Arbitrarie e comparati con le piastre di controllo..

4.6 Discussione

Per quanto riguarda gli animali da reddito, sono stati condotti diversi studi relativi all'ottenimento di colture primarie di epatociti; tra i più recenti si possono ricordare quelli relativi al suino e al coniglio (Eeckhoutte *et al.*, 2002; Sinclair *et al.*, 2005; Schnelzer *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2003).

In questo studio, sono state utilizzate colture primarie di epatociti di bovino per valutare gli effetti sul metabolismo di alcuni steroidi anabolizzanti, BOLD e ADD, impiegato a scopo illecito nel bovino da carne.

Come dimostrato dai valori di lattato deidrogenasi (LDH) relativamente bassi ($16,9 \pm 4,2$ %) e dall'alta percentuale di vitalità ($88,0 \pm 4,2$ %; Giantin, dati personali), questo metodo *in vitro* sembrerebbe garantire l'ottenimento di cellule adatte per studi di metabolismo; in relazione a ciò, è stata valutata la capacità biotrasformativa delle presenti colture di epatociti di bovino in termini di attività di CYP3A che presumibilmente potrebbe essere coinvolto nella biotrasformazione di BOLD come avviene per il TST. Si è voluto dunque indagare se esiste una regolazione di CYP3A in seguito all'esposizione a BOLD e ADD a livello pre- e/o post-trascrizionale. Inoltre, un'altra applicazione è stata quella di utilizzare questo sistema *in vitro* per studi di metabolismo in LC/MS-MS volti ad identificare *marker in vivo* di trattamento (Gallina *et al.*, dati personali).

Per quanto riguarda le attività di idrossilazione del TST è stata osservata un'inibizione significativa seguita però dall'assenza di differenze significative nell'espressione proteica dopo 24 h di incubazione con PdC. Tali risultati sembrerebbero dunque suggerire un effetto di queste sostanze a livello post-traduzionale. Una possibile spiegazione potrebbe essere dovuta alle alte dosi utilizzate potenzialmente tossiche nei confronti dell'attività enzimatica. I risultati del test di rilascio dell'LDH e la vitalità cellulare sembrerebbero però non suggerire effetti citotossici. Probabilmente, nel caso di utilizzo di questi sistemi *in vitro* per studi di metabolismo potrebbe essere utile stimare anche altri indici di citotossicità come ad esempio la valutazione della deplezione delle quantità di glutazione ridotto (GSH) che è un indice di stress ossidativo e il test MTT un saggio colorimetrico standard per la misurazione dell'attività degli enzimi che riducono l' MTT a formazano, che può essere considerato un indice di danno mitocondriale. Infine, potrebbe essere utile anche

misurare la sintesi proteica totale valutando la capacità da parte degli epatociti di incorporare *in vitro* aminoacidi reattivi in proteine neo-sintetizzate, aggiungendo un aminoacido marcato al mezzo di incubazione. Un caso di effetto inibitorio/tossico di alte dosi di sostanze inducenti è riportato da Kostrubsky *et al.* (1999) che hanno utilizzato epatociti di uomo per studiare l'induzione del sistema citocromo P450 evidenziando la necessità di effettuare degli studi dose-risposta in un ampio *range* di concentrazioni delle sostanze utilizzate e di valutarne la tossicità.

Un'altra possibile spiegazione potrebbe essere un'inibizione da eccesso di substrato, comportamento che è stato visto nell'uomo per quanto riguarda il TST e la sua idrossilazione in posizione 6 β (Lin *et al.*, 2001); come è già stato accennato il BOLD differisce dal TST solo per la presenza di un doppio legame in posizione 1 e quindi non si può escludere che il BOLD possa essere substrato per CYP3A ed avere un comportamento simile al TST contribuendo dunque all'effetto inibitorio dovuto alla presenza di substrato in eccesso.

Infine, presunto un probabile ruolo di CYP3A nel metabolismo del BOLD anche nel bovino come avviene per l'uomo, data la similarità delle due molecole, BOLD presente in elevate concentrazioni potrebbe legarsi in maniera irreversibile al sito attivo di CYP3A; in questo modo, ridurrebbe il numero di molecole di enzima con il sito attivo libero per accogliere il TST, provocando come conseguenza una riduzione dell'attività di idrossilazione del TST. Ad esempio, Moslemi e Seralini (1997) hanno dimostrato che diversi steroidi analoghi all'androstenedione hanno evidenziato effetti di inibizione competitiva nei confronti del metabolismo dell'androstenedione da parte dell'aromatasi di cavallo e di uomo.

Sono stati comunque indagati anche gli effetti di BOLD e ADD a livello pre-trascrizionale per quanto riguarda i recettori nucleari (CAR, PXR, RXR α) coinvolti nella regolazione dell'espressione di CYP3A4-*like* e CYP3A4-*like* stesso dopo 3 e 6 h di incubazione con i PdC (Giantin, dati personali). Nessuna differenza significativa è stata evidenziata suggerendo che al contrario dei glucocorticoidi come il DES, androgeni come BOLD e ADD non agiscono con meccanismi mediati dall'azione di tali recettori ed inoltre non modulano CYP3A a livello pre-trascrizionale. Infine è stato valutato il pattern di espressione anche del recettore per gli androgeni (AR; Giantin, dati personali) ed anche in questo caso non sono state evidenziate differenze statisticamente significative anche se nel trattamento con il BOLD un lieve effetto inibitorio è stato riscontrato. E' importante comunque sottolineare che nella maggior parte dei tessuti

target e delle linee cellulari contenenti il recettore AR, l'mRNA di AR subisce *down-regulation* in risposta agli androgeni (Burnstein *et al.*, 1995). Tali autori hanno infatti dimostrato che esistono delle sequenze autoregatorie come elementi intragenici in AR coinvolte nella *down-regulation* ligando-dipendente.

I risultati ottenuti hanno dunque evidenziato una modulazione in termini di inibizione di CYP3A a seguito dell'esposizione a BOLD e ADD; tale modulazione però si evidenzia solamente a livello post-traduzionale in termini di attività CYP3A-dipendente. Emerge comunque l'importanza di ottimizzare le concentrazioni di steroidi nel medium di coltura di sistemi epatici *in vitro* per lo studio dell'induzione enzimatica, includendo un'ampia misura dose-risposta sia della citotossicità che delle attività CYP-dipendenti.

4.7 Conclusioni generali

Nel complesso, i risultati ottenuti in questi due esperimenti hanno confermato l'applicabilità del metodo HPLC messo a punto e del substrato TST per la valutazione dell'attività CYP3A-dipendente. E' stata inoltre confermata la modulazione da parte di estrogeni, corticosteroidi ed anabolizzanti dell'espressione e della regolazione degli enzimi citocromo P450-dipendenti.

I risultati ottenuti hanno comunque evidenziato la necessità di effettuare degli studi volti a comprendere più approfonditamente i meccanismi di regolazione tramite i quali queste sostanze agiscono a livello pre- e post-traduzionale nelle specie di interesse veterinario.

CAPITOLO 5

**Valutazione dell'attività di CYP1A nel fegato di
Zosterisessor ophiocephalus come biomarcatore di
inquinamento nella laguna di Venezia.**

5.0 Introduzione

La laguna di Venezia è un ecosistema di transizione fragile caratterizzato da una rete estensiva di canali, paludi di acqua salata, isole, ed è stata abitata fin dal XII secolo. Diverse interazioni umane con l'ambiente nei secoli hanno determinato una situazione critica per la sua sopravvivenza, complicata da problemi di inquinamento, che si sono sviluppati durante gli ultimi decenni.

A seguito dello sviluppo industriale dell'entroterra della Laguna dopo la Seconda Guerra Mondiale, sono state definite numerose misure di protezione contro l'inquinamento, tra le quali la più recente e completa è il Decreto Ministeriale "Ronchi-Costa" del 1998. Sono stati stabiliti limiti stringenti per diversi parametri delle acque e dei sedimenti, basati essenzialmente su valori di linee guida di qualità e sul principio di precauzione, e le quantità permesse di scarichi industriali nelle acque della Laguna sono state progressivamente ridotte.

Uno degli obiettivi infatti dell'attuale legislazione italiana, tenendo conto delle Direttiva EC 2000/609, è di stabilire lo stato ecologico delle acque costiere.

Inoltre, la Convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti, stabilita in occasione di un convegno tenutosi a Stoccolma dal 22 al 23 maggio 2001, si pone come obiettivo l'eliminazione e la diminuzione dell'uso di alcune sostanze nocive per la salute umana e per l'ambiente definite Inquinanti Organici Persistenti (POP). I POP sono composti chimici con proprietà tossiche che si propagano nell'aria, nell'acqua o nel terreno e, a causa della loro scarsa degradabilità, risiedono nell'ambiente per lungo tempo. Il documento riguarda 12 inquinanti principali: aldrin, clordano, dicloro difenil tricloroetano, dieldrin, endrin, eptacloro, mirex, toxafene, esaclorofene e tre intere classi di composti: i policlorobifenili (PCB), le policlorodibenzodiossine (PCDD) o più comunemente detta diossina) e i policlorodibenzofurani (PCDF). La Convenzione è entrata in vigore il 17 maggio 2004; l'Italia ha firmato ma non ha ratificato.

Di conseguenza, una crescente attenzione pubblica sulla tutela biologica ed ecologica della Laguna ha determinato un interesse sempre maggiore per studi di monitoraggio ambientale. Negli ultimi 20 anni, sono stati sviluppati una serie di progetti internazionali, nazionali e regionali con l'obiettivo di valutare lo "stato di salute" della Laguna e per meglio comprendere le interazioni tra i suoi comparti abiotici e biotici (ad

esempio il progetto UNESCO “The Venice Lagoon Ecosystem”, 1990-1992, Lasserre e Marzollo, 2000).

Nel corso di diverse campagne di monitoraggio, sono stati raccolti dei campioni di sedimenti superficiali (0÷15 cm) ed è stato calcolato il fattore di arricchimento (EF), cioè la somma dei rapporti tra le concentrazioni di PCB/PCDD-F ed esaclorobenzene nei sedimenti superficiali e il corrispondente valore pre-industriale (concentrazione di riferimento) desunto dalle carote di sedimento (Guerzoni *et al.*, 2004).

La mappa riportata in Fig. 5.1 evidenzia gli “hot spots” (EF>12) ovvero le aree in cui i sedimenti sono particolarmente arricchiti in POP.

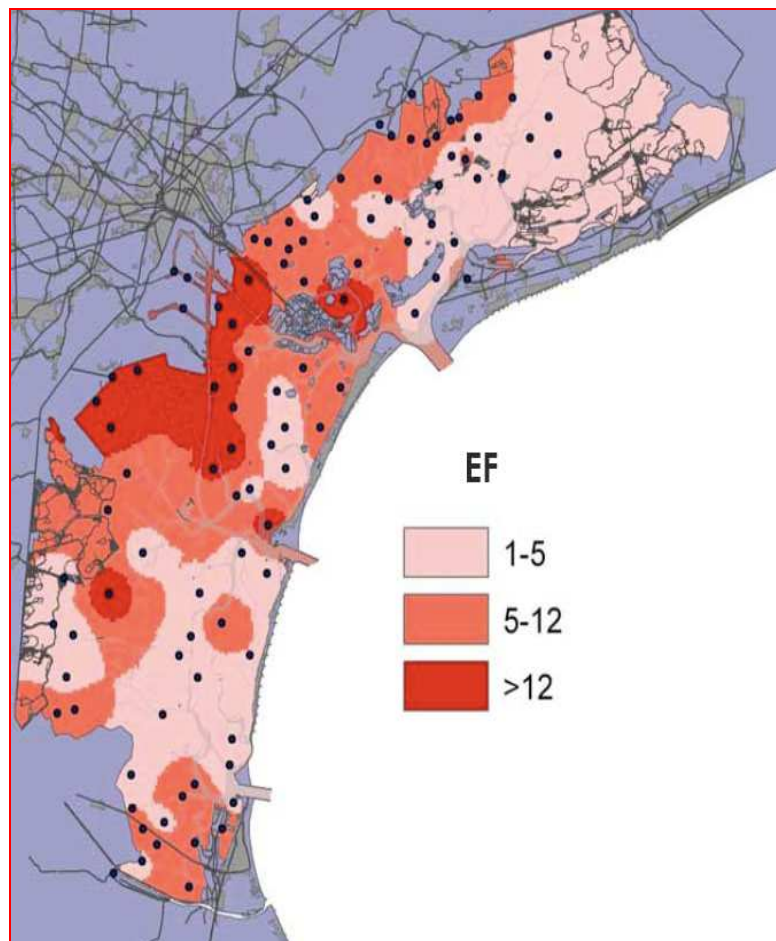


Figura 5.1. Mappa delle concentrazioni dei POP nei sedimenti.

La Laguna di Venezia si divide in aree in cui è ammessa la pesca sia di molluschi che di pesci, e di aree in cui è vietata: la suddivisione in aree viene stabilita, con cadenza triennale, da Decreti Regionali e Ordinanze Comunali emanati a seguito di operazioni di monitoraggio svolte dall'ULSS 12 di Venezia in varie zone della Laguna. I siti in cui è possibile pescare e destinare poi i prodotti ittici al consumo umano devono avere concentrazioni di POP inferiori a 14 TEQ/kg (TWI), proposti dalla Convenzione di Stoccolma e devono rispettare i limiti microbiologici imposti dal regolamento (CE) 2073/2005. Attualmente, rispondono a questi parametri in particolare l'area più a nord della Laguna (Laguna Nord) e l'area a sud (Laguna Sud). I siti in cui è vietato pescare, poiché superano i limiti di legge per i contaminanti chimici e microbiologici, comprendono l'area che bagna Porto Marghera e quella in cui sfociano i canali industriali.

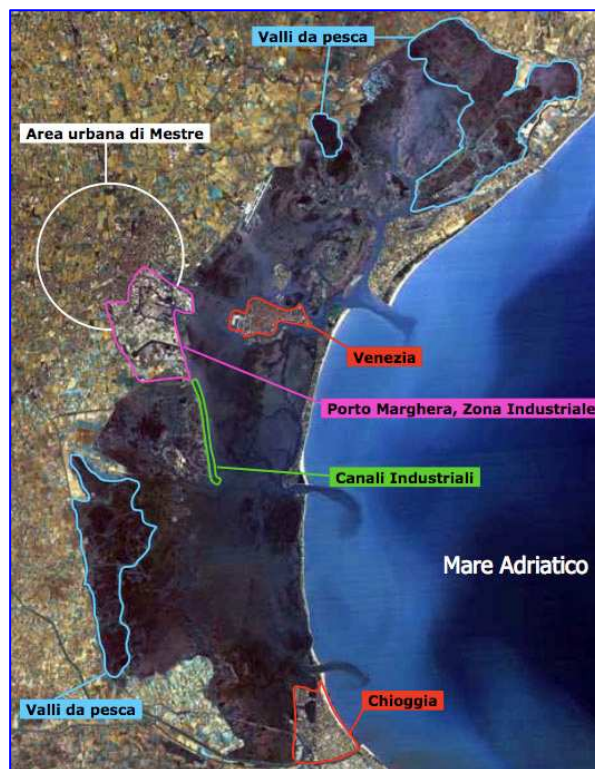


Figura 5.2. *Suddivisione della Laguna di Venezia in aree in cui è ammessa la pesca sia di molluschi che di pesci ed aree in cui è vietata.*

Il presente lavoro si inserisce in un Progetto Regionale “Bioindicatori di inquinamento ambientale come strumento di tutela del territorio e possibili ricadute di salute pubblica”, i cui obiettivi sono stati quelli di valutare il possibile impiego di api, organismi acquatici (pesci bentonici e molluschi) come bioindicatori di esposizione a contaminanti ambientali; individuare possibili biomarcatori (BM) di esposizione, risposta e/o tossicità utili nella valutazione del rischio ecologico; verificare l’eventuale correlazione tra incidenza di neoplasie dei piccoli animali e tossicogenomica ambientale.

Recentemente, è stato dimostrato che i BM sono molto utili per rilevare dei cambiamenti biologici precoci nell’inquinamento ambientale. Si definiscono come cambiamenti in processi biochimici (ad esempio l’attività enzimatica) indotti da xenobiotici e misurabili. Uno dei BM più comunemente usati nei pesci è l’induzione del sistema delle monossigenasi a funzione mista MFO. In particolare la presenza di induzione nell’attività di etossiresorufina-O-deetilasi (EROD) nei pesci è un indicatore dell’esposizione dell’organismo a composti potenzialmente tossici, come ad esempio i PCB e gli idrocarburi aromatici policiclici (IPA; Burgeot *et al.*, 1996).

E’ stata utilizzata come specie sentinella *Zosterisessor ophiocephalus* (Pisces, Teleostei, Gobiidae), un pesce osseo appartenente alla famiglia dei Gobiidae e all’ordine dei Perciformi e piuttosto comune nelle lagune dell’alto Adriatico.

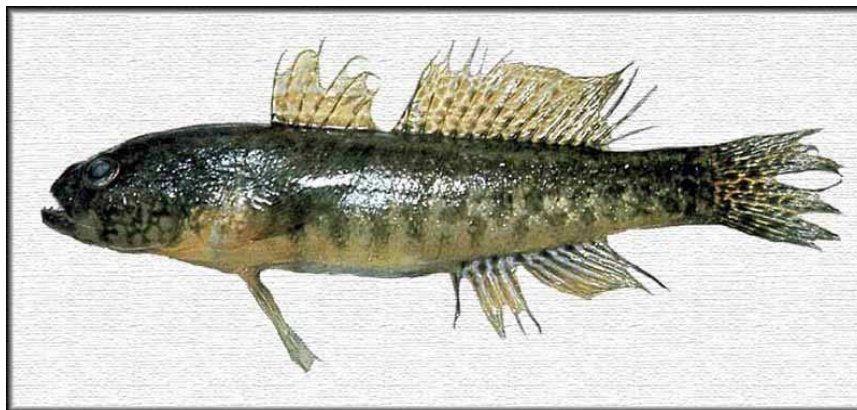


Figura 5.3. Zosterisessor ophiocephalus.

Zosterisessor ophiocephalus è una specie territoriale, costruttore di nidi, strettamente connessa ai sedimenti del fondo, e ampiamente distribuita nell'ambiente lagunare.

Il periodo riproduttivo va dalla fine di febbraio a maggio. I maschi si dividono a seconda della dimensione e della tattica riproduttiva in maschi di piccola taglia, gli *sneakers*, e maschi di grossa taglia, i territoriali. In particolare, i maschi territoriali scavano delle piccole tane sotterranee dove la femmina deposita le uova stando a testa in giù e attaccandole alla volta della tana. Gli *sneakers* invece investono prevalentemente nella produzione di sperma e intrufolandosi nelle tane dei maschi territoriali, fecondano le uova depositate. Queste tane riproduttive si aprono all'esterno con due fori circolari del diametro di circa 7 cm., situati più o meno a mezzo metro l'uno dall'altro; le due gallerie confluiscono in una camera cupuliforme alta 10-15 cm e ampia 20-30 cm. Le pareti della camera sono rivestite da una pellicola di muco battericida escreta dal maschio territoriale. Le due gallerie, oltre alla possibilità di fuga, permettono un continuo ricambio d'acqua, garantendo una migliore ossigenazione delle uova (Fig. 5.4).

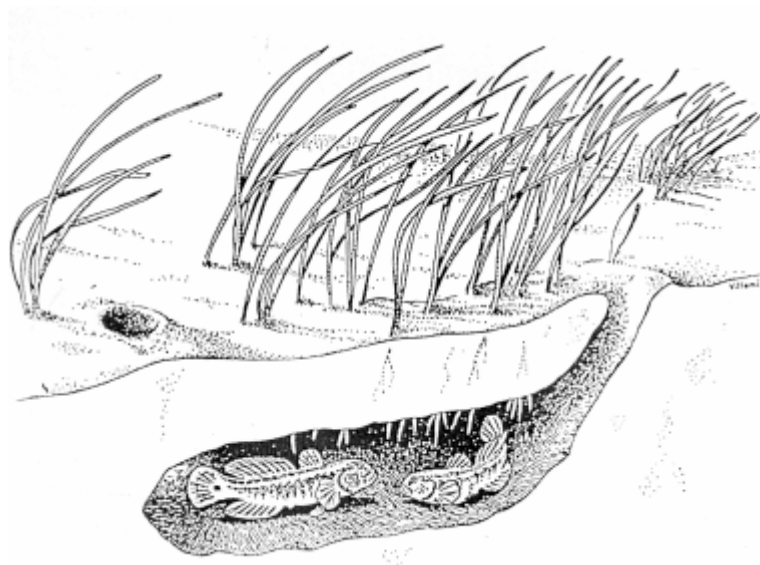


Figura 5.4. Esempio di tana riproduttiva.

Questa specie è stata utilizzata come organismo sentinella per la valutazione della presenza di inquinanti acquatici principalmente per due motivi. Il primo, di carattere biologico, è che si tratta di una specie bentonica, che quindi vive a contatto con i fondali, dove è presente un maggior accumulo di contaminanti che precipitano a formare dei sedimenti (Hartl, 2002). Il secondo motivo è di carattere economico; questa specie suscita un discreto interesse commerciale, ha carni bianche e saporite e viene utilizzata come ingrediente principale di risotti e zuppe, quindi può rappresentare un rischio per la salute del consumatore, nel caso di contaminazione da sostanze tossiche e/o cancerogene.

Lo scopo del presente lavoro è stato valutare l'attività di EROD in *Zosterisessor ophiocephalus* che date le sue caratteristiche, può rappresentare un utile indicatore biologico dei livelli di stress ambientale presente nella Laguna di Venezia.

5.1 Materiali e metodi

Reagenti e composti chimici

Resorufina (RES) (purezza >99%), 7-etossiresorufina (ETR) (purezza >99%) e β -NADPH sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich (Milano, Italia). Il metanolo (*HPLC grade*) è stato acquistato dalla Carlo Erba (Vetrotecnica, Padova, Italia). Il glicerolo (99,5%) è stato acquistato dall'Invitrogen (Milano, Italia).

L'acqua è stata purificata da un sistema MILLI-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Tutti gli altri reagenti per la determinazione dell'attività catalitica (*analytical grade*) sono stati acquistati presso la Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

Animali

I pesci sono stati raccolti utilizzando delle nasse in aprile–maggio e ottobre–novembre 2008 in tre aree della Laguna di Venezia: Porto Marghera (PM), Valle di Brenta (VB) e Porto Canale (PC; Fig. 5.5).



Figura 5.5: Aree selezionate per la raccolta dei campioni.

I pesci raccolti sono stati suddivisi sulla base del sesso osservando il dimorfismo della papilla genitale (Miller, 1984) e sono stati misurati per quanto riguarda lunghezza totale (LT), lunghezza standard (LS), peso totale e peso del fegato. Il fegato è stato asportato chirurgicamente, lavato con KCl 0,15 M e conservato a -80°C. Sulla base della LS, i maschi sono stati divisi in *sneakers* ($\leq 13,5$ cm in primavera e $\leq 14,5$ cm in autunno) e maschi territoriali ($> 13,5$ cm in primavera e $> 14,5$ cm in autunno).

Infine, sono stati costituiti pool di tre individui ordinati in base al *Liver Somatic Index* (LSI) espresso come $[\text{peso del fegato}/\text{peso totale}] \times 100$.

Preparazione dei microsomi dal fegato di pesce

I microsomi sono stati preparati dal fegato di pesce come descritto per il bovino (capitolo 2), con l'aggiunta di una terza fase di centrifugazione a 105000 g per 45 min,

introdotta per eliminare al massimo la presenza di ossiemoglobina che avrebbe interferito con la determinazione della concentrazione proteica e quindi con l'analisi.

La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo BCA (Micro BCA *Protein Assay kit*®, THERMO Scientific, Celbio, Milano, Italia).

HPLC

L'analisi è stata effettuata utilizzando un sistema HPLC JASCO (Tokyo, Giappone) costituito da pompa (PU-980), degasatore (DG1580-53), autocampionatore (AS-1555), rivelatore fluorimetrico (FP-920) e un software cromatografico (JASCO-Chrompass ver.1.8, JASCO, Tokyo, Giappone). I campioni (100 µL) sono stati iniettati in una colonna LUNA C₁₈ (5 µm, 150 mm × 4.6 mm ID; Phenomenex, Bologna, Italia), dotata anche di una SecurityGuard (C₁₈, 4mm x 2 mm ID; Phenomenex, Bologna, Italia). La colonna è stata mantenuta a 23 ± 2 °C. L'eluizione isocratica è stata effettuata ad un flusso di 0,8 mL/min con tampone fosfato 25 mM (PBS; pH 7.0): metanolo (58:42, v/v). La RES è stata rilevata in fluorescenza a 530 nm (eccitazione) e a 580 nm (emissione).

Attività di EROD

E' stato messo a punto il protocollo di incubazione per la determinazione dell'attività di EROD nel fegato di *Zosterisessor ophiocephalus*; in particolare sono stati effettuati studi in funzione della concentrazione di proteina (0,2-1 mg/mL), del tempo di incubazione (5-20 min) e della concentrazione di substrato (1,25-10 µM).

L'incubazione conteneva ETR (5 µM), proteina microsomiale epatica di pesce (0,6 mg/mL), magnesio cloruro 0,1 M, β-NADPH 10 mM e PBS 0,1 M (pH 7.4) in un volume di 400 µL. Dopo una pre-incubazione di 1 min a 37°C, la reazione è stata avviata con l'aggiunta di β-NADPH e dopo 10 min a 37°C in un bagnetto termostato in agitazione (SW-21C, Julabo Labotechik, GMBH, Seelbach, Germania), è stata bloccata con l'aggiunta di 400 µL di metanolo freddo. I campioni sono stati agitati con vortex, tenuti in ghiaccio per 15 min e poi centrifugati a 13000 rpm per 20 min a 4°C (Centrifuga refrigerata Eppendorf 5810R, Milano, Italia). Il surnatante è stato trasferito in vials per l'analisi in HPLC.

Le concentrazioni di RES sono state determinate comparando le aree dei picchi della RES prodotta come metabolita con quelle della RES utilizzate per la curva di calibrazione. La velocità di formazione del metabolita è stata espressa come pmol di RES prodotta per min di tempo di incubazione e per mg di proteina microsomiale.

Analisi statistica

Le curve standard e di calibrazione sono state calcolate utilizzando un'analisi di regressione lineare con il metodo dei minimi quadrati; pendenze, intercette e coefficienti di regressione lineari (r^2) sono stati determinati per ciascuna curva (Microsoft Excel, 2000).

I dati di LSI e di LS sono stati analizzati per valutarne la distribuzione normale (Kolmogorov e Smirnov *normality test*) e l'omogeneità delle varianze (test di Levene). I risultati sono stati analizzati tramite ANOVA ad una via ed in caso di variazioni significative è stato applicato il post-test di Bonferroni. I dati di attività di EROD, trasformati in LOG, sono stati analizzati per valutare la distribuzione LOG-NORM (Kolmogorov e Smirnov *normality test*) e l'omogeneità delle varianze (test di Levene). I dati sono stati dunque analizzati utilizzando *General Linear Model-Univariate*. In caso di variazioni significative è stato eseguito il *post-test* Games-Howell per varianze non omogenee. Inoltre in presenza di interazioni significative, queste sono state analizzate tramite ANOVA ad una via ed utilizzando i contrasti che permettono di confrontare le media che sono rilevanti per gli effetti semplici.

GraphPad InStat 3.0 (San Diego, CA, USA) e SPSS 16.0 (Chicago, IL, USA) sono i software utilizzati per tutte le analisi statistiche.

5.2 Risultati

Biometria e LSI nei pesci

Il numero di pool (n), la lunghezza standard (LS) ed il *Liver Somatic Index* (LSI) dei Gobidi raccolti nelle aree di Porto Marghera, Valle di Brenta e Porto Canale sono riportati in Tab. 5.1.

Il LSI varia nei tre siti, mostrando un trend stagionale simile con i valori più elevati in ottobre-novembre e più bassi in aprile-maggio statisticamente significativo nelle femmine in tutti e tre i siti ($p < 0,001$) e nei maschi solo a Porto Marghera ($p < 0,001$).

Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra i gruppi per quanto riguarda i valori di LS.

Tabella 5.1. LS, LSI e numero di pool (n) per i tre siti (Porto Marghera, Valle di Brenta e Porto Canale).
I dati sono espressi come media \pm DS.

	LS (cm)			LSI (%)		
	F	S	M	F	S	M
PC						
Aprile-Maggio	12,89 \pm 0,99 (n=18)	11,95 \pm 0,86 (n=7)	15,8 \pm 1,25 (n=8)	2,26 \pm 0,58	2,30 \pm 0,74	1,66 \pm 0,35
Ottobre-Novembre	12,68 \pm 0,94 (n=14)	11,94 \pm 1,87 (n=13)	15,5 \pm 0,60 (n=5)	4,18 \pm 0,85 ^{aaa}	3,61 \pm 0,84	2,92 \pm 0,69
VB						
Aprile-Maggio	11,82 \pm 1,07 (n=19)	11,75 \pm 1,01 (n=6)	16,28 \pm 1,81 (n=6)	2,85 \pm 0,65	2,51 \pm 0,47	2,58 \pm 0,69
Ottobre-Novembre	12,64 \pm 1,62 (n=6)	11,21 \pm 1,39 (n=11)	16,21 \pm 0,94 (n=7)	4,38 \pm 0,40 ^{bbb}	3,51 \pm 0,75	3,02 \pm 0,81
PM						
Aprile-Maggio	13,13 \pm 1,25 (n=18)	11,59 \pm 1,66 (n=8)	16,84 \pm 1,58 (n=11)	2,71 \pm 0,50	3,32 \pm 0,85	2,21 \pm 0,57
Ottobre-Novembre	14,33 \pm 1,86 (n=8)	10,46 \pm 1,78 (n=5)	17,28 \pm 1,06 (n=20)	4,36 \pm 1,05 ^{ccc}	3,80 \pm 0,83	3,47 \pm 0,65 ^{ddd}

F: femmine; S: *sneakers*; M: maschi territoriali; PC: Porto Canale; VB: Valle di Brenta; PM: Porto Marghera
aaa,bbb,ccc,ddd: $p < 0,001$

Attività di EROD

I valori di attività di EROD dopo trasformazione in LOG (Fig. 5.6), sono stati analizzati statisticamente per valutare dunque l'effetto dei fattori sito, stagione, categoria e delle possibili interazioni sull'attività di EROD.

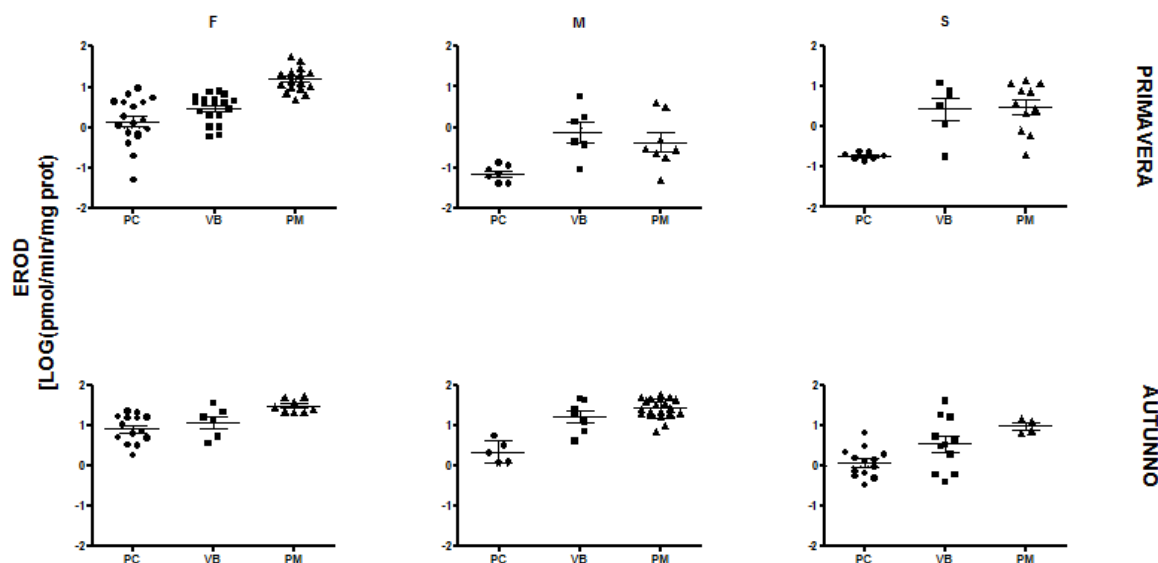


Figura 5.6. Scatter plot dei risultati dell'attività di EROD [$\text{LOG}(\text{pmol}/\text{min}/\text{mg prot})$; $\text{media} \pm \text{ES}$] ottenuti da campioni di sneakers (S), maschi (M) e femmine (F) raccolti dai siti di Porto Canale (PC), Valle di Brenta (VB) e Porto Marghera (PM) in primavera ed autunno.

E' stato ottenuto un effetto principale significativo per il fattore categoria, $F=55,3$, $p<0,001$. In particolare, i valori di attività di EROD ($\text{media} \pm \text{ES}$) nelle femmine [$0,76 \pm 0,07 \text{ LOG}(\text{pmol}/\text{min}/\text{mg prot})$] e nei maschi [$0,75 \pm 0,11 \text{ LOG}(\text{pmol}/\text{min}/\text{mg prot})$] erano significativamente più elevati rispetto agli sneakers [$-0,02 \pm 0,11 \text{ LOG}(\text{pmol}/\text{min}/\text{mg prot})$; $p<0,001$]. Un effetto principale significativo è stato ottenuto anche per il fattore sito, $F=65,2$, $p<0,001$. I valori di attività ($\text{media} \pm \text{ES}$) in Porto Marghera [$0,99 \pm 0,09 \text{ LOG}(\text{pmol}/\text{min}/\text{mg prot})$] erano significativamente più elevati rispetto a Porto Canale [$0,08 \pm 0,09 \text{ LOG}(\text{pmol}/\text{min}/\text{mg prot})$; $p<0,001$] e Valle di Brenta [$0,58 \pm 0,08 \text{ LOG}(\text{pmol}/\text{min}/\text{mg prot})$; $p<0,01$] e Valle di Brenta significativamente più elevati rispetto a Porto Canale ($p<0,001$). Anche per il fattore stagione si è ottenuto un

effetto principale significativo, $F=148,9$, $p<0,001$. I valori di attività di EROD (media \pm ES) in autunno [0,92 \pm 0,06 LOG(pmol/min/mg prot)] erano significativamente più elevati di quelli ottenuti in primavera [0,23 \pm 0,08 LOG(pmol/min/mg prot)].

Infine, le interazioni categoria*sito e categoria*stagione sono risultate significative ($F=3,9$, $p<0,01$ ed $F=5,4$, $p<0,01$, rispettivamente). Tali interazioni sono state rappresentate graficamente (Figg. 5.7 e 5.8). In Fig. 5.7, il plot indica che il trend di valori di attività di EROD era PM>VB>PC; nel gruppo delle femmine si evidenzia però una maggior differenza in termini di valori attività di EROD tra Porto Marghera e Valle di Brenta e minore tra Valle di Brenta e Porto Canale rispetto ai maschi. In Fig. 5.8 il plot evidenzia come in autunno i valori di attività di EROD fossero più elevati rispetto alla primavera; l'entità dell'effetto della stagione autunno nel gruppo di femmine però era inferiore rispetto ai maschi.

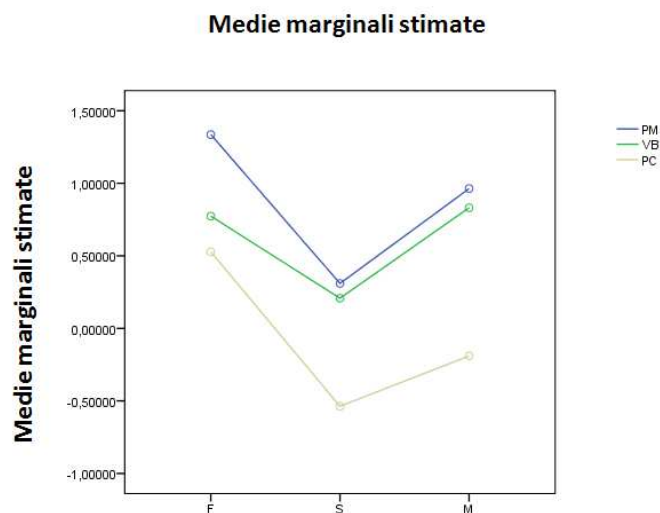


Figura 5.7. Grafico delle medie marginali stimate di attività di EROD [LOG(pmol/min/mg prot)] per l'interazione categoria*sito. Effetto del sito nelle diverse categorie. PM: Porto Marghera, VB: Valle di Brenta, PC: Porto Canale, F: femmine, S: sneakers, M: maschi.

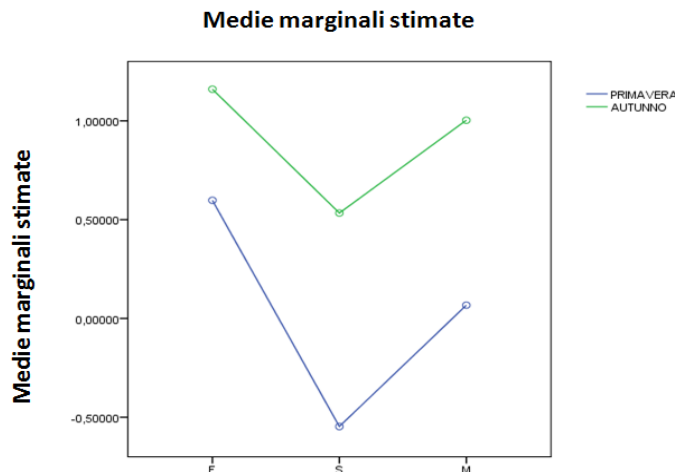


Figura 5.8. Grafici delle medie stimate marginali di attività di EROD [LOG(pmol/min/mg prot)] per le interazioni sito*stagione. Effetto della stagione nelle tre diverse categorie. PM: Porto Marghera, VB: Valle di Brenta, PC: Porto Canale, F: femmine, S: sneakers, M: maschi.

L'interpretazione dei plot è stata poi verificata con la statistica inferenziale, considerando gli effetti semplici principali.

In particolare sono stati confrontati i tre siti per ciascuna categoria di animali considerata (femmine, maschi e *sneakers*). I valori di attività di EROD nelle femmine (media±ES) erano significativamente più elevati in Porto Marghera [1,34±0,09 LOG(pmol/min/mg prot)] rispetto a Porto Canale [0,53±0,08 LOG(pmol/min/mg prot); $p<0,001$] e Valle di Brenta [0,77±0,10 LOG(pmol/min/mg prot); $p<0,001$]; nessuna differenza statisticamente significativa è stata evidenziata in Valle di Brenta vs Porto Canale. I valori di attività di EROD dei maschi (media±ES) in Porto Marghera [0,96±0,08 LOG(pmol/min/mg prot)] e Valle di Brenta [0,83±0,12 LOG(pmol/min/mg prot)] erano significativamente più elevati rispetto a Porto Canale [-0,19±0,13 LOG(pmol/min/mg prot); $p<0,001$ e $p<0,01$, rispettivamente]; nessuna differenza statisticamente significativa è stata evidenziata in Porto Marghera vs Valle di Brenta. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata evidenziata nei valori di attività degli *sneakers* (media±ES) tra Porto Marghera [0,31±0,13 LOG(pmol/min/mg prot)], Valle di Brenta [0,21±0,11 LOG(pmol/min/mg prot)] e Porto Canale [-0,54±0,10 LOG(pmol/min/mg prot)].

E' stato poi confrontato l'effetto delle due diverse stagioni (primavera ed autunno) per ciascuna categoria di animali considerata. Femmine, maschi e *sneakers*

evidenziavano valori di attività di EROD (media±ES) significativamente più elevati in autunno [1,16±0,09, 1,00± 0,09, 0,52± 0,09 LOG(pmol/min/mg prot), rispettivamente] rispetto alla primavera [0,59±0,06, 0,07±0,09, -0,55±0,09 LOG(pmol/min/mg prot), rispettivamente; $p<0,001$].

5.3 Discussione

L'utilizzo dell'attività di EROD come biomarcatore ambientale era già stata suggerita da Burke e Mayer (1974), che utilizzarono l'etossiresorufina come substrato modello della reazione di O-dealchilazione, con microsomi epatici di ratto, in un saggio fluorimetrico.

In seguito, l'obiettivo principale dei numerosi studi riguardanti l'attività di EROD è stato la valutazione degli effetti di contaminazione da inquinanti specifici in organismi target nell'ambiente marino (Galgani *et al.*, 1991; Holdway *et al.*, 1994; Addison e Edwards, 1998), in quanto fornisce un'indicazione relativamente rapida dell'*uptake* di composti tossici planari da parte dei pesci.

L'induzione di CYP1A (valutata tramite l'attività di EROD) non è una risposta di tossicità *per se* ma indica la potenzialità di ligandi del recettore per gli arili (AhR) di indurre modificazioni biochimiche. La generazione di intermedi reattivi degli IPA da parte di CYP1A determina la formazione di addotti al DNA che possono essere carcinogeni (Whyte *et al.*, 2000)

Molti studi hanno inoltre sottolineato la mancanza di conoscenza sulla variabilità naturale di questa attività enzimatica (Galgani e Payne, 1991). Più recentemente è stato dimostrato che fattori quali la stagionalità (Eggens *et al.*, 1995), la stadio di maturazione sessuale negli individui di sesso femminile (Burgeot *et al.*, 1994) e la crescita influenzano fortemente l'attività di EROD.

In questo studio è stato utilizzato come organismo modello *Zosterisessor ophiocephalus* in quanto specie residente bentonica che vive a stretto contatto con i sedimenti (Franco *et al.*, 2002). E' quindi verosimile che variazioni nell'attività di EROD possano riflettere il grado di contaminazione dei sedimenti nelle diverse aree della Laguna di Venezia. Le tre aree sono state scelte in quanto studi precedenti hanno identificato un significativo livello di contaminazione a Porto Marghera, e al contrario

una ridotta presenza di contaminanti nei sedimenti di superficie di Valle di Brenta e in particolare di Porto Canale (Marcomini *et al.*, 1999; Bernstein *et al.*, 2002).

Per quanto riguarda il LSI, questo parametro subisce dei cambiamenti transitori che sono in gran parte dovuti alle variazioni del contenuto epatico di glicogeno e lipidi, e quindi parzialmente anche a variazioni nell'alimentazione. Un incremento del valore di LSI può anche riflettere un effetto dell'esposizione a contaminanti. E' noto infatti che esposizioni a contaminanti organici per lunghi periodi determinano un aumento nel valore di LSI dovuto a iperplasia e/o ipertrofia a causa di un aumento dello sforzo di detossificazione da parte del fegato (Poels *et al.*, 1980; Fletcher *et al.*, 1982; Oikari e Nakari, 1982; Sloof *et al.*, 1983; Vignier *et al.*, 1992; Everaarts *et al.*, 1993). Un abbassamento del valore di LSI in pesci esposti a contaminanti ambientali può verificarsi solamente se l'esposizione è breve o se vi è scarsa disponibilità di cibo. E' chiaro dunque che il LSI è un parametro fisiologico non specifico, influenzato oltre che dall'esposizione a contaminanti anche dallo stato nutrizionale e di sviluppo del pesce. Per quanto riguarda i risultati ottenuti in termini di LSI %, è evidente il trend all'aumento da aprile-maggio a ottobre-novembre in tutti e tre i siti e le tipologie ma statisticamente significativo nelle femmine di tutti i siti e nei maschi territoriali di Porto Marghera ($p < 0,001$). Emerge dunque un effetto legato alla stagione: in autunno infatti, la massa epatica è mediamente maggiore rispetto alla stagione primaverile, soprattutto nelle femmine e in misura minore nei maschi adulti. Questo riflette probabilmente l'interessamento delle femmine e dei maschi adulti nella riproduzione. Nella stagione riproduttiva (primavera) infatti, le femmine sono occupate nella deposizione delle uova e il conseguente stress metabolico può riflettersi in una riduzione del peso epatico, accentuato presumibilmente anche da una diminuita alimentazione. Probabilmente, questo accade, seppure in misura minore, anche nei maschi adulti che in primavera sono impegnati nella difesa delle uova, compito che verosimilmente costituisce una fonte di stress.

Per quanto riguarda i risultati di attività di EROD, l' *Adjusted R squared* (0,703) del modello statistico fattoriale sembrerebbe indicare che una parte considerevole della varianza osservata nell'attività di EROD veniva spiegata con le variabili considerate e le interazioni tra esse (in accordo con Cohen, 1988 per i valori di *R squared*; *small*=0,10; *medium*=0,36; *large* =0,51).

Il fattore categoria è risultato significativo ($p < 0,001$) con un valore di Eta ($\sqrt{\text{Partial Eta squared}}$; 0,629), indicatore della proporzione di varianza dovuta a differenze tra le

medie dei gruppi, che sembrerebbe evidenziare un effetto considerevole di questa variabile sull'attività di EROD, in accordo con Cohen (1988; Eta: *small*=0,1; *medium*=0,24; *large*=0,31). In particolare, differenze significative sono state evidenziate in maschi e femmine *vs sneakers* ($p<0,001$) ma non in maschi *vs* femmine. Inoltre, sia il sito che la stagione hanno evidenziato significatività statistica ($p<0,001$), suggerendo che i siti e le stagioni rispettivamente differivano in termini di attività di EROD. Anche in questo caso i valori di Eta (0,659 e 0,685, rispettivamente) sembrerebbero indicare un effetto consistente di queste variabili sull'attività enzimatica. Per quanto riguarda il sito, nell'area di Porto Marghera i valori di attività di EROD ottenuti erano significativamente più elevati rispetto a Valle di Brenta ($p<0,01$) e Porto Canale ($p<0,001$) e Valle di Brenta rispetto a Porto Canale ($p<0,001$). Tali risultati sembrerebbero essere in accordo con i dati di espressione genica di CYP1A (PM *vs* PC e VB *vs* PC, $p<0,001$; Lopparelli *et al.*, dati personali) e con i dati disponibili relativi alla concentrazione di POP nei sedimenti della Laguna di Venezia, i quali indicavano una contaminazione maggiore nell'area circostante a Marghera, intermedia nei pressi di Valle di Brenta e ridotta nel territorio contiguo al sito di Porto Canale (Guerzoni *et al.*, 2004).

Per quanto riguarda la stagione, sono state valutate eventuali fluttuazioni stagionali nell'attività di EROD; è stato dunque considerato un periodo all'interno della stagione riproduttiva (aprile-maggio) e uno al di fuori della stagione riproduttiva (ottobre-novembre). In autunno, i valori di attività di EROD ottenuti erano statisticamente più elevati rispetto alla primavera. Le variazioni stagionali osservate confermavano i dati di letteratura per questa specie (Nesto *et al.*, 2007). Tali differenze potrebbero essere dovute al fatto che i livelli di attività di EROD e di espressione di CYP1A sono inducibili da basse temperature delle acque e influenzati da stato ormonale e maturità sessuale del pesce (Whyte *et al.*, 2000; Galgani *et al.*, 1992). Inoltre, altre possibili spiegazioni potrebbero essere una variabilità stagionale nel metabolismo dei contaminanti oppure delle variazioni nel contenuto lipidico dei tessuti e quindi nella concentrazione epatica di contaminanti come suggerito da Hylland *et al.* (1998).

E' chiaro comunque che gli effetti principali devono essere interpretati con cautela in quanto sono risultate statisticamente significative le interazioni categoria*sito e categoria*stagione con valori di Eta pari a 0,289 e 0,245 rispettivamente, che sembrerebbero suggerire un effetto di moderata entità sulla variabilità di EROD. Ciò

indicava dunque che gli effetti categoria-sito e categoria-stagione non erano additivi ma c'era una relazione di dipendenza tra i fattori di ciascuna interazione.

Considerando lo scopo dell'esperimento, è stato valutato il possibile effetto differenziale del fattore sito a seconda della categoria di animali considerata (femmine, maschi e *sneakers*) e le differenze più significative sono state riscontrate per il sito Valle di Brenta in femmine *vs* maschi. Contrariamente a quanto osservato per i maschi infatti, le femmine del sito di Valle di Brenta non possedevano valori di attività di EROD significativamente più elevati rispetto a Porto Canale ($p < 0,001$) ma statisticamente inferiori rispetto a Porto Marghera ($p < 0,01$). Questo risultato potrebbe essere dovuto a fattori estrinseci propri del sito di Valle di Brenta ed aventi azione solo sul gruppo delle femmine (es. caratteristiche dell'alimentazione) oppure più probabilmente al campione analizzato, che potrebbe non essere rappresentativo della popolazione; nel sito di Valle di Brenta infatti, soprattutto nella stagione autunnale, ci sono stati dei problemi nel campionamento delle femmine. Comunque, come emerge anche dal *profile plot* in Fig. 5.7 per tutte e tre le categorie il trend di induzione $PM > VB > PC$ è conservato. Idealmente, sarebbe stato preferibile avere diverse repliche per ciascun sito (almeno 3) per poter valutare più correttamente gli effetti dei contaminanti ambientali ed escludere il ruolo di fattori che possono essere propri del singolo sito scelto. Lo scopo del presente lavoro comunque era quello di valutare il livello di inquinamento di tre specifiche aree: Porto Marghera, Porto Canale e Valle di Brenta; inoltre, un campionamento di più siti con lo stesso livello di inquinamento avrebbe comportato dei costi eccessivi.

Per quanto riguarda l'effetto dell'interazione categoria*stagione, è stato verificato se esistesse un effetto differenziale del fattore stagione in femmine, maschi e *sneakers*. In effetti, anche se l'interazione era risultata significativa, nei relativi *profile plot* delle medie marginali stimate le linee non si intersecavano o si muovevano in direzioni diverse ed inoltre il livello di significatività ottenuto nel confronto primavera *vs* autunno era il medesimo per tutte e tre le categorie ($p < 0,0001$). I risultati ottenuti hanno confermato che l'effetto dell'interazione categoria*stagione sembrerebbe non essere considerevole; si potrebbe dunque interpretare esclusivamente l'effetto principale e concludere che la stagione autunno era caratterizzata da valori di attività di EROD significativamente più elevati rispetto alla primavera per tutte e tre le categorie.

E' interessante notare che l'interazione sito*stagione non è risultata significativa; l'effetto del sito dunque non dipende dalla stagione e quindi il periodo

riproduttivo (primavera) non sembrerebbe influenzare l'entità dell'induzione di EROD, contrariamente a quanto evidenziato da Nesto *et al.* (2007).

Si può dunque affermare l'utilità di EROD come biomarcatore di esposizione a contaminanti quali PCB e composti correlati. Inoltre, dai presenti risultati l'effetto degli inquinanti ambientali è stato evidenziato anche negli *sneakers* (maschi < 1 anno di età), anche se le differenze non erano statisticamente significative. L'induzione di EROD è infatti una risposta biochimica che è rapidamente attivata da livelli molto bassi di contaminanti nell'ambiente o da brevi esposizioni (Malavasi *et al.*, 2002); di conseguenza l'induzione di EROD in *Zosterisessor ophiocephalus* può essere considerata un biomarcatore in grado di rilevare anche cambiamenti biologici precoci causati dall'inquinamento nella Laguna di Venezia.

5.4 Conclusioni

Il presente studio si è proposto di valutare il possibile impiego di *Zosterisessor ophiocephalus*, una specie bentonica e stanziale, come bioindicatore di esposizione a contaminanti ambientali nella laguna di Venezia e si è proposto di individuare un eventuale biomarcatore di esposizione, risposta e/o tossicità. Dai risultati ottenuti, l'attività di EROD è da considerarsi un buon biomarcatore anche se, considerando la natura multifattoriale della risposta dell'individuo, è necessario l'utilizzo congiunto di più biomarcatori significativi per effettuare una valutazione corretta degli effetti dell'inquinamento nell'ecosistema acquatico. L'analisi statistica dei risultati di EROD riportati nella presente tesi è dunque preliminare e si proponeva unicamente di far emergere eventuali differenze in termini di induzione considerando la popolazione nel suo insieme oppure suoi singoli gruppi e/o diverse stagioni (riproduttiva e non). Il progetto *in toto* comprende la valutazione anche di altri biomarcatori di esposizione a contaminanti ambientali quali ad esempio l'espressione genica di CYP1A o di AhR e l'analisi dei residui di metalli, PCB ed IPA nei tessuti degli stessi campioni. Di conseguenza, l'analisi statistica che presumibilmente verrà applicata è l'analisi delle componenti principali (PCA, analisi multivariata) sui dati medi stagionali dei biomarcatori considerati e delle concentrazioni di residui (analogamente a quanto riportato da Nesto *et al.*, 2007).

CAPITOLO 6

**Messa a punto di metodi *high-throughput* in
luminescenza per la valutazione dell'attività di CYP3A
e di CYP2C nel fegato di cavallo**

6.0 Introduzione

E' ben noto che il citocromo P450 catalizza la maggior parte delle reazioni di ossidazione di xenobiotici e che la maggior parte di queste reazioni avviene nel fegato. Inoltre, la biodisponibilità e la *clearance* di un farmaco sono spesso determinate dall'attività CYP- dipendente.

Molte interazioni tra farmaci possono alterare tali attività; ad esempio un farmaco che inibisce un citocromo P450 che metabolizza un altro farmaco somministrato contemporaneamente può determinare un rallentamento della *clearance* del secondo farmaco e quindi un accumulo potenzialmente tossico.

In particolare, la sottofamiglia CYP3A nell'uomo è responsabile di circa metà delle ossidazioni di xenobiotici citocromo P450-dipendenti (Wilkinson *et al.*, 2004). L'isoenzima più importante è CYP3A4 e l'ortologo nel cavallo è CYP3A89 che mostra un'identità dell'82% nella sequenza aminoacidica.

CYP2C9 nell'uomo è una delle isoforme maggiormente presenti nel fegato e metabolizza più di 100 farmaci, tra cui tolbutamide, diclofenac, celecoxib, torasemide, fenitoina e warfarin. Inoltre molti composti naturali e a base di erbe sono metabolizzati da CYP2C9, probabilmente determinando la formazione di metaboliti tossici. Infine, CYP2C9 è importante anche nel metabolismo di composti endogeni come steroidi, retinoidi e acido arachidonico (Zhou *et al.*, 2009). L'ortologo di CYP2C9 nel cavallo è CYP2C92 che mostra un'identità aminoacidica pari all' 80%.

Per quanto riguarda il cavallo, poco si conosce riguardo le interazioni tra farmaci o tra farmaci e principi attivi contenuti nelle erbe. In accordo con la *review* di Williams e Lamprecht (2008), vi è un aumento di supplementi a base di erbe nel mercato degli alimenti per cavalli. Questi composti possono essere substrati per le attività CYP-dipendenti e interferire con farmaci co-somministrati oppure determinare la formazione di metaboliti tossici (Tab. 6.1).

Tab. 6.1. Esempi di principi attivi contenuti in supplementi a base di erbe che possono inibire o indurre CYP3A e CYP2C.

<i>Principio attivo Erba</i>	<i>CYP3A</i>	<i>CYP2C</i>	<i>References</i>
Alcamidi Echinacea	inibitore	-	<i>Hellum e Nilsen, 2007</i>
Bergamottina	inibitore	inibitore	<i>Zhou et al., 2004</i>
Fagioli/trifoglio/carota			
Gingerolo Ginger	induttore	-	<i>Brandin et al., 2007</i>
Ginsenosidi Ginseng	inibitore	inibitore	<i>Hao et al., 2008</i>
Glabridina Radice liquirizia	inibitore	inibitore	<i>Zhou et al., 2004</i>
Quercetina Aglione	inibitore	inibitore	<i>Zhou et al., 2004</i>
Silimarina Latte cardo/erba prato	inibitore	inibitore	<i>Doehmer et al., 2008</i>

Per quanto riguarda i farmaci, quelli più frequentemente utilizzati nei cavalli sono antibiotici, anti-infiammatori e anti-parassitari (Tab. 6.2; Tydèn, tesi dottorato).

Tab. 6.2. Esempi di farmaci utilizzati per la terapia nei cavalli che possono essere substrati, induttori o inibitori di CYP3A.

<i>Drug</i>	<i>CYP3A</i>	<i>CYP2C</i>	<i>References</i>
Desametazone	induttore	induttore	<i>Pascussi et al., 2000a; Zhou et al., 2009</i>
Fenbendazolo	inibitore	-	<i>Baliharova et al., 2004</i>
Ivermectina	substrato	-	<i>Zeng et al., 1998</i>
Ketamina	substrato	substrato	<i>Hijazi, 2002; Capponi et al., 2009</i>
Lidocaina	substrato	-	<i>Aiba et al., 2003</i>
Moxidectina	substrato	-	<i>Dupuy et al., 2001</i>
Meloxicam	induttore	-	<i>Chesne et al., 1998</i>
Fenilbutazone	induttore	-	<i>Ogg et al., 1999</i>
Praziquantel	substrato	-	<i>Li et al., 2003</i>
Metadone	substrato	substrato	<i>Capponi et al., 2009</i>
Diclofenac	-	inibitore	<i>Capponi et al., 2009</i>
Ibuprofene	-	substrato	<i>Capponi et al., 2009</i>

E' chiaro che in questo contesto, ma non solo, la tecnologia ideale deve essere rapida, robusta e facilmente automatizzabile. I saggi in luminescenza, che combinano l'attività CYP-dipendente alla luminescenza della luciferina (L) in una tecnologia chiamata P450-Glo™ (Promega), possono costituire un approccio che risponde a tutte queste esigenze per applicazioni *in vitro*. Tali saggi sono stati messi a punto nell'uomo per CYP1A1, 1A2, 1B1, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 e 3A7 utilizzando dei substrati L-derivati.

Le possibili applicazioni di questa tecnologia riguardano lo screening di farmaci o nuove entità chimiche che possono avere un effetto inibitorio o induttivo sulle attività citocromo P450-dipendenti o semplicemente la valutazione dell'attività basale in frazioni microsomiali di diversi tessuti.

Questi metodi infatti possono ovviare ai limiti di numero di campioni e di rapidità delle analisi in HPLC e all'interferenza da parte di analiti fluorescenti che si riscontra nei saggi fluorimetrici; inoltre, sono molto sensibili e quindi permettono una stima accurata dei parametri di cinetica enzimatica (LOD ~0,1 nM).

In questo lavoro, sono state messe a punto le condizioni per valutare le attività CYP3A- e CYP2C- dipendenti in microsomi epatici di cavallo ed inoltre sono stati determinati i parametri di cinetica enzimatica per entrambe le attività. Infine, è stata verificata la specificità dei substrati scelti, Luciferina-IPA (L-IPA) e Luciferina-H (L-H), utilizzando inibitori specifici di CYP3A e CYP2C.

Lo scopo è quello di poter applicare questa tecnologia in studi di metabolismo e di interazioni tra farmaci non solo nel cavallo, ma anche come prospettiva futura in altre specie di interesse veterinario.

6.1 Materiali e metodi

Reagenti e composti chimici

La Luciferina-D (L-D), il sistema rigenerante NADPH, il kit P50-Glo CYP3A4 e CYP2C9 e le piastre opache in polistirene a fondo piatto sono stati acquistati dalla Promega (Madison, WI, USA). Chetoconazolo (KTZ) e sulfafenazolo (SFZ) sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Tutti gli altri reagenti sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich o dalla Mallinckrodt-Baker (Milano, Italia)

Preparazione dei microsomi epatici

I microsomi sono stati preparati dal fegato di cavalli (n=6, trotter di razza standard svedese, maschi castrati, 16-20 anni di età) come descritto per il bovino (capitolo 2), con l'aggiunta di una terza fase di centrifugazione a 105000 g per 45 min, in quanto i fegati non erano stati perfusi al macello.

Gli animali provenivano da allevamenti autorizzati ed erano stati allevati in condizioni sperimentali controllate per assicurare l'assenza di trattamenti terapeutici o illeciti prima della macellazione.

La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo BCA (Micro BCA "Protein Assay kit", THERMO Scientific, Celbio, Milano, Italia).

Descrizione del saggio

I saggi in luminescenza per citocromo P450 accoppiano l'attività enzimatica citocromo P450-dipendente alla capacità di generare luce dalla L-D. La luciferasi utilizza ATP e L-D per produrre luce in presenza di ossigeno e Mg^{2+} . I substrati luminogenici sono derivati della L-D ma non sono attivi con la luciferasi. In presenza del citocromo P450, il derivato viene convertito nel prodotto L-D; in seguito, un reagente che contiene luciferasi e ATP, viene aggiunto per fermare la reazione citocromo P450-dipendente (contiene un detergente) e iniziare la reazione della luciferasi che genera una quantità di luce direttamente proporzionale alla quantità di L prodotta dall'isoforma di citocromo P450 nella prima fase. In particolare, CYP3A4 effettua una reazione di O-dealchilazione e CYP2C9 una reazione di idrossilazione

aromatica in posizione R1 che introducono un gruppo idrossilico generando L-D e quindi attivando la reazione della luciferasi (Fig.6.1).

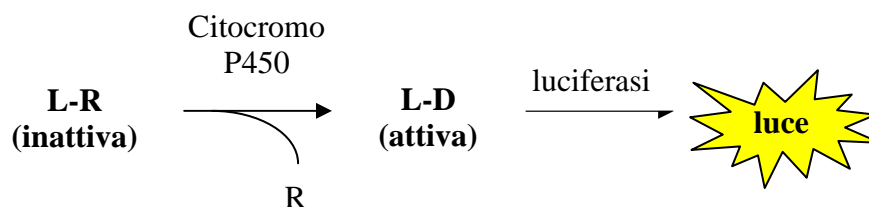


Fig. 6.1. Conversione del substrato-Glo da parte del citocromo P450.

Per quanto riguarda il CYP3A4 sono disponibili diversi substrati L-derivati; è stato scelto L-IPA in quanto è risultato il più sensibile e selettivo con le isoforme ricombinanti umane; per CYP2C9 era invece disponibile un unico substrato la L-H.

In breve:

STANDARD DI CALIBRAZIONE:

- In ciascun pozzetto di micropiastra vengono aggiunti 12,5 µl di standard di calibrazione L-D 0-2 µM finale (std 0 µM si aggiungono 12,5 µl di acqua)
- Aggiunti 12,5 µl di mix di incubazione di controllo contenente 30 µg BSA, L-IPA 20 µM o L-H 200 µM e 100 mM KPO₄

CAMPIONI:

- In ciascun pozzetto di micropiastra vengono aggiunti 12,5 µl di acqua, di solvente (controllo), oppure di inibitore: KTZ 0,001-1 µM finale, in metanolo (5 livelli di concentrazione, 6 replicati); SFZ 5-160 µM finale, in metanolo (6 livelli di concentrazione, 6 replicati).
- Aggiunti 12,5 µl di mix di incubazione contenente 10-80 µg microsomi epatici di cavallo, L-IPA (1-40 µM finale, in DMSO; 6 livelli di concentrazione, 6 replicati) o L-H (10-600 µM finale, in acqua; 7 livelli di concentrazione, 6 replicati) e 100 mM KPO₄

- Pre-incubazione 10 min.
- Aggiunti 25 μl di sistema rigenerante NADPH.
- Incubazione 0-40 min per L-IPA; 0-60 min per L-H.
- Aggiunti 50 μl del *detection reagent*.
- Incubazione a temperatura ambiente per 20 min, allo scopo di stabilizzare il segnale di luminescenza.
- Lettura al luminometro (1420 Victor Multilabel Counter, Wallac, PerkinElmer, Waltham, MA. USA)

Ai valori di Unità di Luminescenza Relative (RLU) di tutti i pozzetti viene sottratto il valore dello standard 0 μM . I risultati ottenuti in termini di Unità di Luminescenza Relative (RLU), sono stati interpolati in una retta di standard di calibrazione per ottenere i valori in termini di concentrazione μM che poi sono stati divisi per i minuti di incubazione e per la concentrazione di proteina ed espressi dunque come nmol/min/mg prot.

Analisi dei dati

Le curve standard e di calibrazione sono state calcolate utilizzando un'analisi di regressione lineare con il metodo dei minimi quadrati; pendenze, intercette e coefficienti di regressione lineari (r^2) sono stati determinati per ciascuna curva (Microsoft Excel, 2000). La valutazione dei parametri di cinetica enzimatica e di inibizione è stata effettuata utilizzando GraphPad Prism, version 4.02 (San Diego, CA, USA). K_m e V_{max} sono stati calcolati utilizzando l'equazione di regressione non lineare di Michaelis–Menten. I valori di IC_{50} sono stati calcolati utilizzando l'equazione di regressione non lineare Dose-Risposta log (inibitore) vs risposta. Per descrivere la cinetica enzimatica come mono- o bi-fasica (ovvero se uno o più enzimi partecipavano alla reazione), è stato adottato il plot di Eadie–Hofstee. Il runs test è stato effettuato per valutare le deviazioni dalla linearità.

6.2 Risultati

Messa a punto delle condizioni di incubazione

I risultati relativi allo studio in funzione della proteina e del tempo di incubazione sono riportati nelle Figg. 6.2-6.3. La linearità è mantenuta fino a 40 μg di proteina microsomiale epatica di cavallo ($r^2=0,992$; Fig. 6.2a) e fino a 20 minuti di incubazione ($r^2=0,998$; Fig. 6.3a) per il saggio L-IPA e fino a 40 μg di proteina ($r^2=0,995$; Fig. 6.2b) e fino a 60 min per L-H ($r^2=0,999$; Fig. 6.3b).

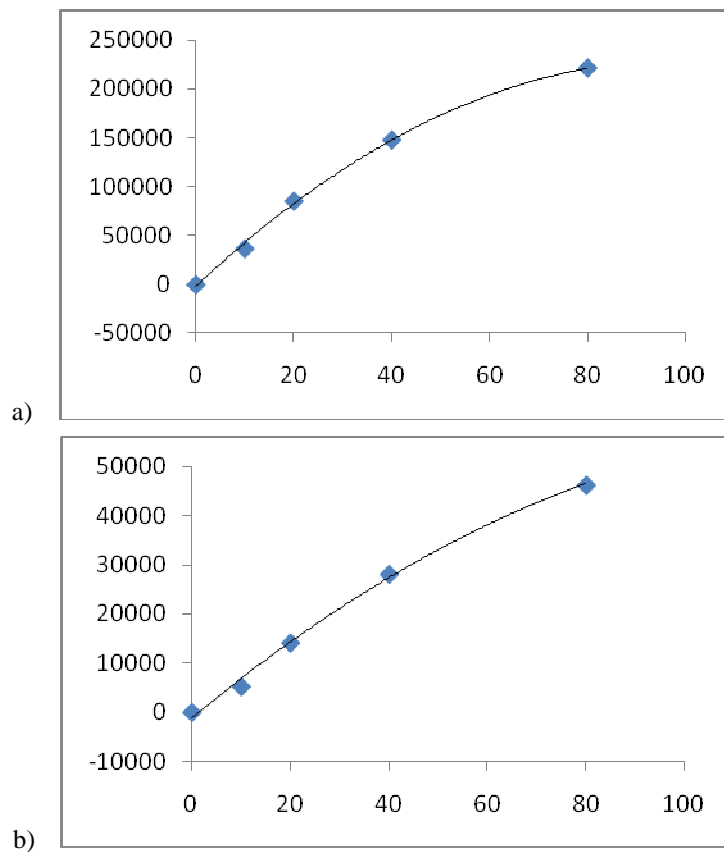


Fig.6.2 Studio in funzione della concentrazione di proteina (ciascun punto è la media di 3 replicati). a) L-IPA 25 μM , 30 min, 0-80 μg proteina; b) L-H 400 μM , 30 min, 0-80 μg proteina.

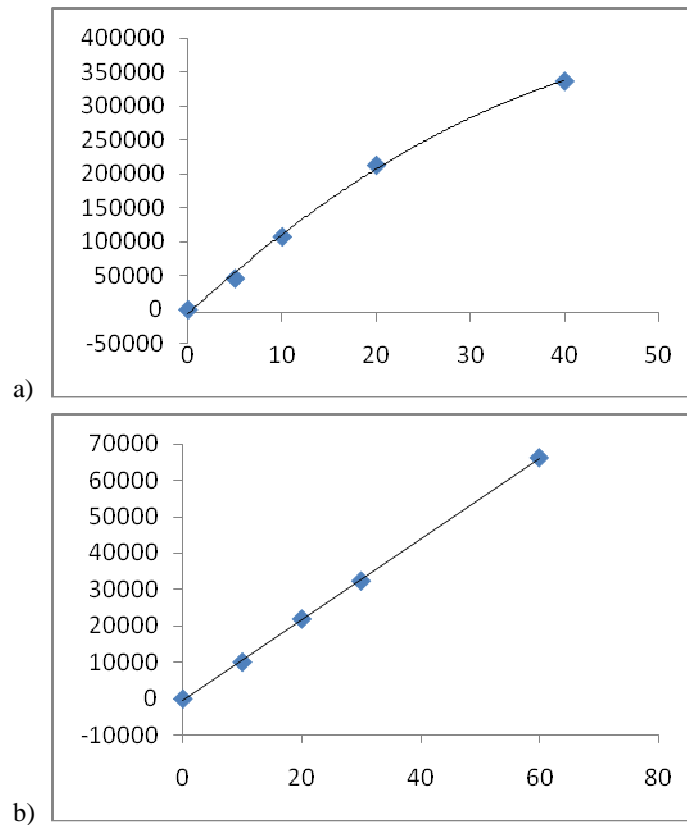


Fig.6.3 Studio in funzione del tempo di incubazione (ciascun punto è la media di 3 replicati). a) L-IPA 25 μM , 30 μg proteina, 0-40 min; b) L-H 300 μM , 30 μg proteina min, 0-60 min.

Cinetica enzimatica

Utilizzando microsomi epatici di cavallo e un tipico approccio di cinetica enzimatica, sono state determinate le costanti di cinetica enzimatica K_m e V_{max} . I valori ottenuti per il saggio con la L-IPA e con la L-H (media \pm ES) sono risultati pari a $14,5 \pm 7,3$ e $175,9 \pm 16,2$ μM per la K_m e $0,019 \pm 0,004$ e $0,025 \pm 0,001$ nmol/min/mg proteina per la V_{max} , rispettivamente (Figura 6.4a e b). Il plot di Eadie-Hofstee ha evidenziato come queste attività enzimatica sembrerebbero essere caratterizzate da un andamento mono-fasico ($r^2 = 0,91$ ed $r^2 = 0,96$, per L-IPA e L-H rispettivamente; Fig. 6.5a e b) suggerendo un solo enzima o enzimi con valori di K_m simili sono coinvolti nelle reazioni enzimatiche. Inoltre, il runs test ha confermato la bontà del *fit* ($p=0,4$ e $p=0,2$, per L-IPA e L-H rispettivamente).

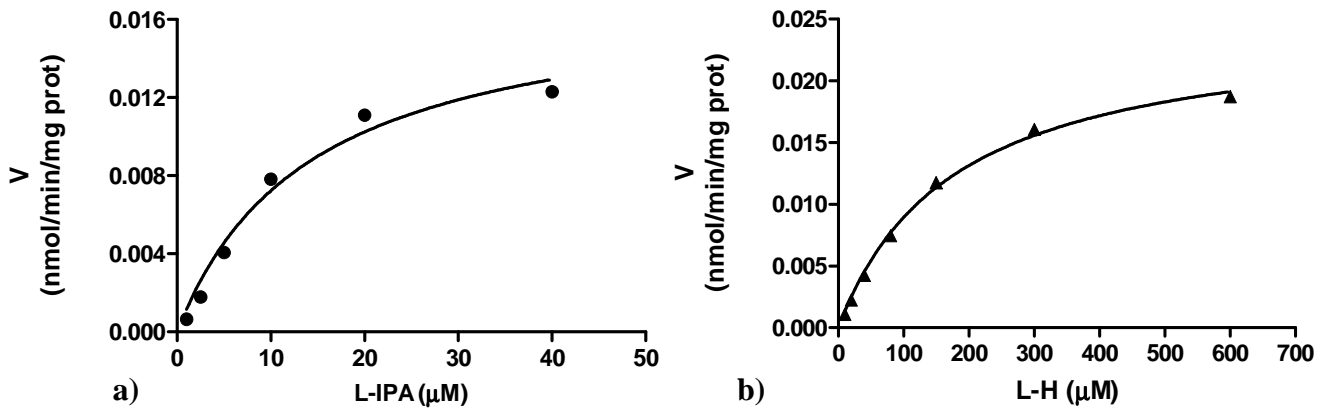


Fig.6.4. a) Michaelis-Menten plot per il saggio con la L-IPA ($r^2 = 0,99$); b) Michaelis-Menten plot per il saggio con la L-H ($r^2 = 0,99$).

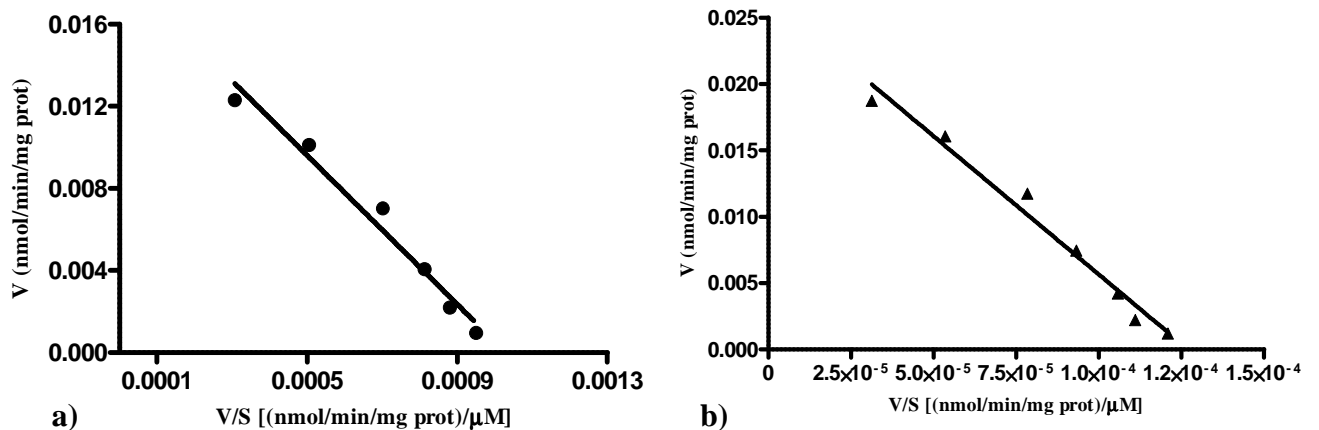


Fig.6.5. a) Eadie-Hofstee plot per il saggio con la L-IPA; b) Eadie-Hofstee plot per il saggio con la L-H ($r^2 = 0,99$).

Inibizione chimica

I risultati dell'inibizione chimica effettuati con il KTZ, inibitore di CYP3A, hanno evidenziato un'inibizione confermata da un valore di IC₅₀ pari a 0,035 μM (Fig. 6.6) mentre il SFZ, inibitore di CYP2C, ha evidenziato un valore di IC₅₀ pari a 47,2 μM (Fig. 6.7).

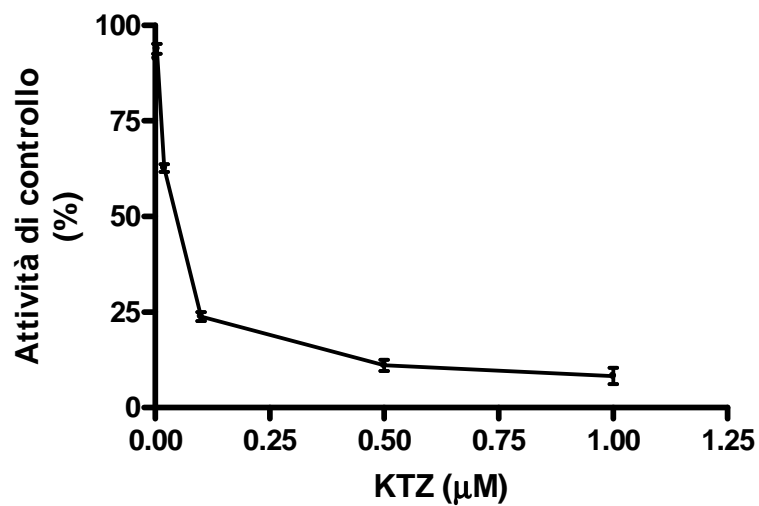


Fig.6.6. Inibizione con KTZ (i valori sono espressi come percentuali dell'attività di controllo costituita dal solo solvente)

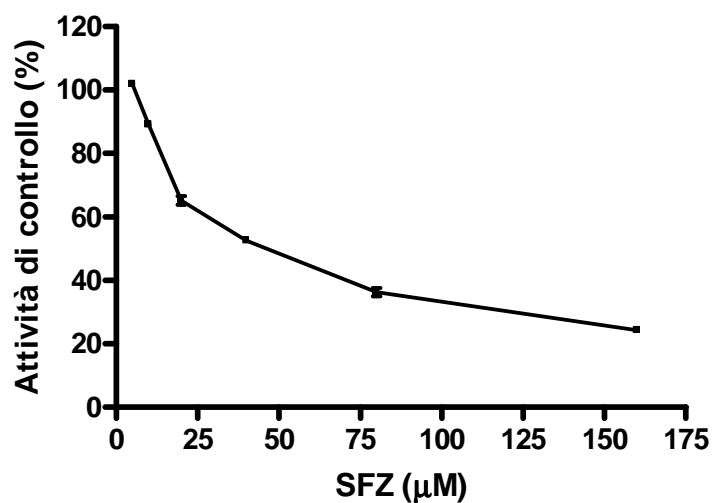


Fig.6.7. Inibizione con SFZ (i valori sono espressi come percentuali dell'attività di controllo costituita dal solo solvente)

6.3 Discussione

In questo lavoro, sono state messe a punto le condizioni per la valutazione dell'attività di CYP3A e di CYP2C nel fegato di cavallo utilizzando dei saggi in luminescenza basati sulla tecnologia Glo™.

In medicina veterinaria, questi saggi in luminescenza sono stati utilizzati con successo da Capponi *et al.* (2009) allo scopo di valutare le isoforme di citocromo P450 coinvolte nel metabolismo di R- ed S-ketamina e per valutare le interazioni metaboliche di altri analgesici con la ketamina, in cavallo e cane. Sono state però applicate le condizioni di incubazione derivate da quelle messe a punto con le isoforme ricombinanti di uomo senza effettuare alcuno studio di cinetica enzimatica. Inoltre, per quanto riguarda CYP3A, è stato scelto come substrato la L-BE che cross-reagisce con CYP3A5, CYP3A7 e CYP4F12 ed è stato dimostrato che le reazioni catalizzate da CYP3A4 con L-BE sono inibite in maniera sostanziale dal DMSO che deve essere eliminato dalle reazioni o mantenuto $\leq 0,1$ %.

Nel presente studio, è stato utilizzato come substrato per la valutazione dell'attività CYP3A-dipendente la L-IPA che è considerato il substrato più sensibile e selettivo nell'uomo e inoltre sono stati determinati per la prima volta nel cavallo i parametri di cinetica enzimatica K_m e V_{max} per attività CYP3A- e CYP2C-dipendenti. Per quanto riguarda la K_m , i valori ottenuti erano pari a 14,5 μM e 175,9 μM per CYP3A e CYP2C rispettivamente e se confrontati con i valori ottenuti con le isoforme ricombinanti umane (3 μM , CYP3A4; 100 μM , CYP2C9) sembrerebbero suggerire un'affinità inferiore di entrambi gli enzimi per i substrati L-derivati nel fegato di cavallo (anche se è difficile poter effettuare un confronto in quanto non sono state utilizzate isoforme ricombinanti di cavallo).

Come controllo sono state condotte delle incubazioni con microsomi epatici di uomo e l'attività è risultata 3-4 volte più alta per entrambe le isoforme (*data not shown*) rispetto ai risultati ottenuti con microsomi epatici di cavallo. Questi dati sembrerebbero essere in disaccordo con quelli ottenuti da Chauret *et al.* (1997) che hanno riscontrato un'attività di tolbutamide metil-idrossilasi (*marker* CYP2C) simile in uomo e cavallo (0,04 e 0,068 nmol/min/mg prot, rispettivamente), mentre per quanto riguarda l'attività di testosterone 6 β -idrossilasi (*marker* CYP3A) il trend uomo > cavallo è mantenuto (1,69 vs 0,230 nmol/min/mg prot).

E' necessario comunque sottolineare che SFZ 100 μ M (inibitore CYP2C9, nell'uomo) ha evidenziato un'inibizione dell'attività di TMH del 40 %, mentre nel presente studio, a parità di concentrazione di SFZ, è stata evidenziata un'inibizione > 60%. Il substrato utilizzato in questi saggi in luminescenza sembrerebbe dunque essere più specifico della tolbutamide come *marker* dell'attività di CYP2C nel fegato di cavallo. Una stessa concentrazione di SFZ (100 μ M) è stata utilizzata anche con microsomi epatici di uomo e ha evidenziato un'inibizione pressoché totale dell'attività di conversione della L-H in L-D (*data not shown*). Tale inibitore infatti nell'uomo è selettivo per CYP2C9 con valori di IC₅₀ in un *range* tra 0,2 e 1,3 μ M. Nel presente studio invece, il valore di IC₅₀ ottenuto era pari a 47,2 μ M. E' chiaro dunque che o tale inibitore non è selettivo nei confronti dell'ortologo di cavallo oppure altri isoenzimi della sottofamiglia CYP2C partecipano a tale reazione che non risulta quindi specifica nei confronti di CYP2C92.

Per quanto riguarda CYP3A, i risultati ottenuti con il KTZ (1 μ M) hanno evidenziato un'inibizione > 90% con microsomi epatici di uomo e di cavallo (*data not shown*). Il valore di IC₅₀ ottenuto pari a 0,035 μ M (nell'uomo il *range* è 0,008-0,17 μ M) sembrerebbe confermare dunque che il substrato scelto, L-IPA, è specifico per CYP3A.

Per quanto riguarda le caratteristiche di questi saggi in luminescenza, è stata dimostrata la relazione diretta tra l'intensità di luce e la produzione di metabolita da parte delle isoforme di citocromo P450 confrontando l'aumento tempo-dipendente della concentrazione di L-D misurata tramite HPLC e metodo in luminescenza ed è stata evidenziata una buona correlazione. Inoltre, il turnover della L-D da parte della luciferasi è sufficientemente lento e la luciferasi sufficientemente stabile che la velocità di reazione e l'intensità di segnale non cambiano significativamente durante il tempo richiesto per effettuare il saggio (Cali *et al.*, 2006).

Per quanto riguarda la sensibilità del saggio, è confermata dai valori di limite di rilevazione ottenuti pari a 0,2 e 0,11 nM per L-H e L-IPA, rispettivamente. Un confronto tra saggi fluorimetrici e in luminescenza per alcune isoforme di citocromo P450 ha evidenziato la maggior sensibilità di questi ultimi (circa 100 volte superiore; Cali *et al.*, 2006). Inoltre, non vi è la possibilità di sovrapposizione delle lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione che si può verificare in fluorescenza tra analiti, NADPH e substrati. In luminescenza infatti, la sostanza che emette luce, ossi-luciferina, viene generata enzimaticamente dalla luciferasi.

Inoltre è stato calcolato il rapporto segnale-rumore analizzando con le condizioni messe a punto con microsomi epatici di 6 cavalli ed i valori medi ottenuti (172610 vs 350 RLU per CYP3A e 36799 vs 281 RLU per CYP2C) sono in linea con quello che viene definito “buon segnale”, pari a ≥ 400 per CYP3A e ≥ 120 per CYP2C.

Data la sensibilità di questi saggi, è dunque possibile ridurre la quantità di proteina utilizzata che risulta nel risparmio di materiale e nella riduzione della possibilità di legame non specifico del substrato e dei composti valutati.

Un'altro vantaggio è la possibilità di valutare l'attività di più di un'isoforma nella stessa piastra senza la necessità di cambiare i filtri a causa delle diverse proprietà fluorescenti dei substrati *marker*.

Tutte queste caratteristiche rendono questa tecnologia applicabile nell'ambito di *High Throughput Screening* per studi di interazioni tra farmaci ma anche per la ricerca di base in quanto permettono di valutare l'attività enzimatica di più isoforme contemporaneamente e di analizzare un numero elevato di campioni in tempi estremamente brevi (il tempo totale per effettuare questi saggi è di circa 2 ore per un piastra da 96-pozzetti).

5.5 Conclusioni

I metodi in luminescenza messi a punto sembrerebbero dunque essere caratterizzati da un'ottima sensibilità e per quanto riguarda il CYP3A anche da una buona specificità di substrato. Per quanto riguarda il CYP2C invece, sembrano essere necessari ulteriori studi volti a verificare ulteriormente la specificità del substrato L-H, ad esempio utilizzando altri inibitori selettivi per tale sottofamiglia come l' ibuprofene o il diclofenac. I risultati ottenuti con il SFZ infatti hanno evidenziato un' inibizione moderata anche se in linea con i dati in letteratura. Questo potrebbe essere dovuto sia ad una specificità di substrato non ottimale ma anche ad una scarsa specificità dell'inibitore nei confronti di CYP2C di cavallo (i sulfamidici infatti sono substrati di tale sottofamiglia).

Un possibile svantaggio potrebbe essere l'impossibilità di confrontare i dati di attività con i valori di letteratura che generalmente prevedono l'impiego di metodi HPLC o in fluorescenza/spettrofotometria che utilizzano substrati diversi e reazioni caratterizzate da velocità diverse.

I risultati ottenuti possono costituire un ottimo punto di partenza per poter applicare la tecnologia dei saggi in luminescenza in studi relative alle specie di interesse veterinario con vantaggi di costi e tempi di realizzazione delle analisi.

Bibliografia

- Abraham, G., Gottschalk, J., Ungemach, F.R., 2004. Possible role of dexamethasone in sensitizing the beta-2-adrenergic receptor system in vivo in calves during concomitant treatment with clenbuterol. *Pharmacology* 72, 196-204.
- Addison, R. F., Edwards, A. J., 1988. Hepatic microsomal mono-oxygenase activity in flounder *Platichthys flesus* from polluted sites in Langesundfjord and from mesocosms experimentally dosed with diesel oil and copper. *Marine Ecology Progress Series* 46, 51-54.
- Aiba, T., Takehara, Y., Okuno, M., Hashimoto, Y., 2003, Poor correlation between intestinal and hepatic metabolic rates of CYP3A4 substrates in rats. *Pharm Res* 20, 745-748.
- Akingbemi, B.T., 2005. Estrogen regulation of testicular function. *Reproductive Biology and Endocrinology* 51, 1-13.
- Al Katheeri, N.A., Wasfi, I.A., Lambert, M., Giuliano Albo, A., Nebbia, C., 2006. In vitro and in vivo metabolism of dexamethasone in the camel. *Veterinary journal* 172, 532-543.
- Arts, C.J.M., Schilt, R., Van Ginkel, L.A., 1996. Boldenone is a naturally occurring anabolic steroid in cattle. *Proceedings of the EuroResidue III*, Haagsma, N., Ruiter, A., Eds., Veldhoven, The Netherlands, 212-216.
- Backes W.L., 1993. NADPH-cytochrome P450 reductase: function. In: J.B. Schemkmann and H. Greim, Editors, *Handbook of Experimental Pharmacology: Cytochrome P450*, Springer, Berlin, NY (1993), pp. 15-34.
- Baliharova, V., Velik, J., Savlik, M., Szotakova, B., Lamka, J., Tahotna, L., Skalova, L., 2004, The effects of fenbendazole, flubendazole and mebendazole on activities of hepatic cytochromes P450 in pig. *J Vet Pharmacol Ther* 27, 85-90.
- Ball, G.F., Balthazard, J., 2004. Hormonal regulation of brain circuits mediating male sexual behavior in birds. *Physiology and Behavior* 83, 329-346.
- Bergmeyer H.U., Bernt E., Hess B. (1963) Lactic dehydrogenase. In: H.U. Bergmeyer (Eds.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, pp.736-741.
- Bernhardt, R., 2006. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *Journal of Biotechnology* 25, 128-45.

Burnstein, K.L., Maiorino, C.A., Dai, J.L., Cameron, D.J., 1995. Androgen and glucocorticoid regulation of androgen receptor .cDNA expression. *Molecular and Cellular Endocrinology* II 5, 1777-186

Bernstein A.G., A. Barbante, G. Ferrari, A. Marcomini, S. Guerzoni and R. Zonta (2002). Sources and occurrence of Persistent Toxic Substances (PTS) in the Lagoon of Venice (Italy). Paper presented at the 1st UNEP Regional Workshop on Assessment of PTS sources and concentrations in the environment, 4-6 February 2002, Athens (Greece).

Bjornsson, T.D., Callaghan, J.T., Einolf, H.J., Fischer, V., Gan, L., Grimm, S., Kao, J., King, S.P., Miwa, G., Ni, L., Kumar, G., MacLeod, J., Obach, R.S., Roberts, S., Roe, A., Shah, A., Snikeris, F., Sullivan, J.T., Tweedie, D., Vega, J.M., Walsh, J., Wrighton, S. A., 2003. The conduct of in vitro and in vivo drug–drug interaction studies: A pharmaceutical research and manufacturers of America (PhRMA) perspective. *Drug Metabolism and Disposition* 31, 815–832.

Bogaards, J. J. P., Bertrand, M., Jackson P., Oudshoorn, M. J., Weaver, R. J., Van Bladeren, P. J., Walther, B., 2000. Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man. *Xenobiotica* 30, 1131-1152.

Brandin, H., Viitanen, E., Myrberg, O., Arvidsson, A.K., 2007, Effects of herbal medicinal products and food supplements on induction of CYP1A2, CYP3A4 and MDR1 in the human colon carcinoma cell line LS180. *Phytother Res* 21, 239-244.

Burgeot, T., Bocquéné, G., Truquet, P., Le Dean, L., Galgani, F., 1994. Induction of EROD activity in red mullet (*Mullus barbatus*) along the French Mediterranean coasts. *Science of the Total Environment* 142, 213-220.

Burgeot, T., Bocquènè, G., Porte, C., Dimeet, J., Santella, R.M. Garcia de la Parra, L.M., Pfholl-Leszkowicz, A., Raoux, C., Galgani, F., 1996. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. *Marine Ecology progress Series* 131, 125-141.

Burke, M., Mayer, R.T., 1974. Ethoxyresorufin: direct fluometric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylchloranthrene. *Drug Metabolism and Disposition* 2, 583-588.

Cali, J.J., Ma, D., Sobol, M., Simpson, D.J, Frackman, S., Good, T.D., Daily, W.J., Liu, D., 2006. Luminogenic cytochrome P450 assays. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2, 629-645.

Cantiello, M., Carletti, M., Dacasto, M., Martin, P.G.P., Pineau, T., Capolongo, F., Gardini, G., Nebbia, C., 2008. Cytochrome P450 inhibition profile in liver of veal calves administered a combination of 17 β -

estradiol, clenbuterol, and dexamethasone for growth-promoting purposes. *Food and Chemical Toxicology*, doi: 10.1016/j.fct.2008.05.018.

Cantiello, M., Giantin, M., Carletti, M., Lopparelli, R.M., Capolongo, F., Lasserre, F., Bollo, E., Nebbia, C., Martin, P.G., Pineau, T., Dacasto, M., 2009. Effects of dexamethasone, administered for growth promoting purposes, upon the hepatic cytochrome P450 3A expression in the veal calf. *Biochemical pharmacology* 77, 451-463.

Capolongo, F., Dacasto, M., Carletti, M., Nebbia, C., Merlanti, R., Montesissa, C., 2003. Effetti di alcuni trattamenti illeciti sul metabolismo ossidativo P450-dipendente nel fegato del vitello a carne bianca: risultati preliminari. *Atti S.I.S. Vet.*, LVIII, 130.

Capponi, L., Schmitz, A., Thormann, W., Theurillat, R., Mevissen, M., 2009. In vitro evaluation of differences in phase 1 metabolism of ketamine and other analgesics among humans, horses, and dogs. *American Journal of Veterinary Research* 70, 777-786.

Chauret, N., Gauthier, A., Martin, J., Nicoll-Griffith, D.A., 1997. In vitro comparison of cytochrome P450-mediated metabolic activities in human, dog, cat and horse. *Drug Metabolism and Disposition* 25, 1130-1136.

Chesne, C., Guyomard, C., Guillouzo, A., Schmid, J., Ludwig, E., Sauter, T., 1998, Metabolism of Meloxicam in human liver involves cytochromes P4502C9 and 3A4. *Xenobiotica* 28, 1-13.

Choo, J.J., Emery, P.W., Rotwell, N.J., 1991. Dose-dependent effects of a steroid, nandrolone phenylpropionate (Durabolin), on body composition and muscle protein metabolism in female rats. *Annals of nutrition and metabolism* 35, 141-147.

Casarett, L.J., Doull, J., 2001. Biotransformation of xenobiotics, Induction of Cytochrome P450. In: C.D. Klaassen (Eds.), *Toxicology: The Basic Science Of Poisons*. McGraw-Hill, New York, pp. 135-136.

Chiesara, E., Radice, S., 1997. Metabolismo dei farmaci, Induzione e Inibizione farmaco-metabolica. In: F. Clementi e G.Fumagalli (Eds.). *Farmacologia Generale e Molecolare*, UTET, Torino, pp. 458-472.

Clarke, M.L., Harvey, D.G., Humphreys, J.R. (Edizione 1981) In: Ballière and Tindall, *Veterinary Toxicology*, London.

Clarke, S.E., 1998. In vitro assessment of human cytochrome P450. *Xenobiotica* 28, 1167-202.

Commissione dell'Unione Europea, Regolamento del Consiglio 2377/90/CE. *Gazzetta Ufficiale*, L224 (1990)

Commissione dell'Unione Europea, Direttiva Comunitaria 2003/74/CE. Official Journal of the European Communities, L 262 (2003) 17-21.

Commissione dell'Unione Europea, Direttiva del Consiglio 96/23/CE. Official Journal of the European Communities, L125 (1996) 10

Cohen, J., 1988. Statistical Power Analysis for the Behavioural Sciences 2nd Edition. Lawrence Erlbaum Associates.

Courtheyn, D., Le Bizec, B., Brambilla, G., De Brabander, H.F., Cobbaert, E., Van de Wiele, M., Vercammen, J., De Wasch, K., 2002. Recent developments in the use and abuse of growth promoters. *Analytica Chimica Acta* 473, 71-82.

Cribb, A., Nuss, C., Wang, R.W., 1995. Antipeptide antibodies against overlapping sequences differentially inhibit human CYP2D6. *Drug Metabolism and Disposition*, 23, 671-675.

Cuzzocrea, S., Bruscoli, S., Crisafulli, C., Mazzon, E., Agostini, M., Muià, C., Esposito, E., Di Virgilio, R., Meli, R., Vegeto, E., Maggi, A., Riccardi, C., 2007. Estrogen receptor antagonist fulvestrant (ICI 182,780) inhibits the anti-inflammatory effect of glucocorticoids. *Molecular Pharmacology* 71, 132-144.

Dacasto, M., Eeckhoutte, C., Capolongo, F., Dupuy, J., Carletti, M., Calleja, C., Nebbia, C., Alvinerie, M., Galtier, P., 2005. Effect of breed and gender on bovine liver cytochrome P450 3A (CYP3A) expression and inter-species comparison with other domestic ruminants. *Veterinary Research* 36, 179-190.

Daxenberger, A., Ibarreta, D., Meyer, H.H., 2001. Possible health impact of animal oestrogens in food. *Human Reproduction Update*. 7, 340-55.

Derendorf, H., Hochhaus, G., 1995. Handbook of pharmacokinetic/pharmacodynamic correlation. CRC Press, USA.

Doehmer, J., Tewes, B., Klein, K.U., Gritzko, K., Muschick, H., Mengs, U., 2008, Assessment of drug-drug interaction for silymarin. *Toxicol In Vitro* 22, 610-617.

Donato, M.T., 2004. Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona. In: Cascales Angosto M, Gómez-Lechón MJ, Citocromo P-450, Instituto de España, Real Accademia Nacional de Farmacia, Realigraf S.A., Madrid, España

- Dupuy, J., Escudero, E., Eeckhoutte, C., Sutra, J.F., Galtier, P., Alvinerie, M., 2001, In vitro metabolism of ¹⁴C-moxidectin by hepatic microsomes from various species. *Vet Res Commun* 25, 345-354.
- Eeckhoutte, C., Albo, A.G., Carletti, M., Giaccherino, A.R., Galtier, P., Nebbia, C., Dacasto, M., 2002. Time-dependent variations of drug-metabolising enzyme activities (DMEs) in primary cultures of rabbit hepatocytes. *Toxicology In Vitro* 16, :375-382.
- Eggens, M., Bergman, A., Vethaak, D., 1995. Seasonal variation of hepatic EROD activity in flounder (*Platichthys flesus*) in the Dutch Wadden Sea. *Marine Environmental Research* 39, 231 - 234.
- Ekins, S., VandenBranden, M., Ring, B.J., Wrighton, S.A., 1997. Examination of purported probes of human CYP2B6. *Pharmacogenetics* 7, 165-179.
- Elbarbry, F., Wilby, K., Alcorn, J., 2006. Validation of a HPLC method for the determination of p-nitrophenol hydroxylase activity in rat hepatic microsomes. *Journal of Chromatography B* 834, 199-203.
- El-Sankary, W., Bombail, V., Gibson, G.G., Plant, N., 2002. Glucocorticoid-mediated induction of CYP3A4 is decreased by disruption of a protein: DNA interaction distinct from the pregnane X receptor response element. *Drug Metabolism and Disposition* 30, 1029-1034.
- Everaarts, J. M., Shugart, L. R., Gustin, M. K., Hawkins, W. E., Walker, W. W., 1993. Biological markers in fish: DNA integrity, hematological parameters and liver somatic index. *Marine Environmental Research* 35, 101–107.
- Flaws, J.A., Bush, T.L., 1998. Racial differences in drug metabolism: an explanation for higher breast cancer mortality in blacks? *Medical Hypotheses* 50, 327-329.
- Fletcher, G. L., King, M. J., Kiceniuk, J. W., Addison, R. F., 1982. Liver hypertrophy in winter flounder following exposure to environmentally oiled sediments. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C* 73, 457–462.
- Fink-Gremmels, J., 2008. Implications of hepatic cytochrome P450-related biotransformation processes in veterinary sciences. *European Journal of Pharmacology* 585, 502-509.
- Franco, A., Malavasi, S., Pranovi, F., Nasci, C., Torricelli, P., 2002. Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity and fluctuating asymmetry (FA) in *Zosterisessor ophiocephalus* (Teleostei, Gobiidae) as indicators of environmental stress in the Venice Lagoon. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 9, 239-247
- Galgani, F., Bocquéné, G., Luçon, M., Grzebyk, D., Letrouit, F., Claisse, D., 1991. EROD measurements

in fish from the northwest part of France. *Marine Pollution Bulletin* 22, 494-500.

Galgani, F., Payne, J. F., 1991. Biological effects of contaminants: microplate method for measurement of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) in fish. *ICES Tech. Marine Environmental Science* 13, 1-11.

Galgani, F., Bocquene, G., Truquet, P., Burgeot, T., Chiffolleau, J.F., Claisse, D., 1992. Monitoring of pollutant biochemical effects on marine organisms of the French coasts. *Oceanologica Acta* 15, 355-364.

Gentile, D.M., Tomlinson, E.S., Maggs, J.L., Park, B.K., Back, D.J., 1996. Dexamethasone metabolism by human liver in vitro. Metabolite identification and inhibition of 6-hydroxylation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 277, 105-112.

Giantin, M., Carletti, M., Capolongo, F., Pegolo, S., Lopparelli, R.M., Gusson, F., Nebbia, C., Cantiello, M., Martin, P., Pineau, T., Dacasto, M., 2008. Effect of breed upon cytochrome P450 and phase II enzyme expression in cattle liver. *Drug Metabolism and Disposition* 36, 885-893.

Giantin, M., Lopparelli, R.M., Zancanella, V., Martin, P., Polizzi, A., Gallina, G., Gottardo, F., Montesissa, C., Ravarotto, L., Pineau, T., Dacasto, M., 2009. Effects of illicit dexamethasone upon hepatic drug metabolizing enzymes and related transcription factors mRNAs and their potential use as biomarkers in cattle.

Accettato per la pubblicazione in *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Greco, W.R., Hakala, M.T., 1979. Evaluation of methods for estimating the dissociation constant of tight binding enzyme inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* 254, 12104-12109.

Griffin, D., 1999. Dietary management. In: Howard J., *Current Veterinary Therapy: Food Animal Practice*, Saunders Company, USA.

Gonzalez, F.J., 1992. Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends in pharmacological sciences* 13, 346-52.

Gorski JC, Vannaprasaht S, Hamman MA, Ambrosius WT, Bruce MA, Haehner-Daniels B, Hall SD., 2003. The effect of age, sex, and rifampin administration on intestinal and hepatic cytochrome P450 3A activity. *Clin Pharmacol Ther.* 74, 275-287.

Guengerich, F.P., 1996. In vitro techniques for studying drug metabolism. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 24, 521-33.

Guengerich, F.P., 1997. Comparison of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chemico-Biological Interactions* 106, 161-182.

- Guerzoni, S., Ferrari, G., Molinaroli, E., Rossini, P., Sarretta, A., 2004. Is the Lagoon of Venice healthy? A look at budgets and pathways of POPs in Venice. *Organohalogenated Compounds* 66, 1448–1454
- Guo, Z., Raeissi, S., White, R.B., and Stevens, J.C., 1997. Orphenadrine and Methimazole Inhibit Multiple Cytochrome P450 Enzymes in Human Liver Microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* 25, 390-393.
- Guo, L. Q., Taniguchi, M., Xiao, Y. Q., Baba, K., Ohta, T., and Yamazoe, Y., 2000. Inhibitory effect of natural furanocoumarins on human microsomal cytochrome P450 3A activity. *The Japanese Journal of Pharmacology* 82, 122–129.
- Gusson, F., Carletti, M., Giuliano Albo, A., Dacasto, M., Nebbia, C., 2006. Comparison of hydrolytic and conjugative biotransformations pathways in horse, cattle, pig, broiler chick, rabbit and rat liver subcellular fractions. *Veterinary Research Communication* 30, 271–283.
- Hanioka, N., Tatarazako, N., Jinno, H., Arizono, K., Ando, M., 2000. Determination of cytochrome P4501A activities in mammalian liver microsomes by high–performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* 744, 399–406.
- Hartl, M.G., 2002. Benthic Fish as Sentinel Organisms of Estuarine Sediment Toxicity. *The Vienna School of marine Biology: A Tribute to Jörg Ott*. Facultas Universitätsverlag: pp. 89-100.
- Hao, M., Zhao, Y., Chen, P., Huang, H., Liu, H., Jiang, H., Zhang, R., Wang, H., 2008, Structure-activity relationship and substrate-dependent phenomena in effects of ginsenosides on activities of drug-metabolizing P450 enzymes. *PLoS ONE* 3, e2697.
- He XJ, Ejiri N, Nakayama H, Doi K., 2005a. Changes in cytochrome P450 isozymes (CYPs) protein levels during lactation in rat liver. *Exp Mol Pathol.* 79, 224-228.
- He XJ, Ejiri N, Nakayama H, Doi K., 2005b. Effects of pregnancy on CYPs protein expression in rat liver. *Exp Mol Pathol.* 78, 64-70.
- Hellum, B.H., Nilsen, O.G., 2008, In vitro inhibition of CYP3A4 metabolism and P-glycoprotein-mediated transport by trade herbal products. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102, 466-475.
- Hickman, D., Wang, J., Wang, Y., Unadkat, J.D., 1998. Evaluation of the selectivity of in vitro probes and suitability of organic solvents for the measurement of human cytochrome P450 monooxygenase activities. *Drug Metabolism and Disposition* 26, 207–215.

Hijazi, Y., Boulieu, R., 2002. Contribution of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 isoforms to N-demethylation of ketamine in human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* 30, 853-8.

Holdway, D. A., Brennan, S. E., Ahokas, J. T., 1994. Use of hepatic MFO and blood enzyme biomarkers in sand flathead (*Platycephalus bassensis*) as indicators of pollution in Port Phillip Bay, Australia. *Marine Pollution Bulletin* 28, 683-695.

Hylland, K., Nissen-Lie, T., Christensen, P. G., Sandvik, M., 1998. Natural Modulation of Hepatic Metallothionein and Cytochrome P4501A in Flounder, *Platichthys flesus* L. *Marine Environmental Research* 46, 51-55.

Ioannides, C., Parke, D.V., 1990. The cytochrome P450 I gene family of microsomal hemoproteins and their role in the metabolic activation of chemicals. *Drug Metabolism Reviews* 22, 1-85.

Ioannides, C. Ed. (1996). *Cytochromes P450 Metabolic and toxicological aspects*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Ioannides, C., 1998. Effect of diet and nutrition on the expression of cytochrome P450. *Xenobiotica* 29, 109-154.

Ioannides, C., 2006. Cytochrome P450 expression in the liver of food-producing animals. *Current Drug Metabolism* 7, 335-348.

Istasse, I., De Haan, V., Van Enaeme, C., Buts, B., Baldwin, P., Gielen, M., Demeter, D., Bienfait, J.M., 1989. Effects of dexamethasone injections on performance in a pair of monozygotic cattle twins. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 62,150-158

Johnson, B.J., Chung, K.Y. , 2007. Alterations in the physiology of growth of cattle with growth-enhancing compounds. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practise* 23, 321-332.

Kaltenbach, C.C., Dunn, T.G., 1984. Endocrinologia della riproduzione. In: Hafez E.S.E., *Biologia e Tecnologia della Riproduzione nelle Specie Animali di Interesse Zootecnico*, Editoriale Grasso, Bologna.

Kamanga-Sollo, E., Pampusch, M.S., Xi, G., White, M.E., Hathaway, M.R., Dayton, W.R., 2004. IGF-I mRNA levels in bovine satellite cell cultures: effects of fusion and anabolic steroid treatment. *Journal of Cell Physiology* 201, 181-9.

Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L., 1997. Appendix VIII. Blood analyte reference values in large animals. In: Kaneko, J.J., Harvey, J.W. and Bruss, M.L. (Eds.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Fifth Edition. Academic press, San Diego, CA, pp.890-891.

Kawamoto, T., Kakizaki, S., Yoshinari, K., Negishi, M., 2000. Estrogen activation of the nuclear orphan receptor CAR (constitutive active receptor) in induction of the mouse Cyp2b10 gene. *Molecular Endocrinology* 14, 1897-1905.

Kennedy, S.W., Lorenzen, A., James, C.A., Collins, B.T., 1993. Ethoxyresorufin-O-deethylase and porphyrin analysis in chicken embryo hepatocyte cultures with a fluorescence multiwell plate reader. *Analytical Biochemistry* 211, 102-112.

Kiyosawa, N., Kwekel, J.C., Burgoon, L.D., Williams, K.J., Tashiro, C., Chittim, B., Zacharewski, T.R., 2008. o,p'-DDT elicits PXR/CAR-, not ER-, mediated responses in the immature ovariectomized rat liver. *Toxicological Sciences* 101, 350-363.

Kostrubsky, V.E, Ramachandran, V., Venkataramanan, R., Dorko, K., Esplen, J.E., Zhang, S., Sinclair, J.F., Wrighton, S.A., Strom, S.C., 1999. The use of human hepatocyte cultures to study the induction of cytochrome P-450. *Drug Metabolism and Disposition* 27, 887-894.

Lapis, P., Pass, G.J., McKinnon, R.A., Stupans, I., 2000. Characterisation of tolbutamide hydroxylase activity in the common brushtail possum, (*Trichosurus vulpecula*) and koala (*Phascolarctos cinereus*): inhibition by the Eucalyptus terpene 1,8-cineole. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 127, 351-357.

Lasserre, P., Marzollo, A. (Eds.), 2000. *The Venice Lagoon Ecosystem. Inputs and Interactions between Land and Sea*. UNESCO, Paris and The Parthenon Publishing Group, Lanens and N.Y. Press, pp. 1-508.

Leclercq, I., Desager, J.P., Vandenplas, C., Horsmans, Y., 1996. Fast determination of low-level cytochrome P450 1A1 activity by high-performance liquid chromatography with fluorescence or visible absorbance detection. *Journal of Chromatography B* 681, 227-232.

Li, X., Makela, S., Streng, T., Santti, R., Poutanen, M., 2003. Phenotype characteristics of transgenic male mice expressing human aromatase under ubiquitin C promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86, 469-476.

Lin, Y., Lu, P., Tang, C., Mei, Q., Sandig, G., Rodrigues, A.D., Rushmore, T.H., Shou, M., 2001. Substrate inhibition kinetics for cytochrome P450-catalyzed reactions. *Drug Metabolism and Disposition* 29, 368-374.

- Lin, H.L., Kent, U.M., Hollenberg, P.F., 2002. Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 3A4 by 17-alpha-ethynylestradiol: evidence for heme destruction and covalent binding to protein. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 301, 160-7.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.Y., Farr, A.L., Randall, R.Y., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.
- Ma, Y.M., Ma, Z.Q., Gui, C.Q., Yao, J.S., Sun, R.Y., 2003. Hepatotoxicity and toxicokinetics of ketoconazole in rabbits. *Acta Pharmacologica Sinica* 24, 778-782.
- Maradonna, F., Polzonetti, V., Bandiera, S.M., Migliarini, B., Carnevali, O., 2004. Modulation of the hepatic CYP1A1 System in the Marine Fish *Gobius niger*, Exposed to Xenobiotic Compounds. *Environmental science & Technology* 38, 6277–6282.
- Marcomini A., V. Bonamin, S. Degetto and A. Giacometti (1999). Occurrence of organochlorine pollutants in three dated sediment cores from the lagoon of Venice. *Organohaogenated Compounds*, 43, 373-382.
- Machala, M., Souček, P., Nečá, J., Ulrich, R., Lamka, J., Szota'kova', B., Ska'lova', 2003. Inter-species comparisons of hepatic cytochrome P450 enzyme levels in male ruminants. *Archives of Toxicology* 77, 555–560.
- McCune, J.S., Hawke, R.L., LeCluyse, E.L., Gillenwater, H.H., Hamilton, G., Ritchie, J., Lindley, C., 2000. In vivo and in vitro induction of human cytochrome P4503A4 by dexamethasone. *Clinical Pharmacology and Therapeutic* 68, 356–366.
- Merlanti, R., Gallina, G., Capolongo, F., Contiero, L., Biancotto, G., Dacasto, M., Montesissa, C., 2007. An in vitro study on metabolism of 17beta-boldenone and boldione using cattle liver and kidney subcellular fractions. *Analitica Chimica Acta* 586, 177-183.
- Miller, P.J., 1986. Gobiidae. In: Whitehead P.J.P., Buchot, M.L., Hureau, J.C., Nielsen, J., Tortonese, E. (eds.). *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*. Vol. 3, UNESCO, Paris: 1019-1085
- Miners, J.O., Smith, K.J., Robson, R.A., McManus, M.E., Veronese, M.E., Birkett, D.J., 1988. Tolbutamide hydroxylation by human liver microsomes. *Biochemical Pharmacology* 37, 1137-1144.
- Miners, J.O., Birkett, D.J., 1998. Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *British Journal of Clinical Pharmacology* 45, 525-538.

- Montesissa, C., Anfossi, P., van't Klooster, G., Mengelers, M., 1996. The use of cultured hepatocytes from goats and cattle to investigate xenobiotic oxidative metabolism. *Veterinary Research Communications* 20, 449-460.
- Mugford CA, Kedderis GL., 1998. Sex-dependent metabolism of xenobiotics. *Drug Metab Rev.* 30, 441-498.
- Moslemi, S., Seralini, G.E., 1997. Inhibition and inactivation of equine aromatase by steroidal and non-steroidal compounds. A comparison with human aromatase inhibition. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 12, 241-254.
- Nakamura, A., Yamamoto, Y., Tasaki, T., Sugimoto, C., Masuda, M., Kazusaka, A., Fujita, S., 1995. Anti-peptide antibodies to the P4502D subfamily in rat, dog and man. *Xenobiotica* 25, 1103-1109.
- Nebbia, C., 2001. Biotransformation enzymes as determinants of xenobiotic toxicity in domestic animals. *The Veterinary Journal* 161, 238-252.
- Nebbia, C., Dacasto, M., Rossetto Giaccherino, A., Giuliano Albo, A., Carletti, M., 2003. Comparative expression of liver cytochrome P450-dependent monooxygenases in the horse and in other agricultural and laboratory species. *The Veterinary Journal* 165, 53-64.
- Nebbia, C., Dacasto, M., Carletti, M., 2004. Postnatal development of hepatic oxidative, hydrolytic and conjugative drug-metabolizing enzymes in female horses. *Life Sciences* 74, 1605-1619.
- Nebert, D.W., Roe, A.L., 2000. Ethnic and genetic differences in metabolism genes and risk of toxicity and cancer. *The Science of the Total Environment* 274, 93-102.
- Northrop, D.B., 1998. On the meaning of *K_M* and *V_K*. *Journal of Chemical Education* 75, 1153-1157.
- Oesch-Bartlomowicz, B., Oesch, F., 2005. Phosphorylation of cytochromes P450: first discovery of a posttranslational modification of a drug-metabolizing enzyme. *Biochemical and Biophysical Research and Communications* 338, 446-449.
- Ogg, M.S., Williams, J.M., Tarbit, M., Goldfarb, P.S., Gray, T.J., Gibson, G.G., 1999. A reporter gene assay to assess the molecular mechanisms of xenobiotic-dependent induction of the human CYP3A4 gene in vitro. *Xenobiotica* 29, 269-279.
- Oikari, A., Nakari, T., 1982. Kraft pulp mill effluent components cause liver dysfunction in trout. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 28, 226-270.

- Palamanda, J., Feng, W.W., Lin, C.C., Nomeir, A.A., 2000. Stimulation of tolbutamide hydroxylation by acetone and acetonitrile in human liver microsomes and in a cytochrome P-450 2C9-reconstituted system. *Drug Metabolism and Disposition* 28, 38–43.
- Pampori, N.A., Shapiro, B.H., 1993. Sexual dimorphism in avian hepatic monooxygenases. *Biochemical Pharmacology* 46, 885-890.
- Parkinson, A., 1996. Biotransformation of xenobiotics. In: C.D. Klaassen (Eds.), *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science Of Poisons*. McGraw-Hill, New York, pp. 113-186.
- Pascussi, J.M, Drocourt, L., Fabre, J.M., Maurel, P., Vilarem, M.J., 2000a. Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid X receptor- α expression in human hepatocytes: synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators. *Molecular Pharmacology* 58, 361-372.
- Pascussi, J.M, Gerbal-Chaloin, S., Fabre, J.M., Maurel, P., Vilarem, M.J., 2000b. Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes: consequences on cytochrome P450 gene regulation. *Molecular Pharmacology* 58, 1441-1450.
- Pascussi, J.M., Gerbal-Chaloin, S., Drocourt, L., Maurel, P., Vilarem, M.J., 2003. The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochim Biophys Acta* 17, 243-53.
- Peffer, R.C, Moggs, J.G, Pastoor, T., Currie, R.A, Wright, J., Milburn, G., Waechter, F., Rusynm, I., 2007. Mouse liver effects of cyproconazole, a triazole fungicide: role of the constitutive androstane receptor. *Toxicological Sciences* 99, 315–325.
- Poels, C. L. M., Van Der Gaag, M. A., Van De Kerkhoff, J. F. J., 1980. An investigation into the long-term effects of Rhine water on rainbow trout. *WaterResearch* 14, 1029–1035.
- Pohl, R.J., Fouts, J.R., 1980. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Analytical Biochemistry* 107, 150-155.
- Poulos, T.L., 1991. Modeling of mammalian P450s on basis of P450cam X-ray structure. *Methods in Enzymology* 206, 11-30.
- Rahman, A., Korzekwa, K.R., Grogan, J., Gonzalez, F.J., Harris, J.W., 1994. Selective biotransformation of taxol to 6 alpha-hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. *Cancer Research* 54, 5543-5546.

- Ramsak, A., Stopar, K., Sepcic, K., Berden-Zrimec, M., Bajit, O., Malej, A., 2007. Reflection of hydrocarbon pollution on hepatic EROD activity in the black goby (*Gobius niger*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 24, 304-310.
- Rendic, S., Nolteernsting, E., Schänzer, W., 1999. Metabolism of anabolic steroids by recombinant human cytochrome P450 enzymes. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of metabolites. *Journal of Chromatography B* 735, 73-83.
- Ringel, M., Oesch, F., Gerl, M., Klebach, M., Quint, M., Bader, A., Böttger, T., Hengstler, J.G., 2001. Permissive and suppressive effects of dexamethasone on enzyme induction in hepatocyte co-cultures. *Xenobiotica* 32, 653-666.
- Reidy, G. F., Mehta, I., Murray, M., 1989. Inhibition of oxidative drug metabolism by orphenadrine: in vitro and in vivo evidence for isozymespecific complexation of cytochrome P-450 and inhibition kinetics. *Molecular Pharmacology* 35, 736-743.
- Roberts, E. S., Hopkins, Eddy, N., Foroozesh, M., Alworth, W. L., Halpert, J. R., Hollenberg, P. F., 1997. Inactivation of Cytochrome P450s 2B1, 2B4, 2B6, and 2B11 by Arylalkynes. *Drug Metabolism and Disposition* 25, 1242-1248.
- Roy, H.P., 2007. Pharmacogenetic Studies of Antidepressant Response: How Far from the Clinic? *Psychiatric Clinics of North America* 30, 125-138.
- Ryan, D.E., and Lewin, W., 1990. Purification and characterization of hepatic microsomal P-450. *Pharmacology and Therapeutics* 45, 153-239.
- Sallovitz, J., Lifschitz, A., Imperiale, F., Pis, A., Virkel, G., Lanusse, C., 2002. Breed differences on the plasma availability of moxidectin administered pour-on to calves. *Veterinary Journal* 164, 47-53.
- Schimmer, B.P., Parker, K.L., 2006. "Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones" in "Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics 11th Ed." (editors: Brunton L., Lazo J., Parker K.L.) McGraw Hill, New York
- Schmelzer, E., Acikgoez, A., Frühauf, N.R., Crome, O., Klempnauer, J., Christians, U., Bader, A., 2006. Biotransformation of cyclosporin in primary rat, porcine and human liver cell co-cultures. *Xenobiotica* 36, 693-708.
- Schmidely, P., 1993. Quantitative bibliographic review on the use of anabolic hormones with steroidogenic action in ruminants for meat production. II. Principal mode of action. *Reproduction Nutrition Development* 33, 297-323.

Schwerin, M., Kuehn, C., Wimmers, S., Walz, C., Goldammer, T., 2006. Trait-associated expressed hepatic and intestine genes in cattle of different metabolic type: putative functional candidates for nutrient utilization. *Journal of American Breeding and Genetics* 123, 307–314.

Sidhu, J.S., Omiecinski, C.J., 1995. cAMP-associated inhibition of phenobarbital-inducible cytochrome P450 gene expression in primary rat hepatocyte cultures. *Journal of Biology* 270, 12762-73.

Silver, G, Reid, LM, Krauter, K.S., 1990. Dexamethasone-mediated regulation of 3-methylcholanthrene-induced cytochrome P-450d mRNA accumulation in primary rat hepatocyte cultures. *The Journal of Biological Chemistry* 265, 3134-3138.

Sinclair, P.A., Hancock, S. Gilmore, W.J., Squires, E.J., 2005. Metabolism of the 16-androstene steroids in primary cultured porcine hepatocytes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 96, 79-87.

Sivapathasundaram, S., Magnisali, P., Coldham, N.G., Howells, L.C., Sauer, M.J., Ioannides, C., 2001. A study of the expression of the xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 proteins and of testosterone metabolism in bovine liver. *Biochemical Pharmacology* 62, 635-645.

Sivapathasundaram S., Sauer M.J., Ioannides C., 2003. Xenobiotic conjugation system in deer compared with cattle and rat. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 134, 169–173.

Sloof, W., van Kreijl, C.F., Baars, A.J., 1983. Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquatic Toxicology* 4, 1–14.

Skaanild, M. T., e Friis, C., 2002. Is Cytochrome P450 CYP2D Activity Present in Pig Liver? *Pharmacology & Toxicology* 91, 198-203.

Szotáková, B., Baliharová, V., Lamka, J., Nožinová, E., Wsól, V., Velík, J., Machala, M., Nec, J., Soucek, P., Šusová, S., Skálová, L., 2004. Comparison of in vitro activities of biotransformation enzymes in pig, cattle, goat and sheep. *Research in Veterinary Science* 76, 43–51.

Stabenfeldt, G.H., 2002. Attività riproduttiva della femmina. In: Swenson MJ, Reece WO, Duke's Fisiologia degli Animali Domestici, Idelson-Gnocchi, Italia

Tang, C., Shou, M., Rodrigues, D., 2000. Substrate-dependent effect of acetonitrile on human liver microsomal cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) activity. *Drug Metabolism and Disposition* 28, 567-572.

Timbrell, J.A., 1982. Principles of biochemical toxicology, Taylor and Francis, London.

Tirona, R.G., Lee, W., Leake, B.F., Cline, C.B., Lamba, V., Parviz, F., Duncan, S.A., Inoue, Y., Gonzalez, F.J., Schuetz, E.G., Kim, R.B., 2003. The orphan nuclear receptor HNF4 α determines PXR- and CAR-mediated xenobiotic induction of CYP3A4. *Nature Medicine* 9, 220-224.

Tydèn, E., Olseèn, L., Talkvist, J., Tjälve, H., Larsson, P., 2007. Cytochrome P4503A, NADPH cytochrome P450 reductase and cytochrome *b5* in the upper airways in horse. *Research in Veterinary Science* 85, 80-85.

Tsuchiya, Y., Nakajima, M., Yokoi, T., 2005. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Letters* 227, 115-124.

Tsuchiya, Y., Nakajima, M., Takagi, S., Taniya, T., Yokoi, T., 2006. MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1. *Cancer Research* 66, 9090–9098.

Van't Klooster, G.A.E., Woutersen-van Nijnanten, F.M.A., Klein, W.R., Blaauboer, B.J., Noordhoek, J., van Miert, A.S.J.P.A.M., 1992. Effects of various medium formulations and attachment substrata on the performance of cultured ruminant hepatocytes in biotransformation studies. *Xenobiotica* 22, 523-534.

Vegiopoulos, A., Herzig, S., 2007. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Molecular and Cellular Endocrinology* 275, 43-61.

Velík, J., Baliharová, V., Skálova, L., Szotáková, B., Wsól, V., Lamka, J., 2003. Stereospecific biotransformation of albendazole in mouflon and rat-isolated hepatocytes. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 26, 297-302.

Vignier, V., Vandermeulen, J.H., Fraser, A.J., 1992. Growth and food conversion by Atlantic salmon parr during 40 days' exposure to crude oil, *Transactions of the American Fisheries Society* 121, 322–332.

Vincenti, M., Girolami, F., Capra, P., Pazzi, M., Carletti, m., Gardini, G., Nebbia, C., 2009. Study of dexamethasone urinary excretion profile in cattle by LC-MS/MS: comparison between therapeutic and growth promoting administration. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 57, 1299-1306.

Walsky, R.L., Obach R.S., 2004. Validated assays for human cytochrome P450 activities. *Drug Metabolism and Disposition* 32, 647–660.

Wang, R.W., Lu, A.Y.H., 1997. Inhibitory Anti-Peptide Antibody Against Human CYP3A4. *Drug Metabolism and Disposition* 25, 762-767

- Waxman, D.J., Morrissey, J.J, Naik, S., Jauregui, H.O., 1990. Phenobarbital induction of cytochromes P-450. High-level long-term responsiveness of primary rat hepatocyte cultures to drug induction, and glucocorticoid dependence of the phenobarbital response. *Biochemical Journal* 271, 113-119.
- Weaver, R.J., Dickins, M., Burke D., 1995. Hydroxylation of the antimalarial drug 58C80 by CYP2C9 in human liver microsomes: comparison with mephenytoin and tolbutamide hydroxylations. *Biochemical Pharmacology* 49, 997-1004.
- Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J., Tillit, D.E., 2000. Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Reviews in Toxicology* 30, pp. 347-570.
- Williams, R.T., 1971. Biotransformation of xenobiotics: Phase I and Phase II Biotransformation. In: C.D. Klaassen (Eds.), *Toxicology: The Basic Science Of Poisons*. McGraw-Hill, New York, pp. 135-136.
- Williams, D.E., Lech, J.J. and Buhler, D.R., 1998. Xenobiotics and xenoestrogens in fish: modulation of cytochrome P450 and carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 399, 179-192.
- Williams, E.T., Leyk, M., Wrighton, S.A., Davies, P.J.A., Loose, D.S., Shipley, G.L., Strobel, H.W., 2004. Estrogen regulation of the cytochrome P450 3A subfamily in humans. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 31, 728-735.
- Williams, C.A., Lamprecht, E.D., 2008, Some commonly fed herbs and other functional foods in equine nutrition: a review. *Vet J* 178, 21-31.
- Witkamp, R., 1992. Oxidative drug metabolism in ruminants and laboratory species. (Tesi di dottorato), Utrecht.
- You, L., 2004. Steroid hormone biotransformation and xenobiotic induction of hepatic steroid metabolizing enzymes. *Chemico-Biological Interaction* 147, 233-246.
- Yuan, R., Madani, S., Wei, X., Reynolds, K., Huang, S., 2002. Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study in vitro drug interactions. *Drug Metabolism and Disposition* 30, 1311-1319.
- Zancanella, V., Giantin, M., Lopparelli, R.M., Patarnello, T., Dacasto, M., Negrisolo, E. Proposed new nomenclature fo bos taurus cytochrome P450 involved in xenobiotic drug metabolism. *Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics*, doi: 10.1111/j.1365-2885.2010.0117.x

Zeng, Z., Andrew, N.W., Arison, B.H., Luffer-Atlas, D., Wang, R.W., 1998. Identification of cytochrome P4503A4 as the major enzyme responsible for the metabolism of ivermectin by human liver microsomes. *Xenobiotica* 28, 313-321.

Zhou, S., Koh, H.L., Gao, Y., Gong, Z.Y., Lee, E.J., 2004a. Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. *Life Sciences* 74, 935-968.

Zhou, S.F., Zhou, Z.W., Yang, L.P., Cai, J.P., 2009. Substrates, Inducers, Inhibitors and Structure-Activity Relationships of Human Cytochrome P450 2C9 and Implications in Drug Development. *Curr Med Chem. Sep 1*. [Epub ahead of print].

Zhu, B.T., Lee, A.J., 2005. NADPH-dependent metabolism of 17beta-estradiol and estrone to polar and nonpolar metabolites by human tissues and cytochrome P450 isoforms. *Steroids* 70, 225-244.

Zweers-Zeilmaker, W.M., Horbach, G.J. and Witkamp, R.F., 1997. Differential inhibitory effects of phenytoin, diclofenac, phenylbutazone and a series of sulfonamides on hepatic cytochrome P4502C activity in vitro, and correlation with some molecular descriptors in the dwarf goat (*Caprus hircus aegagrus*). *Xenobiotica* 27, 769-780.

Zweers-Zeilmaker, W.M., Horbach, G.J., Witkamp, R.F., 1998a. Effects of non steroidal anti-inflammatory drugs and sulfonamides on hepatic cytochrome P4502C activity in vitro in goats and cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 21, 154-157.

Zweers-Zeilmaker, W.M., Van Miert, A.S.J.P.A.M., Horbach, G.J., Witkamp, R.F., 1998b. In vitro complex formation and inhibition of hepatic cytochrome P450 activity by different macrolides and tiamulin in goats and cattle. *Research in Veterinary Science*, 66, 51-55.

Ringraziamenti

Ringrazio *in primis* mio marito Andrea per l'enorme pazienza che ha avuto e per il sostegno che mi ha sempre dato durante questo percorso e non solo.

Ringrazio la mia famiglia, Marinella, Arduino e Chiara per l'aiuto che mi hanno dato e per essermi sempre stati vicini e per tutto quello che hanno fatto e sono certa continueranno a fare per me.

Ringrazio Francesca per aver creduto in me e avermi dato l'opportunità di fare il dottorato; grazie per avermi seguito e aiutato non solo dal punto di vista lavorativo ma anche umano.

Ringrazio Caterina ed Elisa perché sono state delle ottime compagne di viaggio durante questo percorso ed ho sempre potuto contare sulla loro amicizia.

Ringrazio Mery, Mauro e Rosa per le utili discussioni e per l'aiuto che mi hanno dato.

Ringrazio Eva, Pia e Hans per avermi dato l'opportunità di frequentare i vostri laboratori ed Eva e la sua famiglia in particolare per l'affetto che mi hanno dimostrato.

Ringrazio il Dr. Lorenzo Marini ed il Dr. Dario Gregori per l'indispensabile supporto statistico.

