

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 XX

**Marker urinari di trattamenti illeciti nel vitello:
il residuo, i suoi metaboliti e nuovi parametri fisiologici**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Marco Martini

Supervisore : Ch.ma Prof.ssa Clara Montesissa

Dottorando : Dott. Guglielmo Gallina

31 gennaio 2008

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	5
CAPITOLO 1	
Introduzione e scopo della tesi	8
CAPITOLO 2	
Variazione del rapporto testosterone epitestosterone nelle urine di vitello a carne bianca come marker di trattamenti illeciti	12
CAPITOLO 3	
Effetti dei trattamenti con desametazone sul rapporto 6β-idrossicortisolo e cortisolo nel bovino	44
CAPITOLO 4	
Influenza della dieta e del trattamento con boldenone e boldione sull'escrezione urinaria del boldenone e dei suoi metaboliti	65
CAPITOLO 5	
Studio <i>in vitro</i> del metabolismo del boldenone e del boldione nel bovino	91
CAPITOLO 6	
Identificazione di metaboliti idrossilati del boldenone in urine di vitelli trattati con boldenone e boldione: risultati preliminari	110
BIBLIOGRAFIA	115

RIASSUNTO

In questa tesi sono presentati i risultati di tre prove sperimentali svolte nell'ambito di un progetto di ricerca finalizzato a rafforzare le strategie di sorveglianza dei trattamenti illeciti nel bovino.

Nell'Unione Europea l'uso di promotori di crescita ad azione ormonale nell'allevamento dei bovini da carne è vietato al fine di tutelare la salute dei consumatori dalla presenza di residui potenzialmente pericolosi nelle carni. Per ottenere il rispetto del divieto imposto sono previsti dei piani di monitoraggio basati sulla ricerca nell'urina o in altre matrici biologiche dei residui delle sostanze che si presume siano utilizzate illecitamente. Come conseguenza dell'attività di sorveglianza si sono sviluppate alcune strategie di trattamento per eludere i controlli che prevedono, accanto all'uso di sostanze vietate, anche l'uso di sostanze autorizzate per finalità e a condizioni diverse da quelle previste. Alcuni metodi utilizzati per neutralizzare l'efficacia dei controlli sono: l'utilizzo di ormoni analoghi ai naturali (per esempio esteri di testosterone ed estradiolo) o loro precursori; l'utilizzo di combinazioni a bassissime dosi di diversi principi attivi ad azione analoga o sinergica (per esempio combinazioni di glucocorticoidi e β -agonisti) o l'utilizzo di molecole sintetizzate *ex novo*.

La sorveglianza dell'uso dei promotori di crescita richiede quindi, oltre alla disponibilità di metodi analitici per la ricerca dei residui delle sostanze usate in modo illegale, anche un aumento delle conoscenze del metabolismo dei principi attivi somministrati e di stabilire con precisione i livelli fisiologici degli ormoni endogeni nelle diverse matrici analizzate.

Le primi due prove sperimentali oggetto della tesi sono state finalizzate a sviluppare dei test di screening alternativi, complementari a quelli già esistenti di semplice "ricerca del residuo" delle sostanze vietate, per evidenziare un effetto dei promotori di crescita ad attività ormonale sul pattern di escrezione urinaria di alcuni steroidi endogeni (testosterone e epitestosterone; 6β idrossicortisolo e cortisolo). Il terzo studio ha approfondito il metabolismo *in vitro* e *in vivo* del boldenone per individuare marcatori di trattamento diversi dal residuo del composto progenitore (parent compound) ma ad esso correlati.

Nella prima parte della tesi sono presentati i risultati della valutazione delle concentrazioni fisiologiche urinarie di testosterone (T) ed epitestosterone (epiT) in vitelli a carne bianca. Attualmente non sono disponibili dei metodi per identificare l'uso di androgeni naturali nel bovino attraverso il monitoraggio dell'escrezione urinaria di T perché non esistono dei valori fisiologici accettati in base ai quali identificare una alterazione causata da un trattamento

esogeno. Nell'uomo invece, dato che l'escrezione urinaria di epiT è uguale o appena inferiore a quella del T e poichè dopo la somministrazione esogena di T, l'epiT urinario rimane costante o diminuisce mentre il T aumenta, è stato possibile stabilire che un aumento del rapporto T/epiT oltre un valore soglia pari a 6 è indicativo di una somministrazione esogena di T. Per valutare se anche nel vitello a carne bianca questo rapporto urinario sia utile per identificare dei trattamenti ormonali i livelli di T ed epiT urinari sono stati valutati contemporaneamente in tre gruppi di vitelli (controllo -K; trattati con 17 β -estradiolo benzoato e testosterone enantato - A; trattati con 17 β -estradiolo benzoato e boldenone undecilinato -B). mediante analisi con cromatografia liquida (LC) associata alla spettrometria di massa (MS-MS). Sebbene sia stata rilevata una elevata variabilità individuale nell'escrezione urinaria delle due molecole per tutto il periodo sperimentale, in tutti gli animali controllo e trattati, i risultati ottenuti evidenziano una notevole differenza nell'escrezione di T ed epiT nel vitello rispetto all'uomo. Nel bovino, a differenza di quanto accade nell'uomo l'enzima 17 α -idrossisteroide ossidoriduttasi è particolarmente attiva e di conseguenza l'epiT è il principale metabolita del T; probabilmente a causa di questa grande differenza di escrezione nel vitello rispetto all'uomo, considerando il rapporto T/epiT non sono state evidenziate differenze significative causate dai trattamenti. Considerando il rapporto epiT/T è stato possibile invece evidenziare la riduzione dell'epiT nel gruppoA confermando l'ipotesi di un'influenza del T esogeno sulla produzione di epiT endogeno (Ferchaud *et al.*,2000).

La seconda parte della tesi riguarda il possibile impiego di altri composti endogeni sempre escreti con le urine per l'identificazione di trattamenti illeciti. In particolare in questo caso quale marker di trattamenti illeciti con corticosteroidi nel bovino da carne è stato scelto il rapporto urinario delle concentrazioni di 6 β idrossicortisolo e cortisolo (6 β OH-F/F). Il desametasone, con un effetto di feedback negativo sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene è infatti in grado di influenzare la sintesi del cortisolo e quindi anche quella del suo metabolita 6 β OH-F. Per capire se la valutazione del rapporto 6 β OH-F/F fosse applicabile nel bovino per l'individuazione di trattamenti illeciti si è proceduto alla valutazione di questo rapporto nelle urine raccolte durante una sperimentazione in cui gli animali erano stati trattati con desametasone per via orale a bassa dose e a dose maggiore per via intramuscolare.

La ricerca e la quantificazione del 6 β OH-F è stata effettuata con metodica ELISA, mentre la ricerca e la quantificazione del F è stata effettuata con metodica RIA. I risultati preliminari ottenuti indicano una differenza significativa tra il rapporto 6 β OH-F/F degli animali controllo e degli animali trattati per via orale con desametasone. Questo risultato suggerisce che la valutazione del rapporto 6 β OH-F/F potrebbe essere applicabile come test di screening rapido

e non invasivo per il monitoraggio dei trattamenti per via orale a basse dosi con corticosteroidi.

Nell'ultima parte della tesi sono presentati i risultati di uno studio condotto con 17β -boldenone, uno steroide androgeno dotato di attività anabolizzante, in un gruppo di vitelli a carne bianca. Lo scopo era duplice: evidenziare l'effetto della dieta con diverso contenuto in fitosteroli e del trattamento orale con una combinazione di 17β -boldenone (17β -bold) e boldione (ADD) sull'eliminazione urinaria del 17β -bold (precursore attivo), del 17α Bold (metabolita inattivo) e di ADD (precursore e intermedio). Le urine raccolte durante la sperimentazione da animali controllo e trattati sono state analizzate con un metodo LC-MS-MS. I risultati ottenuti confermano che il 17α -bold può essere anche di origine "endogena" in quanto sempre presente anche in urine di animali sicuramente non trattati e che la sua escrezione urinaria è proporzionale alla percentuale di fitosteroli della dieta. In caso di trattamento il maggiore metabolita del 17β -bold è il 17α -bold ma la presenza contemporanea di 17β -bold in forma coniugata è conferma di un trattamento illecito.

Poiché è sperimentalmente emerso che in caso di trattamento per via orale, anche prolungato il 17β -bol coniugato non è più riscontrabile nelle urine a soli due giorni dalla sospensione del trattamento, si è evidenziata la necessità di continuare le ricerche per identificare un ulteriore marker di trattamento che sia identificabile per un periodo di tempo più prolungato e quindi in grado di rivelare trattamenti pregressi e non solo in atto al momento del prelievo. Per individuare nuovi metaboliti 17β bold che possono essere eliminati *in vivo* con le urine e verificare con precisione i diversi passaggi che portano alla formazione e all'interconversione del 17β -bol e del 17α -bol da ADD e viceversa è stato utilizzato un approccio semplificato *in vitro* con l'utilizzo di frazioni subcellulari epatiche.

Lo scopo principale dell'attività svolta è stato quello di separare mediante cromatografia liquida (HPLC) i metaboliti prodotti *in vitro*, dopo aver incubato 17β bold e ADD con frazioni subcellulari ottenute da fegati di vitelli a carne bianca e successivamente identificarli tramite LC-MS-MS. In particolare incubando il solo 17β -bol sono stati identificati 3 metaboliti idrossilati del 17β -bol (due dei quali identificati come 6β e $16\alpha,17\beta$ -bol) ed è stata rilevata la produzione di ADD. Nelle incubazioni con solo ADD sono stati identificati un metabolita idrossilato dell'ADD, il $6\beta,17\beta$ -bol ed è stata rilevata la produzione di 17β -bol e tracce di 17α -bol, che *in vivo* nel bovino è invece considerato il maggiore metabolita del 17β -bol.

I risultati preliminari della ricerca dei metaboliti idrossilati del boldenone in urine di vitelli trattati con 17β -bol ha portato all'identificazione del $6\beta,17\alpha$ bol che si candida ad essere quindi un possibile marker del trattamento con 17β -bol in aggiunta alla forma coniugata del 17β -bol.

ABSTRACT

In the EU the use of hormonal substances is prohibited in cattle fattening to avoid consumer exposure to unforeseeable risks from the intake of hormone residues and their metabolites. National Surveillance Plans for steroid abuse adopted the detection of the parent compound in urine and other sample matrices but, in spite of the progress in analytical techniques which allows to obtain very low detection limits for individual residues, this strategy may be unsuccessful; the use of natural hormones or of hormone precursors, the use of a combination of different active principles either at very low dosages or of unknown chemical structure are a few examples of procedures to escape the analytical controls. So effective surveillance and monitoring of the ban requires not only the availability of validated analysis methods for screening and confirmation of hormone residues in urine and other sample matrices but also knowledge about the absorption, biotransformation and excretion kinetics of illegally administered hormones, as well as endogenous levels of hormones in these sample matrices and also to develop complementary screening tests based on the biological action(s) of the substance(s) under investigation.

Aim of the thesis was to study the application of traditional analytical methods like LC/MS-MS , RIA and ELISA to detect to study the pattern of excretion of some urinary steroids in calves as marker of illicit treatments.

In the first part of this thesis is presented a preliminary assessment of physiological concentrations of testosterone (T) and epitestosterone (epiT) in urine of veal calves. Current methods to detect the misuse of natural androgens in cattle do not involve evaluation of urinary content of testosterone (T) because no validated physiological levels are set and threshold values cannot be fixed. In man urinary excretion of epiT occurs at similar or slightly lower concentration than that of T. Because of after exogenous T administration urinary epiT remains rather constant or decreases, while T increases, a threshold value of the ratio $T/epiT = 6$, in urine, was established as a limit for doping control in athletes. To evaluate whether urinary ratios could be useful for surveillance of exogenous hormone treatments also in calves urine samples were collected from control calves and from calves treated with oestradiol plus testosterone or oestradiol plus boldenone and urinary concentration of T and epiT was assessed by LC-MS/MS analysis. In all urine samples collected from control and treated animals the epiT concentrations were by far greater than T. EpiT may be considered one of the major urinary metabolites of T. Thus when the $T/epiT$ ratio was calculated using the same

approach adopted for doping control in man, no significant differences could be observed between treated and control calves. It is likely that the paramount difference between E and T concentrations masked the effect of treatment. Recent data, suggested that in calves repeated treatments with natural hormones could cause a time-course reduction of urinary E. Adopting the E/T ratio, the reduction of E urinary excretion can be confirmed in Testosterone treated calves (A) but still no evident in Boldenone treated ones.

The second part of this thesis deals with the identification of administration of a glucocorticoids like dexamethasone, (DXM) which is often illegally used as a growth promoters. To identify indirect biomarkers of illicit treatments, the urinary ratio between 6beta-hydroxycortisol (6 β -OHF) and cortisol (F), was measured in urines obtained from bulls experimentally treated *per os* and intramuscularly (im) with different DXM dosages. Dexamethasone, given *per os* at low doses elicited an early and lasting significant reduction of 6beta-OHF/F. No significant variations were seen in urines from bulls given DXM intramuscularly. These results suggest 6beta-OHF/F as a rapid, non invasive, screening test for oral, low-dose, long-term corticosteroid treatment in cattle.

The last part regards the results of a study aiming to clarify the natural occurrence and the metabolism of boldenone in cattle.

The residue profiles of 17 α -/17 β -boldenone conjugated (17 α / β -Bol) and ADD were investigated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in urine of male veal calves fed two commercial milk replacers, with different content of phytosterols and administered with 17 β -Bol and ADD *per os*. The presence of conjugate 17 α -Bol, ubiquitous and at higher concentrations in urine from control calves receiving the milk replacer with the greater amount of plant sterols support the theory that 17 α -Bol is diet-related. In urine from treated animals the much higher 17 α -Bol levels were not modified by the production from diet precursors. The results confirmed the urinary excretion of 17 β -Bol is due to exogenous administration of 17 β -Bol. The discontinuous rate of elimination of both 17 α - and 17 β -Bol, despite the daily administration of 17 β -Bol plus ADD, indicates the necessity for further research to detect other urinary boldenone metabolites to strength surveillance strategy.

To identify metabolites as *in vivo* markers to support the thesis of exogenous administration, a further approach to the *in vitro* biotransformation of 17 β -Bol and ADD was performed using different subcellular fractions obtained from both liver and kidney of untreated cattle. Metabolites obtained from incubated parent compounds were separated by

liquid chromatography (HPLC) elution and successively identified by mass spectrometry (LC-MS/MS) detection. The bovine liver was the target tissue of the main metabolic reaction transforming 17β -Bol to ADD and *viceversa*. The analysis of the incubation extracts detected the presence of polar hydroxylated (m/z 303) derivatives of 17β -Bol, 17α -Bol and ADD. The results indicated that the urinary excretion profile *in vivo* of 6β -hydroxy- 17β -Bol, 16α -hydroxy- 17β -Bol and 6β -hydroxy- 17α -Bol could be studied together with 17α - and 17β -BOLD as putative markers of 17β -Bol treatment in cattle.

Preliminary results of investigation regarding the presence of the hydroxylated metabolites in urine of calves treated with boldenone shown, even though additional studies are in due course, candidate 6β -hydroxy- 17α -Bol as new potential marker of anabolic abuse of boldenone.

CAPITOLO 1

Introduzione e scopo della tesi

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 delle sostanze ad azione ormonale negli animali da produzione e ne ha ribadito il completo divieto d'uso come promotori di crescita. L'adozione di questa misura è stata 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 dell'SVCH.

Poiché in generale tutte le sostanze farmacologicamente attive possono avere delle ricadute sulla salute pubblica se utilizzate nell'allevamento degli animali produttori di derrate alimentari, l'utilizzo di tutti i medicinali veterinari è regolamentato dalla direttiva 2004/288/EC. Questa direttiva prevede come prerequisito per ottenere l'autorizzazione all'immissione in commercio di un medicinale veterinario destinato agli animali da produzione l'inserimento di una sostanza farmacologicamente attiva negli Allegati I e III del Regolamento 2377/90; cioè, è necessario che siano stati definiti, per il principio attivo in questione, dei limiti massimi residuali (LMR) al fine di poter garantire la sicurezza dei consumatori finali delle derrate alimentari.

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/EC 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. Le sostanze oggetto dei piani di sorveglianza vengono classificate in due gruppi: Categoria A e Categoria B. Nella categoria A sono incluse le sostanze ad effetto

anabolizzante (stilbeni, agenti antitiroidei, steroidi, lattoni dell'acido resorcilico, β -agonisti) regolamentate dalla direttiva 96/22 e le sostanze non autorizzate incluse nell'allegato IV del Regolamento 2377/90 (come per esempio il cloramfenicolo e i nitrofurani). Nella categoria B oltre agli agenti contaminanti e i pesticidi sono inclusi i medicinali veterinari autorizzati e per cui sono stati fissati dei LMR. Considerando il fenomeno dei trattamenti illegali con promotori di crescita nel settore dell'allevamento del bovino da carne, i prelievi e le analisi effettuati durante il PNR hanno lo scopo sia di identificare la presenza di sostanze vietate, quali per esempio le sostanze ad azione estrogenica, androgenica o gestagena, sia di verificare che l'utilizzo delle sostanze autorizzate avvenga nel rispetto delle modalità di impiego e dei tempi di sospensione previsti per un effettivo rispetto dei LMR previsti nei prodotti di origine animale destinati all'alimentazione.

L'utilizzo dei promotori di crescita ad azione ormonale nel settore dell'allevamento dei bovini da carne anche se in EU 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 (Johnson, 2007). Esistono molti studi che dimostrano l'efficacia di questi principi attivi come promotori di crescita nei bovini e l'uso di 17β -estradiolo, zeranolo, testosterone, trembolone, progesterone e melengestrololo è autorizzato in molti paesi al di fuori dell'UE, tra cui gli USA. Tra gli altri Preston *et al.* (1999) indicano che le sostanze ormonali naturali e sintetiche utilizzate possono aumentare l'indice di crescita (dal 10 al 30%), l'efficacia di ingrasso (dal 5 al 15%) e la magrezza delle carni (dal 5 al 8%); il guadagno in termini di peso può essere tra l'8 e il 20 % a seconda del sesso, della strategia di impianto e del tipo di alimentazione (Henricks *et al.*, 1997).

Secondo i dati dei piani di sorveglianza del 2004 all'interno dell'Unione Europea l'uso di agenti promotori di crescita nell'allevamento del bovino (comprendendo in questa categoria: steroidi sessuali, β -agonisti e corticosteroidi) non dovrebbe rappresentare un problema rilevante per la sanità pubblica veterinaria. Sul totale dei campioni analizzati la percentuale di quelli risultati non conformi è pari allo 0.06%. In termini assoluti le segnalazioni di non conformità riscontrate sono state: per la presenza di steroidi 75; per i β -agonisti 45; per i corticosteroidi 64 (per la maggioranza dovute a desametasone) (Serratosa *et al.*, 2006). I risultati ottenuti dai piani di screening istologico sugli organi bersaglio sensibili all'azione delle sostanze ad azione ormonale, quali le ghiandole sessuali accessorie (Groot *et al.*, 1998) prelevati in bovini regolarmente macellati e i riscontri forniti dalle analisi di preparazioni farmaceutiche clandestine sequestrate in numerosi paesi europei indicano che le dimensioni

del problema dell'utilizzo dei promotori di crescita nel bovino sono molto più ampie rispetto a quanto emerge dai controlli ufficiali (Nebbia, 2006).

L'ipotesi più probabile per spiegare questa discordanza tra i dati dei piani di sorveglianza ufficiale e quella che sembra essere la reale entità dell'uso illegale dei promotori di crescita è l'evoluzione che si è verificata 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 o 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 a causa di una considerevole metabolizzazione sono difficili da individuare (esempio: stanozololo); 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.

L'effettiva applicazione del divieto d'uso dei promotori di crescita quindi, oltre alla disponibilità di metodi analitici basati sulla ricerca dei residui delle sostanze vietate, richiede un aumento delle conoscenze del metabolismo dei principi attivi illegalmente somministrati, di stabilire con maggiore precisione i livelli fisiologici degli ormoni endogeni nelle diverse matrici analizzate e, in prospettiva, lo sviluppo di test di screening, complementari a quelli già esistenti, mirati ad evidenziare un effetto biologico delle sostanze impiegate illegalmente come promotori di crescita (Nielen *et al.*, 2007).

La presente tesi cerca di affrontare alcuni aspetti del fenomeno dei trattamenti illeciti nell'allevamento del vitello e nel vitellone da carne. I risultati presentati derivano dall'analisi, di campioni di urina provenienti da tre progetti *in vivo* condotti su vitelli e vitelloni durante i quali sono stati effettuati dei protocolli di trattamento sperimentale per simulare quelle che si ipotizzano esserle tra le modalità più diffuse con cui avvengono i trattamenti illeciti nel vitello. Nel primo progetto (presentato nel capitolo 2) dei vitelli a carne bianca sono stati trattati con un'associazione di un androgeno (naturali o di sintesi) e estradiolo per via sottocutanea; nel secondo progetto (presentato nel capitolo 3) dei vitelloni sono stati trattati con un farmaco autorizzato per il trattamento di diverse patologie, un glucocorticoide di sintesi (desametasone) per via orale o per via intramuscolare; nel terzo progetto (presentato nel capitolo 4) gli animali sono stati trattati con una miscela di androgeni di sintesi (boldenone ed ADD) per via orale. I primi due progetti hanno mirato a sviluppare dei test di screening

alternativi, complementari a quelli già esistenti di semplice ricerca dei residui delle sostanze vietate o come nel caso del desametasone, impiegate diversamente da quanto autorizzato, per evidenziare un effetto dei promotori di crescita sul pattern di escrezione urinaria di alcuni steroidi endogeni. Per raggiungere questo obiettivo sono stati applicati dei metodi analitici “classici” come la LC-MS/MS e le metodiche RIA e ELISA.

Per i trattamenti con mix di androgeni e estradiolo i parametri urinari che sono stati scelti, in base alle informazioni disponibili sul metabolismo degli steroidi nel bovino e sui metodi applicati nel controllo del doping nell’uomo, sono stati l’escrezione urinaria di testosterone e di epitestosterone con il duplice obiettivo di stabilire dei valori fisiologici nel vitello e valutare una eventuale variazione del loro rapporto in seguito ai trattamenti.

Nel progetto in cui i trattamenti sono stati effettuati con il desametasone (ricordiamo che il farmaco è autorizzato per l’uso in medicina veterinaria per trattamenti terapeutici in singoli animali e un ridotto numero di somministrazioni, ma non come promotore di crescita per trattamenti di massa) è stato valutato come indice indiretto di trattamento il rapporto tra il cortisolo urinario e di un suo metabolita il 6 β -idrossicortisolo.

L’obiettivo del terzo progetto è stato verificare l’influenza sull’escrezione urinaria del boldenone e dei suoi metaboliti nel vitello del contenuto in fitosteroli della dieta e del trattamento con boldenone. Lo scopo dello studio è stato contribuire a chiarire la possibile origine endogena o esogena del 17 β -boldenone nel bovino. Successivamente sono stati effettuati degli studi di metabolismo *in vitro* del boldenone per identificare dei possibili metaboliti urinari marker di trattamento.

I principi attivi, le dosi e le modalità di somministrazione impiegate e infine anche i parametri analizzati sono state diversi in ciascun progetto, ma il disegno sperimentale di ogni progetto è stato quello in primo luogo di raccogliere informazioni sui valori basali nel vitello dei parametri andati a monitorare e successivamente verificare se i parametri considerati possano essere significativi per identificare un eventuale trattamento illecito.

CAPITOLO 2

Variazione del rapporto testosterone epitestosterone nelle urine di vitello a carne bianca come marker di trattamenti illeciti

Per una effettiva applicazione del divieto dell'uso di sostanze ad azione ormonale come promotori di crescita nell'allevamento del bovino previsto dalla Direttiva 2003/74/CE è necessario che siano disponibili degli adeguati metodi analitici sia di screening che di conferma che permettano di identificare le sostanze vietate nei diversi campioni biologici analizzati nel corso delle attività di sorveglianza (Nielen *et al.*, 2004). A questo proposito, come è possibile verificare in letteratura, anche nel campo della sorveglianza dell'uso degli ormoni nel bovino, sotto la spinta della Decisione 2002/657/EC che ha previsto dei nuovi criteri sia per la validazione dei metodi analitici che per l'interpretazione dei risultati ottenuti, le prestazioni dei metodi analitici sono notevolmente migliorate ed è sempre più frequente l'applicazione di metodi multiresiduali che permettono di monitorare la presenza di numerosi principi attivi contemporaneamente, diminuendo in questo modo i tempi e i costi di analisi (Van Peteghem *et al.*, 2006). Per esempio, applicando la gas cromatografia associata alla spettrometria di massa tandem (GC-MS-MS) è stato sviluppato un metodo di screening per la ricerca simultanea nell'urina di bovino nel corso della stessa analisi di venti ormoni sintetici (Impens *et al.*, 2007); un altro metodo di analisi proposto utilizza la LC/TOFMS (cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa a tempo di volo) per la ricerca nell'urina di vitello di ventidue principi attivi tra cui glucocorticoidi, steroidi di sintesi e β -agonisti con una capacità di rilevazione di 2 ng/mL (Touber *et al.*, 2007).

L'applicazione di nuovi metodi analitici o il miglioramento delle prestazioni di quelli già in uso dovrebbe essere affiancato ad un incremento delle informazioni a disposizione riguardanti l'assorbimento, la biotrasformazione e la cinetica di eliminazione degli ormoni illegalmente amministrati e dei livelli endogeni degli ormoni presenti nei diversi campioni biologici. Infatti se per i composti di origine sintetica per dimostrare un trattamento illegale, una volta stabilito che essi non sono presenti naturalmente nell'organismo dell'animale, è sufficiente confermare la presenza, nel sangue o nei tessuti o negli escreti, delle sostanze stesse o di loro metaboliti, per gli ormoni naturali, quali testosterone, estradiolo e progesterone (e per i loro metaboliti e precursori), che sono presenti fisiologicamente nell'organismo animale è necessario stabilire dei limiti (valori soglia) per poter distinguere tra

concentrazioni fisiologiche e eventuali effetti dei trattamenti (Scippo *et al.*, 1993). Nel bovino i dati sui livelli “basali“ degli ormoni naturali sono particolarmente difficili da ottenere sia perché i livelli fisiologici degli ormoni sono influenzati da numerosi fattori quali per esempio l'alimentazione, la razza, il sesso, l'età o il ritmo circadiano sia perché spesso i dati che si assume siano i livelli fisiologici provengono da un limitato numero di animali controllo oppure sono ricavati da analisi effettuate prima di un trattamento sperimentale o dopo un cospicuo periodo di tempo da esso, o addirittura, nella peggiore delle ipotesi, si assumono come livelli endogeni i valori ottenuti dai piani di monitoraggio (Nielen *et al.*, 2007). La carenza di dati sui livelli fisiologici degli ormoni naturali rende nel bovino il controllo del loro uso particolarmente difficile e infatti i dati a disposizione indicano come nelle preparazioni illegali utilizzate come promotori della crescita, gli ormoni naturali siano diventati tra gli ingredienti più comuni (Courtheyn *et al.*, 2002) appunto perché la loro somministrazione esogena non è facilmente dimostrabile. Nella maggior parte dei casi gli anabolizzanti sono somministrati ai bovini sotto forma di esteri (benzoato, propionato, palmitato, etc.) in soluzioni iniettabili a lento rilascio, come impianti sottocutanei o per via orale. Dopo idrolisi dell'estere, che avviene rapidamente già nel plasma, la forma libera segue il destino metabolico dei componenti naturali dell'organismo (Rico, 1983). Molte delle sostanze attualmente utilizzate nella pratica sono molecole appartenenti alla classe degli ormoni steroidei ad azione androgena (β -testosterone ma anche ADD, β -boldenone) a cui, per potenziarne l'effetto anabolizzante, vengono associati degli estrogeni, più frequentemente il 17β -estradiolo (Sillence, 2003).

Attualmente nel bovino il controllo dell'uso degli ormoni naturali prevede il monitoraggio delle concentrazioni plasmatiche del 17β -estradiolo, del 17β -testosterone e del progesterone (D. M. 14/11/96) ma non contempla nessuna indagine delle concentrazioni urinarie di questi ormoni. Per il plasma sono state stabilite, considerando le differenze dovute al sesso e all'età, delle concentrazioni massime accettabili il cui superamento porta a sospettare una somministrazione esogena di tali sostanze. Il presupposto che ha portato a stabilire tali limiti è che un eventuale trattamento con una delle sostanze sopra elencate, o con loro analoghi, dovrebbe causare un aumento delle concentrazioni plasmatiche rilevabili. Arts *et al.* (1991) hanno infatti evidenziato che a seguito di un trattamento con una combinazione di 17β -estradiolo e 17β -testosterone su un gruppo di vitelli a carne bianca il livello plasmatico e urinario di 17β -estradiolo aumentava rispetto agli animali controllo consentendo di stabilire un valore soglia al di sopra del quale sospettare un trattamento illecito. Questi risultati sono

stati confermati, anche con protocolli di trattamento diversi, sia per il plasma che per l'urina da Scippo *et al.* (1993) e da Simontacchi *et al.* (2004) solo per il plasma.

I trattamenti con 17β -testosterone da solo o in combinazione con 17β -estradiolo non sembrano invece causare un aumento dei livelli plasmatici ed urinari di 17β -testosterone che risultano essere addirittura più bassi di quelli degli animali di controllo (Arts *et al.* 1991; Scippo *et al.*, 1993) ma poichè i dati disponibili sull'escrezione urinaria del testosterone nel bovino indicano che la concentrazione di questa molecola nell'urina varia in un range molto ampio non è stato possibile al momento stabilire un valore soglia di riferimento da applicare alle analisi delle urine per identificare un trattamento. La situazione è ulteriormente complicata dal fatto che la categoria di bovini che si presume sia più frequentemente soggetta al trattamento con testosterone siano i vitelli a carne bianca, animali cioè che non hanno ancora raggiunto la completa maturità sessuale in cui il quadro ormonale cambia rapidamente nel corso del ciclo produttivo (Arts *et al.* 1991).

Il problema del controllo della somministrazione illegale di testosterone o di suoi precursori è presente anche nella medicina sportiva. Nell'uomo il doping con testosterone è stato descritto fin dagli anni cinquanta, ma fino al 1982 non è stato disponibile un test efficace per identificarlo; nell'uomo la somministrazione esogena di 17β -testosterone causa un aumento della sua concentrazione urinaria ma a causa della grande variabilità fisiologica dell'escrezione urinaria del 17β -testosterone stesso, all'interno della popolazione ma anche a livello individuale non è possibile stabilire un valore soglia oltre il quale identificare il doping (Saudan *et al.*, 2006). Donike *et al.* (1983), per primi, proposero di identificare l'uso del testosterone monitorando il rapporto tra testosterone ed epitestosterone (T/epiT). Testosterone ed epitestosterone differiscono chimicamente solo nella configurazione del gruppo idrossile sul C-17. L'epitestosterone è il 17α epimero del testosterone ed è presente nell'urina dell'uomo in concentrazione pari a quella del testosterone. L'epitestosterone non viene metabolizzato a testosterone e la somministrazione di testosterone esogeno abbassa la concentrazione di epitestosterone e quindi un aumento del rapporto T/E risulta da un aumento di testosterone ed un abbassamento di epitestosterone (Catlin *et al.*, 1997). Nel 1982 la Commissione Medica del CIO ha definito un rapporto T/E maggiore di 6:1 come dirimente tra il presunto limite massimo di un valore normale del rapporto T/E ed il doping con testosterone (Saudan *et al.*, 2006).

Nelle specie animali (quali il coniglio, la cavia, e il topo) che presentano un'elevata attività della 17α -idrossisteroide ossidoriduttasi, una parte sostanziale di epitestosterone deriva dalla semplice interconversione del testosterone ad androstenedione e, da questo, ad epitestosterone.

Questa interconversione non solo è specie-specifica, ma anche organo-specifica, per esempio nel topo si produce epitestosterone dai suoi precursori nel rene ma non nel fegato. Anche nella specie bovina l'attività della 17α -idrossisteroide ossidoriduttasi è molto efficiente, a differenza di quanto accade nell'uomo. È stato dimostrato come in bovini castrati maschi il 37% della conversione del testosterone in epitestosterone ha luogo nel sangue e nel fegato. L'epitestosterone, nel bovino, è quindi uno dei principali metaboliti del testosterone (Starka, 2003).

Lo scopo del presente lavoro è quello di determinare le concentrazioni urinarie di testosterone ed epitestosterone in vitelli non sottoposti ad alcun trattamento per incrementare le informazioni a disposizione sui valori fisiologici di questi ormoni cercando di chiarire in che modo la loro escrezione urinaria sia correlata e contemporaneamente verificare se i trattamenti con androgeni naturali e di sintesi associati all'estradiolo possano alterare direttamente o indirettamente, l'escrezione del testosterone e del suo metabolita epitestosterone. Seppur ancora su un numero ridotto di animali e di prelievi, si cercherà di valutare una possibile correlazione tra l'escrezione di testosterone e di epitestosterone in condizioni fisiologiche e di evidenziare eventuali modificazioni dell'escrezione di entrambi e del rapporto dovute ai trattamenti, così da definire eventualmente una soglia oltre o al di sotto della quale poter supporre la presenza di trattamenti illeciti in atto negli animali in allevamento.

Materiali e metodi

Reagenti e composti chimici

Tutti i solventi utilizzati erano di tipo “HPLC grade” e sono stati acquistati presso la Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ, USA). L’acqua è stata purificata da un sistema MILLI-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). L’enzima β -Glucuronidasi/arilsulfatasi (da *Helix pomatia*) è stato acquistato presso la Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Gli standard analitici di $17\beta/17\alpha$ -Testosterone e 17β -Testosterone-d2, 17β -Boldenone, 17β -Boldenone-d3 e ADD sono stati acquisiti dalla Steraloids (Newport, RI, USA). Lo standard di 17α -Boldenone è stato acquistato presso il RIVM (Bilthoven, The Netherlands). Tutti i sali utilizzati (analytical grade) sono stati acquistati presso la Sigma–Aldrich o presso la Mallinckrodt Baker.

Animali

Ventotto vitelli maschi di razza Frisona di sono stati stabulati presso l’Azienda Agricola Tagliata di Fossano (Cuneo) (Stabilimento Utilizzatore dell’Università di Torino). 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 ed allevati nel rispetto delle linee guida europee sul benessere animale.

La permanenza degli animali nella struttura indicata si è protratta per tutta la durata della prova sperimentale a partire da alcuni giorni di vita (giorno 0 - peso iniziale medio kg 41.8 ± 2.1) fino al momento del loro sacrificio (peso finale medio kg $252,4 \pm 29.6$) per un periodo di 235 giorni.

Durante tutta la fase sperimentale i vitelli sono stati sottoposti alle normali pratiche di profilassi vaccinale ed antibiotica ed inoltre sono stati effettuati periodici controlli dei parametri emato-biochimici per verificare le condizioni di benessere e di salute degli animali. La prova si è svolta sotto la supervisione di personale specializzato e dei Servizi Veterinari dell’ASL 17/1 della Regione Piemonte.

Durante il primo mese di vita i vitelli sono stati alimentati con latte in polvere da “svezzamento”, gradualmente sostituito con alimento per allattamento completo a base di: latte in polvere 60%, oli e grassi, prodotti e sottoprodotti di cereali in grani, minerali, amminoacidi, vitamine A, C, D₃, E, Cu, integrazione di ferro e paglia.

Schema dei trattamenti

Dopo un periodo di 175 giorni di adattamento è iniziata la fase sperimentale con il trattamento degli animali; a questo proposito i vitelli sono divisi in 3 gruppi indicati con le sigle K; A e B.

Il **gruppo K** (10 animali) rappresentava il gruppo di controllo che non ha ricevuto alcun trattamento. Il **gruppo A** (9 animali) è stato trattato per via sottocutanea con un cocktail a base di 17 β -estradiolo benzoato e 17 β -testosterone enantato per un totale di 4 trattamenti a distanza di circa 15 giorni l'uno dall'altro (vedi tabella 2.1). Per il trattamento sono state utilizzate le seguenti dosi: 10 mg/capo di 17 β -estradiolo benzoato (10 mg in 1 ml alcool benzilico) e 200 mg/capo di 17 β -testosterone enantato (125 mg/ml in olio di sesamo). Il **gruppo B** (9 animali) è stato trattato per via sottocutanea con un cocktail a base di 17 β -estradiolo benzoato e 17 β -boldenone undecilenato per un totale di 4 trattamenti a distanza di circa 15 giorni l'uno dall'altro (vedi tabella 2.1). Per il trattamento sono state utilizzate le seguenti dosi: 10 mg/capo di 17 β -estradiolo benzoato (10 mg in 1 ml alcool benzilico) e 200 mg/capo di 17 β -boldenone undecilenato (125 mg/ml in olio di sesamo).

Raccolta dei campioni di urina

I prelievi di urina sono stati eseguiti sia durante la fase di adattamento sia durante la fase di trattamento secondo lo schema riportato nella Tabella 2.1. La raccolta dei campioni è stata effettuata utilizzando grembiuli raccogli-urina. La scelta di utilizzare i grembiuli zootecnici nonostante il rischio di inquinamento delle urine con materiale fecale che questa tecnica di prelievo è stata imposta dall'eseguita del personale che era a disposizione per effettuare i prelievi di urina.

I campioni sono stati aliquotati in provette tipo Falcon da 50 ml, opportunamente identificati. Su richiesta dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) delle Venezie sono stati aggiunti 0.5 ml di sodio azide 100 mM ai campioni destinati all'analisi dei residui ormonali per impedire i processi di fermentazione batterica che avrebbero potuto determinare idrolisi dei coniugati escreti nelle urine. I campioni di urina sono state mantenuti fino al momento delle analisi a -20°C.

Draisci *et al.* (2003) hanno valutato la stabilità degli analiti nella matrice, comparando la loro concentrazione in campioni refrigerati a -20°C per 4 settimane al buio e nei

corrispondenti freschi, verificando l'assenza di fenomeni di degradazione che possano alterare l'identificazione e/o quantificazione degli analiti nei campioni refrigerati.

Tabella 2.1: Calendario dei trattamenti e dei prelievi di urina effettuati nel corso della sperimentazione.

GIORNO ^a	TRATTAMENTO	Prelievi di urina (sigla di identificazione)
169	–	g -1 T1 ^b
175	–	g0 T1 ^b
176	Trattamento n. 1	–
177	–	g1 T1
182	–	g7 T1
191	Trattamento n. 2	–
192	–	g1 T2
197	–	g7 T2
204	Trattamento n. 3	–
205	–	g1 T3
210	–	g7 T3
218	Trattamento n. 4	–
219	–	g1 T4
225	–	g7 T4

^a giorni dall'inizio (giorno 0) della sperimentazione

^b prelievo "basale" prima dell'inizio dei trattamenti

– nessun trattamento / nessun prelievo di urina

Preparazione dei campioni di urina

Al momento dell'analisi, una aliquota di 10 ml di ciascun campione di urina è stata filtrata (filtri a diametro 125 mm Schleicher & Schuell) per eliminare le impurità presenti in sospensione. Ogni campione è stato processato in doppio.

Per ciascun campione due aliquote da tre ml di urina filtrata sono stati addizionati con gli standard interni, testosterone-d₂ e boldenone -d₃, ad una concentrazione di 1 ng/ml. Per portare il pH a 5 ai campioni venivano aggiunti 9 ml di tampone sodio acetato 1M pH 5. Si aggiungevano 50 µl di una soluzione di Helix pomatia (diluata 1 a 2 con acqua MilliQ) e la deconiugazione enzimatica era effettuata per 3 h alla temperatura di 37°C.

Al termine dell'incubazione il campione, riportato a temperatura ambiente, era sottoposto ad una estrazione in fase solida (SPE) per mezzo di una cartuccia C18 (Strata Phenomenex) precedentemente condizionata con metanolo ed acqua. La cartuccia era di seguito lavata con acqua e con una soluzione metanolo/acqua (55:45). Dopo aver portato a secco la cartuccia l'eluizione finale era effettuata con 2,4 ml di una soluzione metanolo/etilacetato (50:50) e l'eluato ottenuto era ulteriormente applicato ad una cartuccia NH₂ preventivamente condizionata con metanolo. L'eluato finale veniva portato a secco in flusso d'aria a temperatura di 45°C per mezzo di un evaporatore Zymark .

In ciascuna giornata di lavoro erano preparati dei campioni di controllo addizionando delle urine "bianche" con 17α-boldenone, 17β-boldenone, ADD e 17β testosterone alle concentrazioni di 1 e 2 ng /ml e 17α-testosterone alle concentrazioni di 10 e 20 ng/ml.

Analisi in cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa

Il sistema di analisi in cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS/MS) che è stato utilizzato è costituito da un gruppo LC modello Alliance 2695 della Waters (Milford, MA USA) equipaggiato con uno spettrometro di massa a Triplo Quadrupolo (Micromass, Manchester, UK) fornito di un sistema di ionizzazione ad Electrospray (ESI) operante in modalità positiva. Le analisi sono state eseguite utilizzando la modalità Multiple Reaction Monitoring (MRM). Per ciascun analita sono stati monitorati i due ioni prodotto (product ion o daughter ion) più abbondanti utilizzando le condizioni riportate nella tabella 2.2. La colonna utilizzata era una X-Terra MS C₁₈ (3.5 µm, 2.1 x 100 mm) della Waters mantenuta alla temperatura di 30°C. La fase mobile era costituita da due soluzioni: una fase A costituita da acqua/acido formico (100:0.2) e una fase B costituita da acetonitrile/acido formico (100:0.2). Il flusso era regolato a 0.25 ml/min. La durata della corsa cromatografia era di 17 minuti. Dopo 3 minuti di flusso isocratico con il 30% di B iniziava un gradiente lineare che raggiungeva il 90% di B a 9.5 minuti ed era mantenuto costante a questa composizione fino a 11.5 minuti.

Gli estratti portati a secco venivano ripresi in 500 µl di fase ricostituente ottenuta miscelando le fasi A e B nel rapporto 80 a 20. Dieci µl del campione ripreso sono stati iniettati nell'apparato LC-MS/MS per essere analizzati.

Il metodo utilizzato permette la quantificazione nell'urina bovina di cinque ormoni contemporaneamente (17β-test, 17α-test; 17β-bol; 17α-test e ADD). Nel presente lavoro sono presentati solo i risultati relativi a 17β-test e 17α-test.

Tabella.2.2: Condizioni MS/MS per l'acquisizione in modalità MRM del testosterone e dei composti correlati (Positive Electrospray Ionisation; ESI+).

ANALITA	Parent ion (m/z)	Transizioni I e II (m/z)	Cone (Volts)	Coll Energy (eV)
β-BOLD	287	121; 135	35	26; 15
ADD	285	121;147	32	25;15
α-BOLD	287	121; 135	35	26; 15
β-BOLD d3	290	121	35	25
β-TEST	289	109;97	35	30;28
α-TEST	289	109;97	35	30;28
β-TEST d2	291	109	35	30

La quantificazione degli analiti ricercati nei campioni analizzati è stata ottenuta tramite la valutazione delle concentrazioni corrispondenti alle aree misurate per ciascun composto mediante una retta di taratura giornaliera costruita sulla transizione primaria di soluzioni standard, preparate per diluizioni scalari da soluzioni madre alle concentrazioni di 0.5, 1, 1.5, 2 e 5 ng/mL 17α-boldenone, 17β-boldenone, ADD e 17β testosterone e alle concentrazioni di 5, 10, 15, 20 e 50 ng/ml per il 17α-boldenone.

Analisi statistica dei dati

Le analisi relative ai campioni di urina in LC-MS-MS sono state analizzate mediante Analisi della Varianza (ANOVA, Instat 3 test non parametrico Dunn's Multiple Comparison Test), considerando come fattori casuali di variazione i trattamenti, il tempo, i trattamenti nel tempo e ad un confronto multiplo tra le medie mediante Test di Dunnet e Duncan.

Risultati

Determinazione dei livelli urinari di testosterone ed epitestosterone mediante analisi in LC-MS-MS.

Il metodo utilizzato permette l'identificazione di testosterone ed epitestosterone nell'urina bovina con un buon grado di sensibilità e di specificità nei range di concentrazione richiesti attraverso la combinazione della cromatografia liquida con la spettrometria di massa (LC/MS-MS). La cromatografia liquida consente l'identificazione, tramite separazione, degli analiti presenti in soluzione. La separazione si verifica in base all'affinità degli analiti per le due fasi non miscibili utilizzate, ossia una fase mobile liquida costituita da diversi solventi che fluisce in una fase stazionaria solida costituita da un supporto inerte in una colonna metallica. Questo determina una eluizione degli analiti a tempi di ritenzione diversi. Il tempo di eluizione tuttavia, poiché dipende dalle caratteristiche di polarità della sostanza e dalle interazioni tra sostanza e materiale adsorbente della colonna che possono essere comuni ad altre sostanze, può non essere sufficiente per identificare un analita. Associando alla cromatografia liquida la spettrometria di massa (LC/MS-MS) invece i diversi analiti vengono identificati univocamente sulla base al loro rapporto massa su carica (m/z); infatti in uno spettrometro di massa, le molecole di un composto vengono ionizzate sia per espulsione di un elettrone sia per cattura di un protone, originando così uno ione molecolare primario la cui energia è tale per cui si può frammentare in una serie di cosiddetti ioni frammenti (transizioni). La conoscenza della massa dello ione molecolare e dei suoi principali frammenti è sufficiente per definire la struttura del composto originario poiché il profilo di frammentazione è caratteristico per ciascuna molecola e pertanto le transizioni rappresentano il modo più accurato di identificare con sicurezza gli analiti e permettono di distinguere eventualmente anche due composti a cui siano attribuite masse uguali.

I risultati presentati in questo lavoro sono stati ottenuti da analisi effettuate presso i laboratori della sezione di Chimica dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie dove il metodo che è stato utilizzato per la ricerca di testosterone (T) ed epitestosterone (epiT) è impiegato per la determinazione di 17β - e 17α -boldenone nelle urine di bovino nei controlli ufficiali.

La tabella 2.3 riassume schematicamente le caratteristiche del metodo per la ricerca di 17β - e 17α -boldenone. Dal valore di coefficiente di correlazione (r^2) ricavato dalla retta di calibrazione, si evidenzia una buona linearità ($r^2 > 0.98$ per entrambi i composti) della

metodica. La precisione e l'accuratezza del metodo sono state riscontrate valutando la deviazione standard (DS) e il coefficiente di variazione (CV%) relativo all'analisi cromatografica di soluzioni di 17 β - e 17 α -boldenone alla medesima concentrazione; il metodo analitico si è rivelato sufficientemente preciso ed accurato, con CV compreso tra 12,8 e 22% per il 17 β -boldenone e tra 10 e 13,3% per il 17 α -boldenone.

Il metodo si è dimostrato specifico e selettivo per gli analiti ricercati, attraverso analisi e separazione di standard delle molecole da ricercare e non mostrando interferenti all'analisi e "contemporanea" separazione di composti strutturalmente simili a quelli ricercati quali metiltestosterone, estradiolo, etilestradiolo. Il metodo si è rivelato inoltre molto sensibile, con un limite di rilevabilità (LOD = Limit Of Detection) pari a 0,32 ng/mL e 0,33 ng/mL rispettivamente per 17 α - e 17 β -boldenone e un limite di quantificazione (LOQ = Limit Of Quantification) pari a 0,56 ng/mL e 0,57 ng/mL rispettivamente per 17 α - e 17 β -boldenone.

Tabella 2.3.: caratteristiche del metodo analitico per 17 β e 17 α -boldenone

	17β-boldenone	17α-boldenone
Precisione (CV %)	12.8-22	10-13.3
Accuratezza	72.7-78	80-83.1
r²	>0.98	>0.98
Selettività (Testata rispetto a composti simili: metiltestosterone, estradiolo, etilestradiolo)	Non sono stati rilevati interferenti	Non sono stati rilevati interferenti
LOQ	0.57 ng/mL	0.56 ng/mL
LOD	0.33 ng/mL	0.32 ng/mL

Il metodo è stato utilizzato, senza sostanziali modifiche, per le esigenze della presente ricerca in modo da permettere, in contemporanea alla ricerca 17 β - e 17 α -boldenone anche la separazione, l'identificazione e la quantificazione di testosterone (T) ed epiT.

Per testosterone ed epitestosterone sono state individuate due frammentazioni caratteristiche (m/z 109 e m/z 97) e le energie di collisione sono state ottimizzate per ottenere la migliore sensibilità in termini di rapporto segnale/rumore di fondo (S/N).

Dato che gli epimeri T e epiT sono caratterizzati da masse e frammentazioni uguali, essi sono stati identificati in LC/MS-MS in base al tempo di ritenzione del rispettivo standard con

una tolleranza del $\pm 4\%$. Anche se, per la ricerca di T e epiT, non è stata ancora effettuata una validazione ufficiale del metodo, sulla base delle analisi effettuate è stato comunque possibile stabilire un LOD e un LOQ. Il LOQ individuato è di 0.5 ng/mL per entrambi i composti grazie all'elevato potere di risoluzione della metodica MS/MS che permette di eliminare eliminate le interferenze di background.

Dal valore di coefficiente di correlazione (r^2) ricavato dalla retta di calibrazione si evidenzia una buona linearità del metodo ($r^2 > 0.99$) sia per testosterone che per epitestosterone. La precisione e l'accuratezza del metodo sono state riscontrate valutando la deviazione standard (DS) e il coefficiente di variazione (CV%) relativo all'analisi cromatografica di soluzioni di testosterone ed epitestosterone alla medesima concentrazione. Il metodo analitico si è rivelato preciso ed accurato, con $CV < 7\%$ per entrambi i composti.

Tabella 2.4 Caratteristiche del metodo analitico per testosterone ed epitestosterone

	testosterone	epitestosterone
Precisione (CV %)	< 7	< 7
Accuratezza	70-80	70-80
r^2	> 0.99	> 0.99
Selettività (Testata rispetto a composti simili: metiltestosterone, estradiolo, etilestradiolo)	Non sono stati rilevati interferenti	Non sono stati rilevati interferenti
LOQ	0.5 ng/mL	0.5 ng/mL
LOD	0.3 ng/mL	0.44 ng/mL

Per mezzo dell'analisi di soluzioni standard di T e epiT a varie concentrazioni (0.5, 1, 1.5, 2, 5 ng/ml e 5, 10, 15, 20 e 50 ng/ml rispettivamente) applicando un modello di regressione lineare sono state rapportate le aree sottese al picco ottenuto con la concentrazione degli analiti stessi, ottenendo una linea retta che denota la correlazione tra area e concentrazione.

Nella figure che seguono sono riportati i cromatogrammi relativi all'analisi in LC/MS-MS degli standard di testosterone ed epitestosterone e di alcuni campioni di urina analizzati. I cromatogrammi riportano: il tempo di ritenzione, espresso in minuti, e l'area del picco delle singole transizioni, visibili in alto a destra.

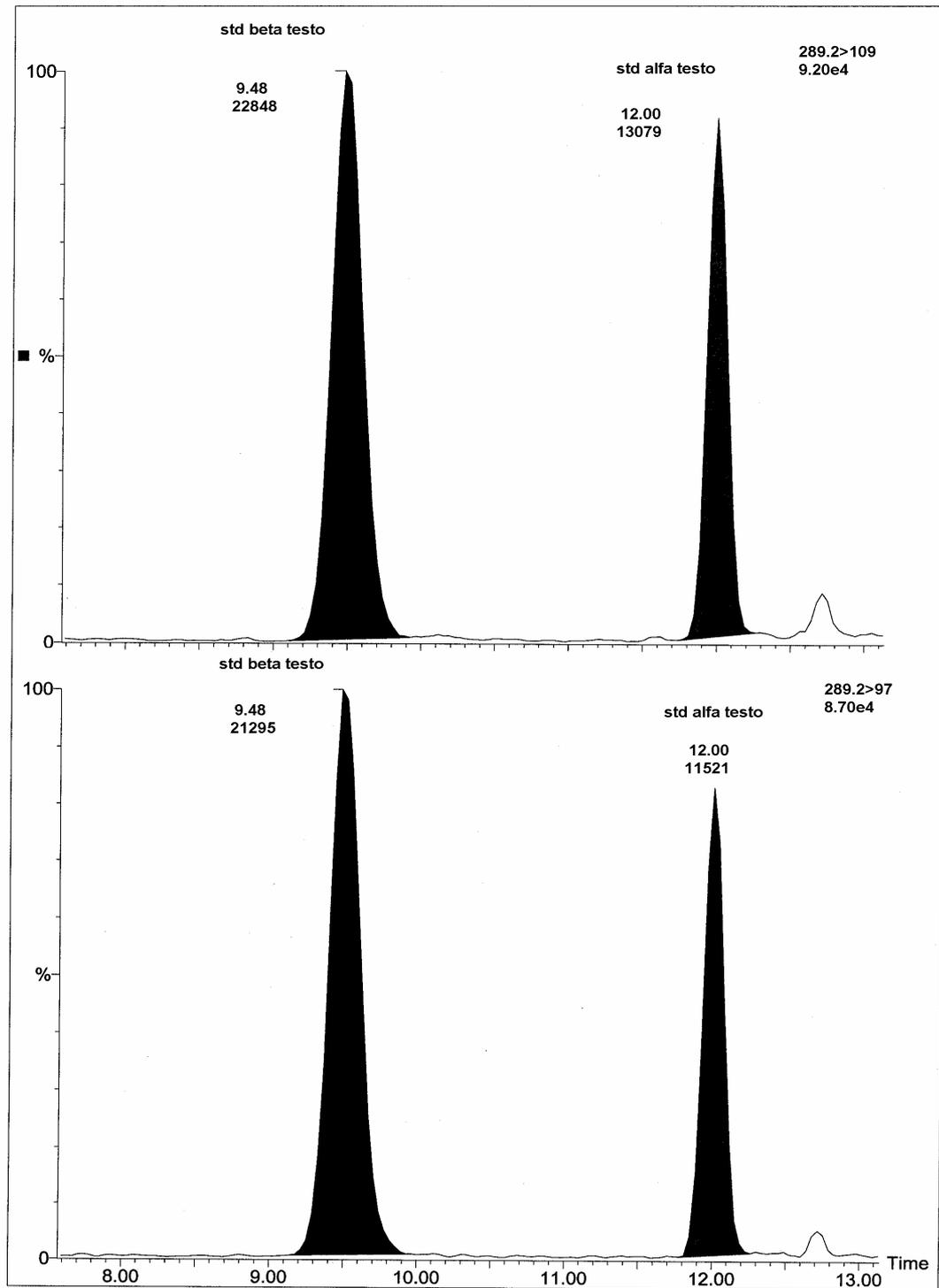


Figura 2.1 Cromatogramma dell'analisi LC-MS-MS di standard di testosterone ed epitestosterone ottenuto in modalità MRM con le due transizioni più intense evidenziate in nero (289→109; 289→97).

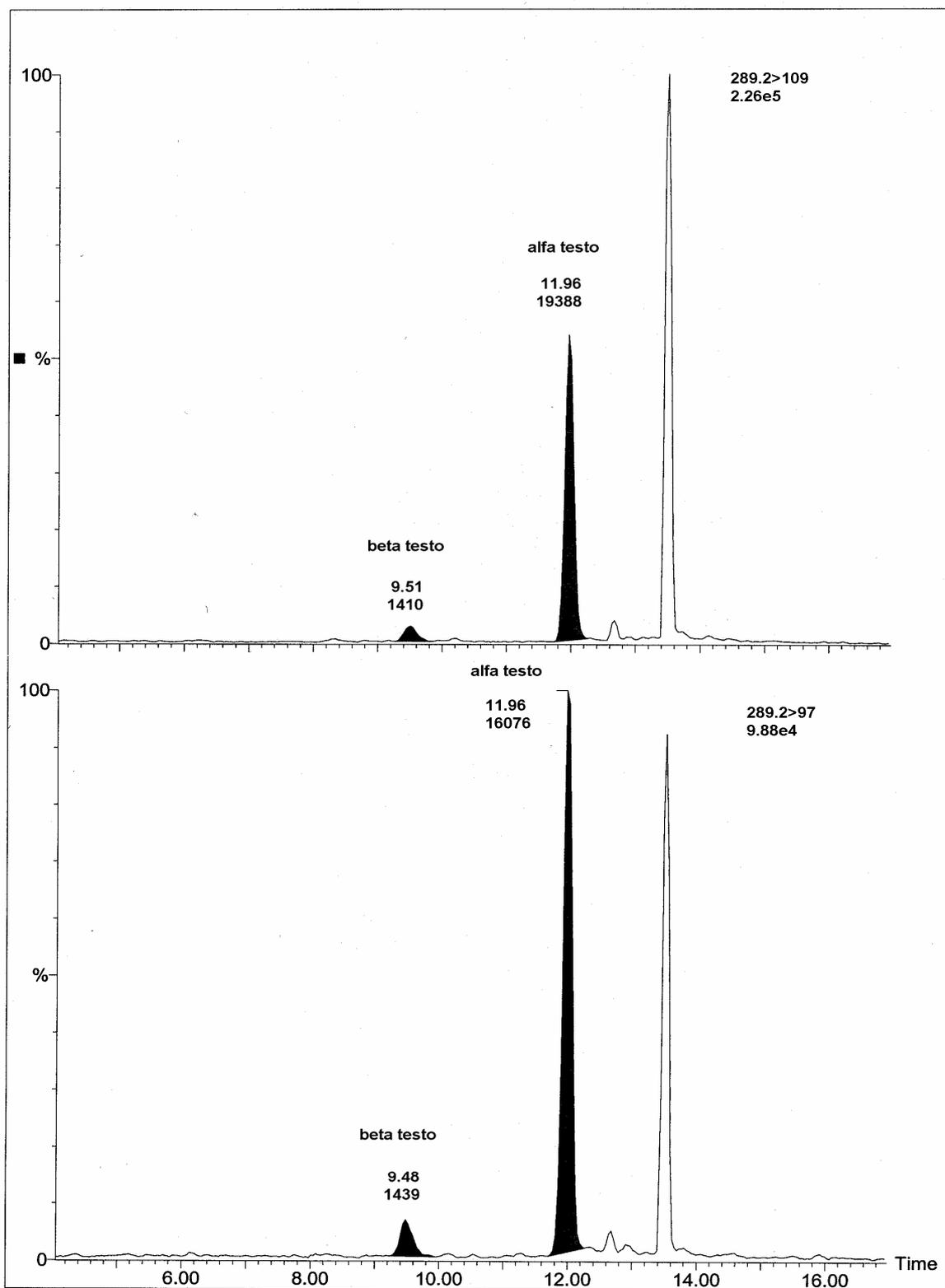


Figura 2.2 Esempio di cromatogramma dell'analisi LC-MS-MS di un campione di urina del gruppo K ottenuto in modalità MRM. Le due transizioni monitorate per testosterone ed epitestosterone sono evidenziate in nero (289→109; 289→97).

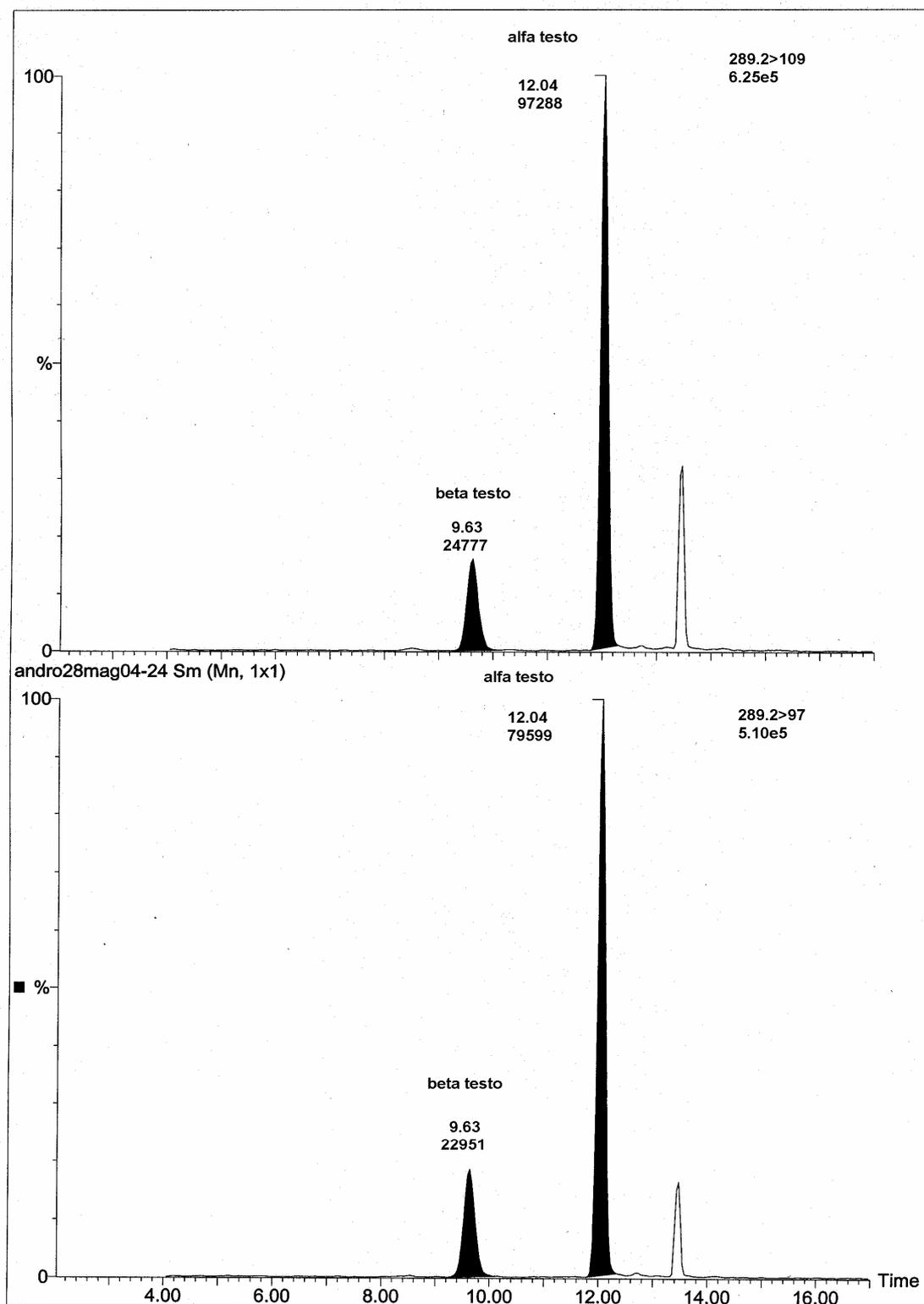


Figura 2.3 Esempio di cromatogramma dell'analisi LC-MS-MS di un campione di urina del gruppo A dopo trattamento ottenuto in modalità MRM. Le due transizioni monitorate per testosterone ed epitestosterone sono evidenziate in nero .

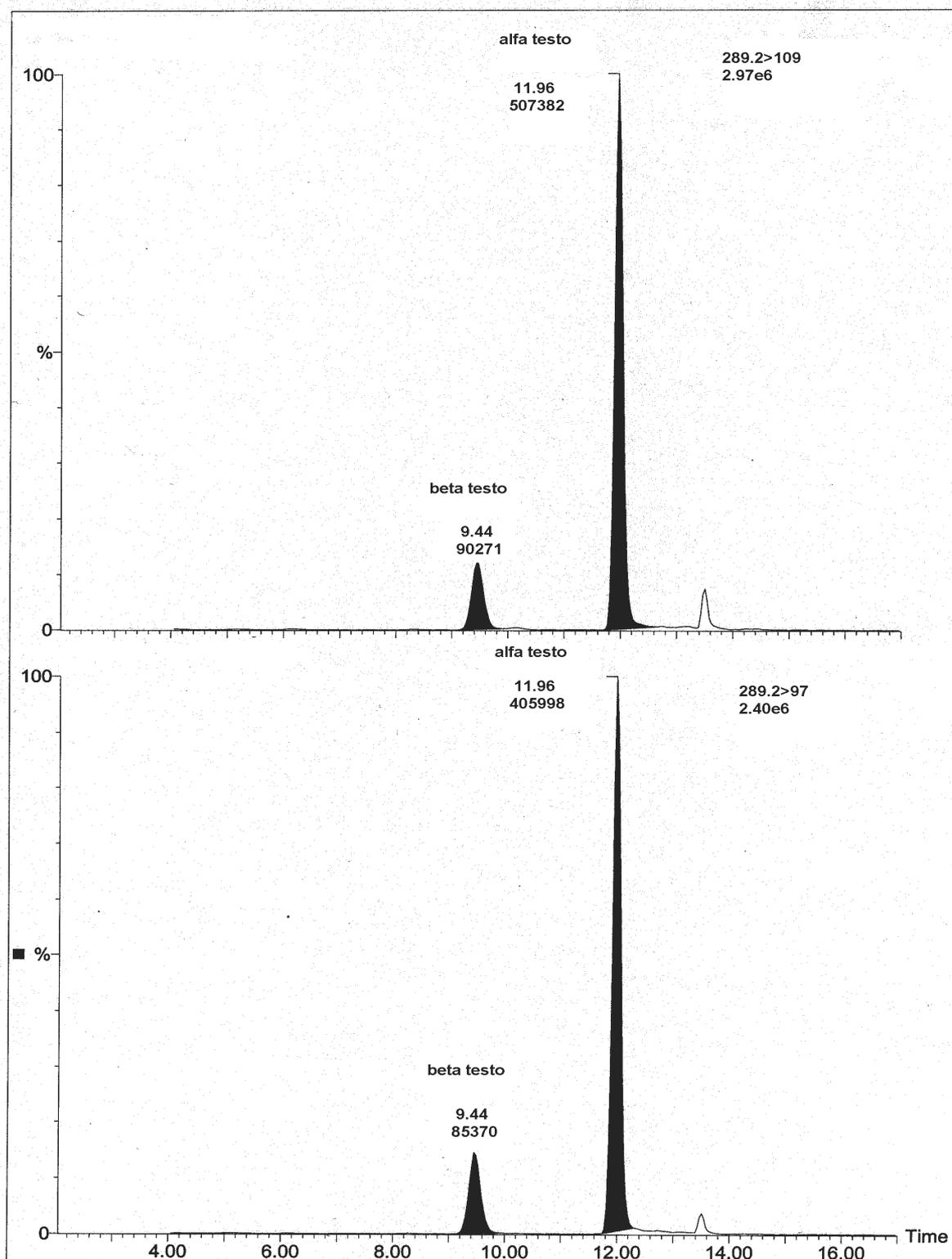


Figura 2.4 Esempio di cromatogramma dell'analisi LC-MS-MS di un campione di urina del gruppo A dopo trattamento ottenuto in modalit  MRM. Le due transizioni monitorate per testosterone ed epitestosterone sono evidenziate in nero.

Uno dei problemi affrontati nelle analisi effettuate è stato dover considerare la presenza fisiologica nelle urine degli ormoni ricercati anche negli animali non trattati. A questo scopo per evitare errori di valutazione, per ogni ciclo di analisi tutti i campioni di urina sono stati addizionati con standard interno (β testosterone-d₂), e due aliquote di un campione di urina “bianco” di un animale non sottoposto ad alcun trattamento e di cui era già nota la concentrazione delle molecole ricercate, è stato addizionato con un mix standard di testosterone ed epitestosterone alle concentrazioni di 1 e 2 ng/ml e di 10 e 20 ng/ml rispettivamente. In questo modo si valutava il recupero attraverso la comparazione delle aree sottese al picco dei campioni addizionati (corrette per il recupero dello standard interno) con quelle a corrispondente concentrazione degli standard. La capacità di recupero è stata determinata intorno al 65% con buona ripetibilità confermata da un CV <12%.

I risultati ottenuti analisi urine in LC-MS-MS sono riassunti nelle tabelle 2.5, 2.6 2.7 e 2.8 che riportano di ciascun gruppo sperimentale per ciascun giorno di prelievo analizzato i valori medi e la deviazione standard rispettivamente dell'escrezione urinaria del testosterone (T) , dell'escrezione urinaria del epitestosterone (epiT), del rapporto testosterone epitestosterone (T/epiT) e del rapporto epitestosterone testosterone (epiT/T). Al momento non sono disponibili i risultati per i prelievi g2 T1 e g2 T7 per tutti gli animali e per i prelievi g3 T1 e g3 T7 per il gruppo B.

I dati riportati evidenziano come il range medio di escrezione delle due molecole sia molto ampio sia negli animali controllo (K) che negli animali trattati (A = 17 β -estradiolo benzoato e 17 β -testosterone enantato; B =17 β -estradiolo benzoato e 17 β -boldenone undecilenato).

Uno degli obiettivi di questo lavoro era stabilire dei valori “basali” di escrezione urinaria di testosterone ed epitestosterone in animali sicuramente non trattati e i risultati ottenuti dalle analisi delle urine degli animali del gruppo di controllo K (che fino a prima dell'inizio dei trattamenti comprendeva tutti i vitelli) consentono di indicare, nonostante l'ampia variabilità riscontrata, dei valori che possono essere considerati come indicativi dei livelli fisiologici di escrezione urinaria di testosterone ed epitestosterone nel vitello a carne bianca e potrebbero consentire di definire un possibile livello “soglia” dei rapporti tra le due molecole.

Tabella 2.5 Valori medi dell'escrezione urinaria di testosterone (ng/ml).

17 β-testosterone (ng/mL)				
		gruppi vitelli		
identificazione prelievo		K	A	B
g-1 T1	media	1.09	1.12	4.80
	ds	0.87	0.92	7.16
g0 T1	media	1.00	1.12	1.28
	ds	1.14	0.88	1.04
g1 T1	media	2.93	2.06	2.38
	ds	3.86	0.96	1.33
g7 T1	media	2.89	2.34	1.83
	ds	3.10	1.25	2.20
g1 T3	media	1.61	1.79	-
	ds	1.12	0.61	-
g7 T3	media	2.27	2.10	-
	ds	1.73	1.28	-
g1 T4	media	1.61	1.78	0.74
	ds	1.05	1.95	0.72
g7 T4	media	1.24	1.79	0.29
	ds	0.84	1.48	0.31

Tabella 2.6 Valori medi dell'escrezione urinaria di epitestosterone (ng/ml).

17 α-testosterone (ng/mL)				
		gruppi vitelli		
identificazione prelievo		K	A	B
g-1 T1	media	18.59	28.23	13.22
	ds	18.74	26.97	9.79
g0 T1	media	9.78	8.82	10.78
	ds	7.74	3.73	6.78
g1 T1	media	27.97	17.34	14.32
	ds	23.75	7.77	5.53
g7 T1	media	13.20	12.61	11.25
	ds	5.82	5.69	19.53
g1 T3	media	13.95	12.21	-
	ds	6.31	5.01	-
g7 T3	media	12.68	9.84	-
	ds	3.54	7.18	-
g1 T4	media	12.96	7.88	6.38
	ds	7.03	5.85	5.49
g7 T4	media	9.15	8.90	4.20
	ds	7.00	5.83	5.42

Tabella 2.7 Valori medi e deviazioni standard del rapporto testosterone/epitestosterone

		T/epiT		
		gruppi vitelli		
identificazione prelievo		K	A	B
g-1 T1	media	0.07	0.05	0.45
	ds	0.04	0.03	0.70
g0 T1	media	0.10	0.12	0.13
	ds	0.04	0.06	0.07
g1 T1	media	0.11	0.13	0.17
	ds	0.07	0.05	0.11
g7 T1	media	0.29	0.21	0.22
	ds	0.43	0.14	0.15
g1 T3	media	0.11	0.16	-
	ds	0.06	0.04	-
g7 T3	media	0.17	0.24	-
	ds	0.09	0.10	-
g1 T4	media	0.13	0.22	0.11
	ds	0.05	0.07	0.03
g7 T4	media	0.15	0.20	0.09
	ds	0.13	0.07	0.02

Tabella 2.8 Valori medi e deviazioni standard del rapporto epitestosterone/testosterone.

		epiT/T		
		gruppi vitelli		
identificazione prelievo		K	A	B
g-1 T1	media	18.86	25.36	13.56
	ds	12.54	13.53	13.54
g0 T1	media	11.42	10.67	9.28
	ds	3.92	5.94	3.77
g1 T1	media	14.14	8.84	8.77
	ds	11.09	3.51	5.86
g7 T1	media	10.64	6.48	5.89
	ds	7.87	3.53	2.52
g1 T3	media	10.38	6.66	-
	ds	3.70	1.45	-
g7 T3	media	7.13	4.74	-
	ds	2.58	1.48	-
g1 T4	media	9.19	5.00	9.56
	ds	4.21	1.56	3.57
g7 T4	media	9.82	5.47	11.30
	ds	5.85	1.37	3.15

I risultati relativi alle analisi delle urine all'interno degli animali di controllo non hanno evidenziato nessuna differenza statisticamente significativa né nei valori di escrezione urinaria di testosterone ed epitestosterone né nei rapporti T/ epiT e epiT /T nei diversi giorni di prelievo. A questo scopo si è ritenuto opportuno, dopo aver considerato le singole medie di ciascun giorno di prelievo, prendere in considerazione un valore, di escrezione urinaria di testosterone ed epitestosterone, medio di tutti gli animali in tutti i prelievi analizzati.

In particolare, poichè i prelievi corrispondenti al secondo trattamento, per il momento, non sono stati ancora analizzati, è stato possibile raggruppare i risultati delle analisi in due periodi separati da un intervallo di 15 giorni che corrispondono approssimativamente al sesto e al settimo mese di età dei vitelli.

Probabilmente proprio per l'ampia variazione individuale, l'escrezione urinaria media di T ed epiT negli animali controllo nei due periodi considerati non sembra variare in modo significativo; al contrario analizzando sia il rapporto T/ epiT che il rapporto epiT /T, è stata evidenziata una differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$) (Non parametric ANOVA, Kruskal-Wallis test; Dunn's Multiple comparison post test). L'aumento del rapporto T/ epiT da $0,1 \pm 0,08$ a $0,14 \pm 0,09$ e la riduzione del rapporto epiT /T da $13,9 \pm 8$ a $9,5 \pm 4$ è attribuibile sostanzialmente ad una riduzione dell'escrezione di epiT che considerata singolarmente non risulta significativa.

Per verificare se le medie del gruppo K, ottenute nel sesto e nel settimo mese, potessero essere considerate effettivamente valide come valori soglia per distinguere gli animali trattati da quelli non trattati, si è proceduto a confrontarle con i valori di ciascun tempo di prelievo di tutti i gruppi. Si è constatato che i valori medi dei singoli prelievi dei gruppi K non sono mai risultati significativamente diversi dalle medie generali.

Si è quindi considerato il valore medio di escrezione urinaria di T, epiT, dei rapporti T/epiT ed epiT/T come il valore medio complessivo di tutti i prelievi dei periodi indicati come 6° e 7° mese, nel gruppo K, e si sono confrontati i risultati ottenuti dalle analisi delle urine degli animali sottoposti a trattamento indicati nella tabella 3.1 negli stessi periodi con questi valori medi complessivi.

Il confronto tra i valori medi dei controlli al 6° mese contro i valori degli animali trattati nello stesso periodo (T1) non evidenziato nessun effetto statisticamente significativo in nessuno dei parametri considerati.

Tabella 2.9 Valori medi e deviazioni standard di escrezione urinaria di testosterone (17 β -test), epitestosterone (17 β -test) e dei rapporti testosterone/epitestosterone (T/ epiT) epitestosterone/testosterone (epiT /T): confronto tra i risultati del 6° e del 7° mese di età negli animali controllo.

		ETA'	
		6° mese	7° mese
17 β-test (ng/mL)	media	1,89	1,94
	ds	2,57	2,09
17 α-test (ng/mL)	media	18,25	14,59
	ds	17,61	16,47
17 β-test/ 17 α-test (T/E)	media	0,10	0,14 *
	ds	0,08	0,09
17 α-test/ 17 β-test (E /T)	media	13,95	9,48 *
	ds	8,77	4,07

* p<0.05.

Le figure riportate di seguito riportano il confronto tra i valori medi di escrezione urinaria del gruppo K al 7° mese e i valori medi dei singoli tempi di prelievo dei gruppi di animali sottoposti a trattamento durante lo stesso periodo di tempo (T3 e T4).

Nell'escrezione urinaria del testosterone e dell'epitestosterone del gruppo A (estradiolo + testosterone) non esistono differenze statisticamente significative in nessuno dei giorni di trattamento.

L'analisi statistica (Non parametric ANOVA, Kruskal-Wallis test; Dunn's Multiple comparison post test) ha evidenziato una differenza statisticamente significativa tra il gruppo K e il gruppo B (estradiolo + boldenone) nel prelievo g7T4 nell'escrezione urinaria sia del testosterone che dell'epitestosterone (p<0.05) .

Il trattamento ripetuto con il boldenone sembra quindi causare un'evidente diminuzione della produzione e dell'escrezione di T e di E. (figure 2.5 e 2.6)

Considerando il rapporto T/E non si osservano differenze tra controlli e trattati (figura 2.7), mentre il rapporto E/T del gruppo A nei tempi di prelievo g7 T3, g1 T4 e g7 T4 risulta significativamente ridotto, con p<0.05; p<0.01 e p<0.005 rispettivamente (figura 2.8). Il confronto del gruppo K con il gruppo B non ha evidenziato differenze significative, anche se le urine al momento analizzate sono solo relative all'ultimo tempo di trattamento.

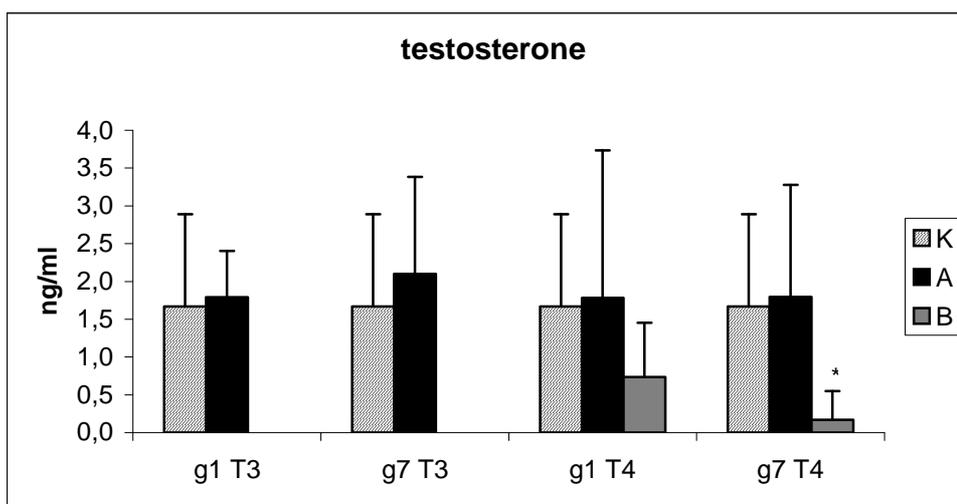


Figura 2.5 Valori medi e deviazioni standard di testosterone nei gruppi sperimentali durante il 7° mese d'età. (* $p < 0.05$)

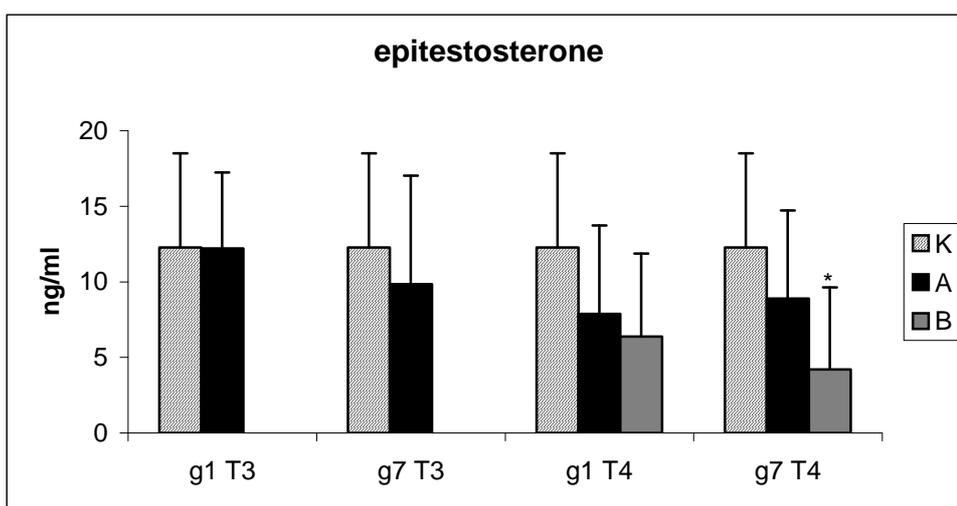


Figura 2.6 Valori medi e deviazioni standard di epitestosterone. nei gruppi sperimentali durante il 7° mese d'età. (* $p < 0.05$)

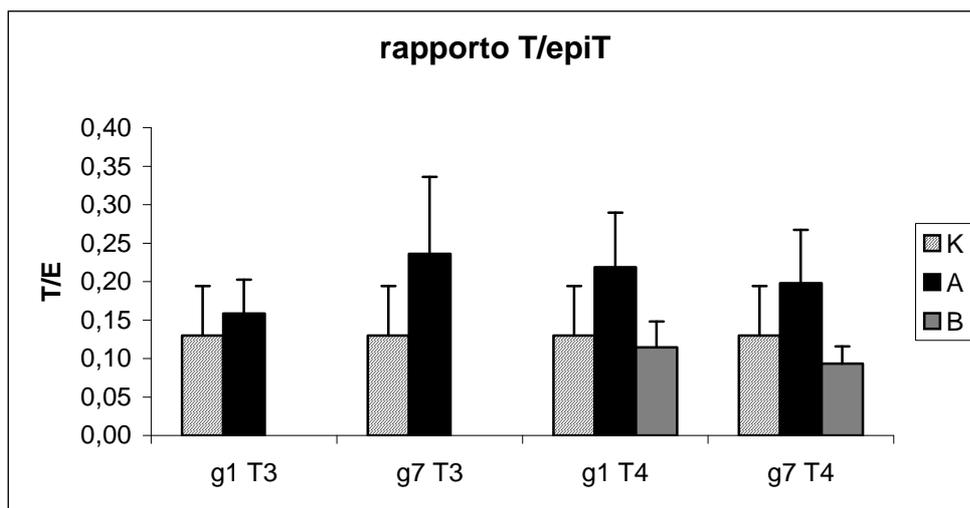


Figura 2.7 Valori medi e deviazioni standard del rapporto testosterone/epitestosterone (T/E) nei gruppi sperimentali durante il 7° mese d'età.

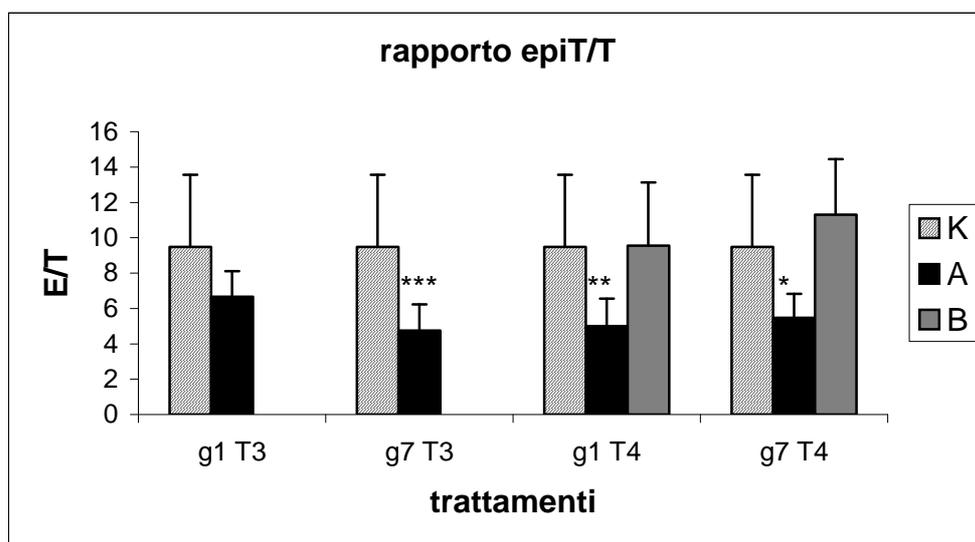


Figura 2.8 Valori medi e deviazioni standard del rapporto epitestosterone/testosterone (epiT/T) durante il 3 e 4 trattamento nei gruppi sperimentali durante il 7° mese d'età. (***) $p < 0.005$, (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$).

Discussione

Lo scopo del presente lavoro era di determinare le concentrazioni urinarie di testosterone (T) ed epitestosterone (epiT) nel vitello a carne bianca sia in animali sani non sottoposti ad alcun trattamento che in animali trattati con cocktails di sostanze ormonali naturali e sintetiche (estradiolo e testosterone ed estradiolo e boldenone rispettivamente) per poter stabilire dei livelli basali fisiologici di escrezione di testosterone e epitestosterone in animali appartenenti ad una categoria produttiva molto particolare, quali i vitelli a carne bianca, e per verificare una possibile correlazione tra eventuali modificazioni dell'escrezione di entrambi o dei loro rapporti (T/epiT o epiT/T) dovute ai trattamenti.

Un controllo più efficace dell'utilizzo illecito degli ormoni steroidei naturali o sintetici nell'allevamento del bovino da carne ed in particolare in quello del vitello a carne bianca richiede una conoscenza dettagliata del metabolismo endogeno e del profilo di escrezione delle urine; infatti, se nell'uomo la somministrazione esogena di testosterone viene monitorata attraverso il controllo del rapporto T/ epiT e nei cavalli da competizione invece è stato stabilito un valore soglia della concentrazione del testosterone urinario al di sopra del quale scatta il sospetto di doping, nel bovino a causa della mancanza di dati basali unanimemente riconosciuti, la valutazione della concentrazione urinaria degli steroidi naturali, non rientra tra i metodi utilizzati per la ricerca dei trattamenti illegali (Prevost *et al.*, 2001). Di conseguenza, sarebbe necessario valutare quale sia il profilo urinario basale di escrezione di testosterone ed epitestosterone nel bovino ed in particolare nelle diverse categorie produttive in allevamento; a segnalare l'interesse dell'argomento in questione è da evidenziare che in letteratura sono presenti alcuni studi che riguardano l'escrezione urinaria di testosterone e epitestosterone nel vitello a carne bianca (Nielen *et al.*, 2007; Arts *et al.*, 1991; Scippo *et al.*, 1993).

Nella sperimentazione oggetto di questo lavoro per due mesi sono stati valutati con una metodica LC/MS-MS i valori di escrezione urinaria fisiologici di testosterone ed epitestosterone di vitelli maschi. Una volta ottenuti questi dati basali sono stati confrontati con quelli di animali sottoposti a trattamento, ed è stata inoltre applicata la valutazione del rapporto T/E, come possibile marker di trattamento con ormoni steroidei nel vitello a carne bianca, in quanto tale è l'approccio utilizzato per il controllo del doping con testosterone nell'uomo in ambito sportivo.

Il metodo di analisi utilizzato è stato validato per la ricerca del 17 β -boldenone, del 17 α -boldenone e dell'androstadienedione (ADD) nell'urina di bovino ma permette anche, in

contemporanea, la ricerca di testosterone ed epitestosterone. Il metodo, attualmente utilizzato dall'IZS delle Venezie, si è rivelato sensibile e specifico anche per il testosterone che per l'epitestosterone. La semplicità della preparazione dei campioni e la specificità e sensibilità del metodo analitico, lo rendono particolarmente idoneo per controlli routinari al fine di individuare l'utilizzo di steroidi anabolizzanti.

Durante il settimo mese di vita degli animali nei risultati ottenuti dalle analisi delle urine relative al gruppo dei vitelli K, i valori medi di testosterone variano tra 1.61 e 2.27 ng/ml, mentre i valori relativi all'epitestosterone si attestano in un range compreso tra 9.15 e 13.95 ng/ml come indicato anche da Hebestreit *et al.* (2006). Valori simili si riscontrano anche nelle urine del gruppo A, i cui valori medi di testosterone variano tra 1.78 e 2.10 ng/ml e quelli di epitestosterone tra 7.88 e 12.21 ng/ml.

I risultati ottenuti evidenziano l'ampia variabilità dell'escrezione urinaria di testosterone ed epitestosterone come riportato in tutti i lavori precedenti; inoltre al momento è possibile affermare che a differenza di quanto avviene nell'uomo e nel cavallo la somministrazione esogena di testosterone non sembra causare un aumento della escrezione del testosterone a livello urinario. Questi dati confermano quanto sostenuto da Arts *et al.* (1991) che in uno studio analogo al presente riscontrava come la somministrazione di testosterone ed estradiolo non influenzi l'escrezione di urinaria di testosterone ed epitestosterone nel bovino.

I risultati da noi ottenuti concordano parzialmente con quanto sostenuto da Scippo *et al.* (1993) che ha proposto, per individuare la somministrazione esogena di testosterone, un limite minimo per il testosterone urinario al di sotto del quale considerare gli animali come sospetti trattati. Anche se nel presente studio il trattamento con testosterone non ha confermato questo possibile effetto di inibizione, l'escrezione di testosterone sembra calare drammaticamente a seguito del trattamento con boldenone (gruppo B) con differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$) rispetto al gruppo di controllo. Esiste quindi la possibilità di un feedback negativo a livello dell'asse ipotalamo ipofisi gonadi secondo le ipotesi di Wu (1997); il boldenone, quindi, potrebbe inibire la produzione di testosterone e diminuire di conseguenza la sua escrezione urinaria. Data l'ampia variabilità di escrezione urinaria del testosterone riscontrata negli animali controllo è però difficile proporre una applicazione pratica di questo risultato ottenuto per monitorare l'abuso del boldenone.

Durante tutta la fase sperimentale, l'escrezione di epitestosterone risulta sempre molto maggiore rispetto a quella di testosterone (in rapporto di circa 1:7) sia nei vitelli di controllo che nei soggetti sottoposti a trattamento con steroidi naturali. Si conferma quindi che

l'epitestosterone, escreto in forma coniugata con le urine, nel bovino è uno dei metaboliti principali del testosterone (Starka L., 2003; Hebestreit M. *et al.*, 2006, Nielen *et al.*, 2007).

I risultati ottenuti evidenziano quindi una probabile maggiore attività dell'enzima 17 α -idrossisteroide ossidoreduttasi nei ruminanti rispetto all'uomo, dove la trasformazione del testosterone ad epitestosterone è trascurabile, se non assente (Starka L., 2003). Come avviene invece anche in altre specie animali, quali per esempio coniglio, cavia e topo, anche nel bovino tale enzima catalizza la conversione delle forme beta in alfa di numerosi molecole attraverso la formazione di un intermedio che nel caso specifico di testosterone ed epitestosterone è l'androstenedione (AED). Ciò si verifica anche nel caso del boldenone (17 β -bol), steroide molto simile al testosterone che differisce da questo solo per un doppio legame in posizione 1, utilizzato nel bovino a fini anabolizzanti (De Brabander H. F. *et al.*, 2004). Infatti, come avviene per il testosterone (figure 5.1 e 5.2), anche la forma α del boldenone (17 α -bol), considerata il principale metabolita del 17 β bol nel bovino; è escreto in forma coniugata come glucuronato dopo la formazione di un metabolita intermedio quale l'ADD (Arts *et al.*, 1996; Poelmans *et al.*, 2003;; Merlanti *et al.*, 2006). La conversione dalla forma β alla forma α non è solo specie specifica, ma anche organo specifica e, riguardo al bovino, sembra che tale trasformazione a carico del testosterone si verifichi sia nel sangue che nel fegato (Starka, 2003).

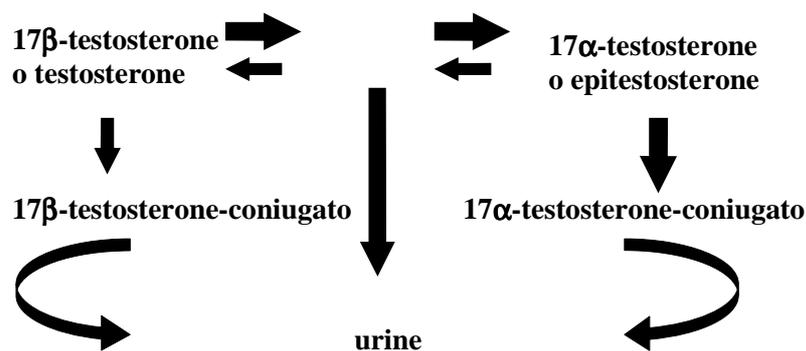


Figura 2.11 Metabolismo di testosterone (17 β -testosterone) ed epitestosterone (17 α -testosterone).

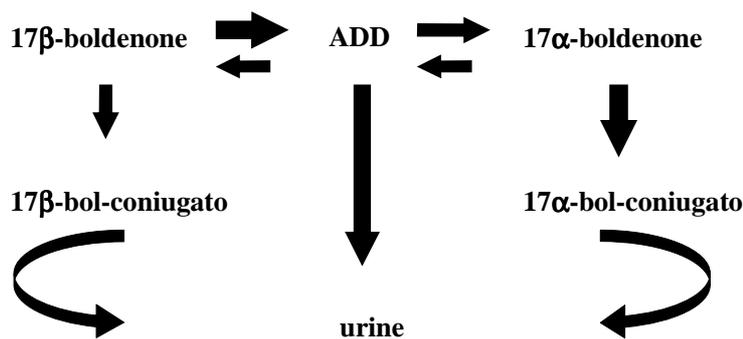


Figura 2.12 Metabolismo di 17β- e 17α-boldenone.

Nel campo del controllo del doping umano l'epitestosterone gioca un ruolo fondamentale quale denominatore nel rapporto testosterone/epitestosterone; quando infatti viene somministrato testosterone, la sua quota di escrezione urinaria aumenta, mentre la quota di escrezione di epitestosterone rimane costante o diminuisce e quindi il rapporto testosterone/epitestosterone aumenta (Van der Kerkhof *et al.*, 2000); questo come spiegato in precedenza è dovuto alla scarsa attività della 17α-idrossisteroide ossidoreduttasi. Nell'uomo i livelli fisiologici del rapporto T/epiT sono di circa 1:1 ed è stato stabilito che, quando tale rapporto supera il valore 6, i laboratori di controllo sono tenuti a comunicarlo alle autorità sportive che condurranno ulteriori indagini attraverso la tecnica del rapporto isotopico valutato con la spettrometria di massa (Catlin *et al.*, 1997) per confermare l'eventuale somministrazione esogena di testosterone.

Nella specie bovina per testare le potenzialità del rapporto T/epiT come marker di trattamento illecito con steroidi naturali è necessario in primo luogo valutare quale sia il profilo fisiologico di escrezione urinaria di entrambe le molecole in un numero sufficiente di animali sani, non sottoposti ad alcun trattamento. Se paragonati ai dati disponibili per l'escrezione umana, i dati relativi all'escrezione di steroidi in animali da allevamento sono molto limitati. La maggior parte dei dati sugli animali da allevamento è stata inoltre ottenuta negli anni sessanta utilizzando metodi colorimetrici, privi della specificità che caratterizza le tecniche più moderne (Angeletti *et al.*, 2006). Si deve considerare inoltre che fattori fondamentali quali razza, sesso e tipo di alimentazione, contribuiscono a determinare la grande variabilità delle concentrazioni di urinarie di testosterone ed epitestosterone nel bovino (Courtheyn D. *et al.*, 2002; Hebestreit M. *et al.*, 2006).

Nel presente studio abbiamo avuto a disposizione un gruppo di vitelli omogenei per i fattori di razza, sesso ed alimentazione. Dopo aver verificato che non esiste differenza tra i diversi tempi di prelievo settimanali per valutare la possibile influenza dell'età sono stati considerati i valori del sesto e del settimo mese di vita come media di riferimento per i profili di escrezione urinaria di epitestosterone e di testosterone nel gruppo di vitelli non sottoposti a trattamento.

Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative né tra le escrezioni urinarie di testosterone né tra quelle di epitestosterone. Una differenza significativa è stata rilevata nel confronto tra il rapporto epiT / T ($p < 0.05$) con una diminuzione del valore di questo rapporto con l'aumento dell'età. Questa diminuzione che concorda con i pochi dati presenti in letteratura che riportano come il rapporto epiT / T nei vitelli maschi sia dipendente dall'età e diminuisca con l'aumentare di essa (Arts *et al.*, 1992). Nel caso appena riportato però la diminuzione del rapporto epiT / T veniva imputata all'aumento della produzione e della conseguente escrezione urinaria di testosterone, mentre i nostri risultati propenderebbero per un effetto causato da una diminuzione dell'epitestosterone.

Per quanto riguarda gli effetti del trattamento con testosterone e 17β -estradiolo (gruppo A), quando si è utilizzato il medesimo approccio previsto per il doping umano, cioè il rapporto testosterone/epitestosterone, non è stata evidenziata alcuna differenza statisticamente significativa, tra il gruppo di vitelli trattati ed non trattati per tutta la durata della sperimentazione.

Alla luce del diverso destino metabolico del testosterone nel bovino rispetto all'uomo, dovuto alla probabile diversa attività dell'enzima 17α -idrossisteroide ossidoreduttasi, e in particolare considerando che mentre l'escrezione del testosterone non sembra essere influenzata dai trattamenti l'epitestosterone urinario, se pure in maniera non significativa, nel gruppo A sembra diminuire, si è deciso di considerare il rapporto epiT / T . Utilizzando questo nuovo rapporto, epiT / T , appaiono evidenti delle differenze statisticamente significative tra il gruppo K e il gruppo A (nei giorni g7 T3 $p < 0.005$, g1 T4 $p < 0.01$ e g7 T4 $p < 0.05$)

Si può ipotizzare che, come nell'uomo, quindi il rapporto tra le due molecole, anche se invertito, riesca a normalizzare la grande variabilità individuale nell'eliminazione di T ed epiT e permetta quindi di evidenziare anche nel bovino una differenza causata dalla somministrazione esogena di T. In questo caso però quello che si nota rispetto all'uomo è la diminuzione dell' epiT e non l'aumento del T.

Ferchaud *et al.* (2000) evidenziano come, a seguito del trattamento con T l'escrezione urinaria di epiT rimanga costante. Infatti il metodo in GC/C/IRMS (Gas

cromatografia/combustione/spettrometria di massa del rapporto isotopico) utilizzato permette di distinguere tra gli ormoni endogeni e quelli di origine esogena, è stato evidenziato come l'epiT escreto derivasse principalmente dal T esogeno somministrato. Da questi dati può dedurre quindi che la somministrazione di T possa causare una diminuzione della produzione di epiT endogeno. I nostri dati evidenziano una riduzione dell'escrezione di epiT in assoluto. L'ipotesi possibile è che il trattamento da noi effettuato essendo prolungato nel tempo possa causare quindi una riduzione della produzione di epiT ancora più marcata di quella ipotizzata da Ferchaud *et al.* (2000). Gli effetti del nostro trattamento effettuato per via sottocutanea si evidenziano infatti nel rapporto epiT /T solo dopo il terzo trattamento e questo potrebbe significare che solo dopo un certo tempo di trattamento esistono degli effetti rilevabili con maggior facilità nelle analisi.

Tale evidenza non si riscontra nel gruppo di animali trattati con boldenone ed estradiolo (gruppo B), infatti il rapporto epiT /T non varia rispetto ai controlli perchè la riduzione dell'epitestosterone anche se presente è stata compensata dal drastico calo del testosterone; questi dati fanno ipotizzare un diverso effetto nell'equilibrio/profilo ormonale di un ormone sintetico come il boldenone rispetto al testosterone.

Conclusioni

Dai risultati ottenuti dal nostro lavoro, il rapporto T/epiT non sembra utilizzabile per individuare eventuali trattamenti illeciti. Il nuovo rapporto proposto (epiT /T), invece sembra poter essere considerato indicativo almeno per evidenziare un trattamento con estradiolo e testosterone, anche se non è possibile al momento stabilire una soglia al di sotto della quale con certezza sia possibile individuare la presenza di un trattamento. Sarà quindi interessante proseguire con ulteriori esperimenti per ampliare e confermare i dati ottenuti.

Appare evidente che il percorso da noi intrapreso presenta notevoli difficoltà prima fra tutte la necessità di considerare le notevoli differenze esistenti tra le diverse categorie produttive presenti nell'allevamento bovino ma è incoraggiante constatare come altri gruppi di ricerca abbiano indirizzato i loro studi sulla determinazione dei livelli basali urinari del testosterone e dei suoi metaboliti, se pure utilizzando tecniche di analisi diverse e più specifiche come la GC/C/IRMS.

Prevost *et al.* (2001) hanno studiato l'eliminazione urinaria di epitestosterone, etiocolanone (un metabolita del testosterone) e DHEA nel bovino dopo trattamento con testosterone. Hebestreit *et al.* (2006) indicano l'etiocolanone e il 5 α -androstane-3 β ,17 α -diolo come i metaboliti del testosterone maggiormente prodotti nel bovino ed evidenziano come questi aumentino in seguito ad un trattamento con il testosterone a differenza dell'epitestosterone la cui eliminazione non sembra essere influenzata dal trattamento.

L'attualità di questi studi è confermata anche dallo sviluppo di metodi innovativi di screening, come proposto da Lu *et al.* (2007) e da Connelly *et al.* (2007) con lo sviluppo di un immunosensore per la ricerca del testosterone nell'urina bovina.

Il presente lavoro fornisce quindi conferme a dati già presenti in letteratura, ampliando la casistica di studi ancora in fase iniziale e ponendo le basi per indirizzare possibili ricerche future.

Pubblicazioni su rivista:

- 1) Angeletti R, Contiero L, **Gallina G**, Montesissa C. “The urinary ratio of testosterone to epitestosterone: a good marker of illegal treatment also in cattle?”. *Veterinary Research Communications* 2006; 30 Suppl 1:127-31

Comunicazioni a congresso:

- 1) **Gallina G.**, Contiero L., Angeletti R., Capolongo F., Montesissa C. (2006): “Which ratio should be adopted to evaluate the urinary excretion of testosterone and epitestosterone in veal calves?” *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (October 2006); Vol. 29 Issue s1: 170-171 (Proceedings of the 10th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology).

CAPITOLO 3

Effetti dei trattamenti con desametazone sul rapporto 6 β -idrossicortisolo e cortisolo nel bovino

I glucocorticoidi sono ormoni steroidei, sintetizzati naturalmente a partire dal colesterolo nella corticale del surrene, che esercitano un'ampia gamma di effetti fisiologici inclusi una attività immunosoppressiva e anti-infiammatoria e una regolazione del metabolismo intermedio di carboidrati, proteine e lipidi (Courtheyn *et al.*, 2002). Esempi di glucocorticoidi naturali sono il cortisolo e il cortisone. 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 (DEX) è un glucocorticoide di sintesi, derivato dal cortisolo, impiegato in medicina veterinaria come anti-infiammatorio in numerose specie animali e, nei ruminanti, anche come induttore del parto, o per il trattamento della chetosi. Il DEX, 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 dell'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. Gli effetti di somministrazioni terapeutiche di DEX sono vari e si verificano, nella maggior parte dei tessuti, attraverso l'interazione con specifici recettori intracellulari (i recettori per i glucocorticoidi, che appartengono alla famiglia dei fattori di trascrizione per i recettori nucleari). Il meccanismo di azione è lo stesso degli ormoni sessuali e si esplica attraverso una interazione genica e una modificazione della sintesi di proteine con modificazione del patrimonio fisiologico di numerosi enzimi intracellulari quali per esempio le cicloossigenasi. Attraverso questo meccanismo il DEX 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 di glicogeno epatico ed inibendo l'utilizzazione periferica del glucosio; stimolano il catabolismo proteico; influenzano quello lipidico, ridistribuendo il grasso corporeo ed avendo un'azione permissiva sulla lipolisi provocata delle 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 DEX nell'uomo e negli animali, sono presenti i fenomeni ipertensivi, le modificazioni 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 a dosi ridotte favoriscono l'incremento ponderale e causano una ridotta ritenzione idrica (Silvan *et al.*, 2007). Per questi effetti i glucocorticoidi e, in particolare, il DEX sono considerati anche dei promotori di crescita e sebbene il loro impiego con questa finalità sia vietato, spesso sono ritrovati in allevamento come additivi nei mangimi e sono impiegati mediante somministrazione orale da soli o in associazione con β -agonisti, per incrementare il peso degli animali (Illera *et al.*, 2007). Sebbene le informazioni sulle posologie impiegate illecitamente siano scarse, si ritiene che concentrazioni pari a $\mu\text{g}/\text{kg}$ nell'alimento possano avere effetti di incremento ponderale soprattutto se impiegate in associazione con altre sostanze: è comprovato un aumento della efficacia dei beta agonisti quando usati in associazione con glucocorticoidi anche a bassissimo dosaggio (Abraham *et al.*, 2004). Gli effetti sembrano essere dovuti a una ridotta down-regulation dei recettori β -adrenergici quando questi ultimi sono somministrati in presenza di corticosteroidi garantendo quindi una maggior efficacia del β -agonista per tempi più lunghi. Secondo quanto riportato da Courtheyn *et al.* (2002) i cortisonici, impiegati da soli a basse dosi, determinano un miglioramento dell'appetito degli animali, un incremento ponderale, una diminuzione degli indici di conversione e un aumento della ritenzione idrica e del contenuto di grasso. Questa efficacia è confermata dai dati sperimentali ma anche dal marcato aumento di positività a DEX nei piani di sorveglianza nazionali (Serratosa *et al.*, 2006).

La registrazione delle preparazioni farmaceutiche destinate alle specie in produzione è condizionata in Europa, e quindi anche in Italia, alla definizione preliminare dei limiti massimi residuali o LMR (Regolamento 2377/90), che rappresentano le concentrazioni massime di farmaco ammesse nei tessuti provenienti da animali, trattati con il farmaco in oggetto e che non devono mai essere superate, se si vuole garantire la sicurezza del consumatore. I valori di LMR per il DEXA, fissati nel 1997, nei diversi tessuti delle specie animali bovina, suina ed equina, sono così definiti: 0,75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per muscolo e rene, 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per fegato; 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per latte bovino. Queste concentrazioni possono essere presenti negli alimenti citati, perché ritenute prive di effetto tossico e considerate, sulla base di studi tossicologici e farmacologici, senza rischio per il consumatore; inoltre garantiscono che, per

una persona dal peso ideale di circa 60 kg, in grado di ingerire quotidianamente il pacchetto alimentare costituito da 300g di muscolo, 100g di fegato, 50g di rene e 50g di grasso, non venga superata la dose giornaliera accettabile (DGA) di DEX pari a 0.9 µg/die (EFSA Dexamethasone Summary report). Come si può osservare la DGA è molto ridotta, causa proprio la notevole attività farmacologica riconosciuta al DEX. Infatti, il NOEL (No Effect Observed Limit) farmacologico (0.15 µg/Kg) adottato nella valutazione dell'DGA, conferma la sua efficacia nell'esercitare effetti importanti sulle attività epatiche come l'induzione di aminotrasferasi epatica, evidenziata nel ratto (Sevaljević *et al.*, 2001).

La potenziale pericolosità della presenza di residui di DEX nelle derrate alimentari nel caso venga utilizzato illegalmente come promotore di crescita in trattamenti di massa, in cui non siano rispettati i tempi di sospensione previsti, rende necessario sviluppare dei metodi che consentano di identificare i residui di DEX nei tessuti ma anche di sorvegliare il suo uso eventuale illecito anche durante la fase di allevamento degli animali attraverso la ricerca di residui nelle urine. Le concentrazioni ammesse nei tessuti sono così ridotte che il metodo analitico di elevata sensibilità e in grado di identificare inequivocabilmente il DEX nelle derrate, è la cromatografia liquida o gassosa associata alla massa (LC-MS o GC-MS), in grado di rivelare concentrazioni inferiori a 0.5 ppb (Van den Hauwe *et al.*, 2005 a).

L'eliminazione di DEX con le urine è stata studiata da Courtheyn *et al.* (1994) e da Calvarese *et al.*, (1994) e da Gaignage *et al.* (1991) e infine Van den Hauwe *et al.* (2005 b). In tutti questi studi viene dimostrato che l'eliminazione urinaria è rapida e preponderante, nei giorni immediatamente successivi alla somministrazione, indipendentemente dalla via di somministrazione. La maggior parte DEX viene eliminata nella urine primi 3-4 gg, anche quando somministrata per via orale, mentre dal quinto giorno le concentrazioni eliminate per via urinaria e fecale sono più ridotte e comparabili, anche se complessivamente, data la maggior quantità prodotta di feci prodotta giornalmente prevale l'escrezione fecale. Dai vari studi, si evidenzia che le diverse condizioni fisiologiche e anche patologiche degli animali trattati, sono causa di elevata variabilità delle concentrazioni di DEX riscontrate nei tessuti e nelle urine, in funzione anche della distanza del prelievo dal momento della somministrazione, dalla disponibilità di acqua di abbeverata che può influenzare il volume delle urine e quindi dalla quantità di urina prodotta o dalle diverse condizioni metaboliche, e quindi è possibile che la ricerca di residui di DEX nelle urine non consenta di identificare la presenza di un trattamento illecito.

Un possibile metodo alternativo alla ricerca dei residui per identificare il trattamento illecito degli animali con DEX potrebbe essere quello di monitorare uno dei suoi effetti

biologici. La tipologia di somministrazione utilizzata nei trattamenti illegali, dosi inferiori a quelle terapeutiche per periodi prolungate comporta la presenza in circolo di quote ridotte ma persistenti di principio attivo in grado di influenzare la sintesi del cortisolo nella corteccia surrenale con un fenomeno di feedback negativo sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (König *et al.*, 2006). Nell'uomo e in molti animali uno dei metaboliti del cortisolo prodotti a livello epatico è il 6 β -idrossicortisolo (6 β OH-F). Il 6 β OH-F è escreto nelle urine in forma non coniugata e rappresenta l'1% del totale dei metaboliti del cortisolo nell'uomo.(Galteau *et al.*, 2003). Ged *et al.* (1989) furono i primi a dimostrare che la trasformazione del cortisolo in 6 β OH-F è catalizzata dal CYP3A e quindi il monitoraggio della sua concentrazione urinaria può utilizzato come marker *in vivo* dell'induzione e dell'inibizione delle isoforme CYP3A (Barret *et al.*, 2005). Considerando il rapporto tra 6 β OH-F e cortisolo è possibile inoltre normalizzare le differenze di produzione di 6 β OH-F dovute alle variazioni del ritmo circadiano e alla variabilità individuale (Galteau *et al.*, 2003).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di quantificare le concentrazioni urinarie di cortisolo e di 6 β OH-F nel bovino, in quanto non esistono dati in letteratura su questi parametri e successivamente verificare una eventuale influenza dei trattamenti con DEX sulle concentrazioni urinarie di cortisolo e di 6 β OH-F nel bovino per verificare una possibile applicazione di questi parametri urinari come marker indiretti di trattamenti con corticosteroidi.

Materiali e metodi

Sperimentazione animale

Diciotto vitelloni di razza Marchigiana sono stati stabulati in condizioni controllate presso un'azienda agricola a Brugine (Padova). 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 ed allevati nel rispetto delle linee guida europee sul benessere animale sotto la supervisione di personale specializzato.

Raggiunta l'età di diciotto mesi gli animali sono stati divisi in tre gruppi: un gruppo di controllo (gruppo K, n=8) e due gruppi sperimentali di trattamento (gruppo T, n=6; gruppo B, n=5).

Gli animali del gruppo T sono stati trattati con 0.75 mg/capo di DXM (nella forma di desametazone-21-sodio-fosfato) per via orale con frequenza giornaliera per un periodo di 50 giorni (inizio trattamento = giorno 1).

Gli animali del gruppo B sono stati trattati con 1.32 mg/capo di DXM (nella forma di desametazone-21-sodio-fosfato) per via intramuscolare per due volte nel corso del periodo della sperimentazione con il secondo trattamento a distanza di 15 giorni dal primo (primo trattamento = giorno 14, secondo trattamento = giorno 29).

Raccolta dei campioni di urina

La raccolta dei campioni di urina è stata sempre effettuata al mattino nella fascia oraria compresa tra le 7 e 30 e le 8 e 30, aspettando la minzione spontanea degli animali. I prelievi di urina sono stati effettuati prestando la massima attenzione ad evitare qualsiasi cross-contaminazione o contaminazione fecale.

Il primo prelievo è stato effettuato da tutti gli animali il giorno prima dell'inizio del trattamento del gruppo T (giorno 0).

Successivamente, nei gruppi K e T i prelievi sono stati eseguiti nei giorni 7, 15, 29, 43 e 50 (considerando come giorno 1 il primo giorno di trattamento del gruppo T).

Le urine del gruppo B sono state raccolte a distanza di 24 ore e di 15 giorni dal primo trattamento per via intramuscolare (che corrispondono ai giorni 15 e 29 della sperimentazione) e dopo 14 e 21 giorni dal secondo trattamento intramuscolare (che corrispondono ai giorni 43 e 50 della sperimentazione).

Per ogni animale ad ogni prelievo sono stati raccolti circa 100 ml di urina che sono stati aliquotati in provette sterili opportunamente siglate e subito congelati e mantenuti alla temperatura di -20°C al riparo dalla luce fino al momento delle analisi.

Determinazione del cortisolo urinario (RIA)

Il metodo RIA (RadioImmunoAssay) si basa sul principio del dosaggio per saturazione: l'analita incognito o lo standard (antigene) e una quantità costante di tracciante radioattivo (antigene marcato) vengono fatti reagire con una quantità costante di anticorpo. L'anticorpo è presente in difetto, sicchè fra antigene e tracciante si instaura una competizione; pertanto maggiore è la quantità di analita presente minore è la quantità di tracciante che si lega all'anticorpo. Dopo un periodo di incubazione a temperatura costante, si ottiene la formazione di due immunocomplessi (antigene-anticorpo, antigene marcato-anticorpo) che formano un precipitato, mentre una frazione di analita e di tracciante rimangono liberi. Si procede quindi alla separazione tra il tracciante libero e quello legato all'anticorpo, e quindi al conteggio della radioattività. Il grado di diminuzione della radioattività del precipitato rispetto ad un campione di controllo, indica la concentrazione dell'antigene nel campione in esame (Poli, 2005).

La concentrazione urinaria del cortisolo (F) è stata misurata utilizzando un metodo RIA diretto in fase solida su micropiastrea. Il metodo utilizzato è stato sviluppato a partire da quello sviluppato per il plasma da Simontacchi *et al.* (1999).

Al momento dell'analisi una aliquota di 2 ml di ciascun campione di urina è stato centrifugato a $3200 \times g$ a 4°C per 10 minuti per eliminare il materiale non solubile.

Per l'esecuzione delle analisi, in base al numero di campioni da analizzare, un numero sufficiente di micropiastre a 96 pozzetti (Optiplate, Perkin Elmer Life Science) sono state rivestite con Anti-Rabbit IgG di pecora facendo incubare a 4°C overnight l'antisiero diluito 1:1000 in tampone sodio acetato 0.15 mM, pH 9. Il giorno successivo le piastre sono lavate per due volte con il tampone RIA (PBS 0,1% BSA, pH 7.4) e fatte incubare a 4°C overnight dopo l'aggiunta in ogni pozzetto di 200 μl di antisiero anti-cortisolo, diluito 1:8000. L'antisiero (Centro Medico Diagnostico Emilia, Bologna) è stato ottenuto dal coniglio contro il cortisolo-3 carbossimetilossima-BSA ed ha mostrato le seguenti crossreattività: cortisolo 100%, prednisolone 44.3%, 11-deossicortisolo 13.9%, cortisone 4.9%, corticosterone 3.5%, progesterone $<0.01\%$.

Il giorno successivo le piastre sono state accuratamente lavate con il tampone RIA e secondo uno schema prestabilito sono stati seminati nei diversi pozzetti gli standard del

cortisolo (nel range di concentrazione di 1.56-200 pg/pozzetto), i controlli di qualità, i campioni di urina da analizzare ed è stato aggiunto il tracciante radioattivo (1,2,6,7-³H-cortisolo, Perkin Elmer Life Sciences, 30 pg/pozzetto, attività specifica: 3700 GBq/mmol). Le piastre sono state quindi poste su un agitatore per tre minuti e incubate a 4°C per una notte.

Il giorno seguente i mix di reazione sono stati aspirati da tutti i pozzetti, esclusi quelli contenenti l'attività totale, e le piastre lavate con tampone RIA (200 µl/pozzetto). Ad ogni pozzetto sono stati quindi aggiunti 200 µl di liquido di scintillazione (Microscint 20, Perkin Elmer Life Sciences) e le piastre sono state messe a contare nel contatore di scintillazione (TopCount, Perkin Elmer Life Sciences). Per ciascuna piastra la curva degli standard è stata preparata in triplicato. Tutti i campioni di urina sono stati analizzati in duplicato.

I coefficienti di variazione (CV) all'interno dello stesso saggio (intra-assay) e tra saggi diversi (inter-assay) riscontrati sono stati 3.1% e 2.8%. Per l'espressione dei risultati si è preso in considerazione il rapporto B/B_0 % (dove con B_0 si intende il segnale analitico dello standard a concentrazione zero/radioattività totale e B è il segnale analitico degli altri punti della curva degli standard) in funzione della dose di cortisolo (ng/ml) degli standard. La trasformazione del segnale analitico della dose incognita (radioattività) in termini di concentrazione si ottiene con l'interpolazione del segnale stesso sulla curva degli standard.

La sensibilità del metodo, pari a 3.125 pg/pozzetto, è stata definita come la dose di ormone in grado di dare un B/B_0 pari al 90%.

Determinazione del 6β idrossi-cortisolo urinario (ELISA)

La metodica ELISA (Enzime-Linked ImmunoSorbent Assay) è una tecnica immunoenzimatica basata sul fatto che un enzima legare sia un anticorpo e il risultante coniugato possiede sia un'attività immunologica che enzimatica. Nel caso del metodo competitivo il saggio è diviso in due fasi. La prima consiste in una reazione immunologica: l'anticorpo specifico, adeso alla fase solida, cattura sia l'antigene presente nel campione che il coniugato enzimatico (quantità nota di antigene legato ad un enzima perossidasi). Dopo l'eliminazione del coniugato in eccesso con l'aggiunta del substrato cromogeno si realizza la reazione enzimatica colorimetrica. La concentrazione dell'antigene è inversamente proporzionale all'intensità di colorazione (Poli, 2005).

La concentrazione urinaria del 6β idrossi-cortisolo (6β OH-F) è stata misurata utilizzando un metodo immunoenzimatico (ELISA) competitivo impiegato secondo le specifiche del produttore (Stabiligen, Nancy, Francia).

Al momento dell'analisi una aliquota di 2 ml di ciascun campione di urina è stato centrifugato per eliminare il materiale non solubile a 4400 rpm a 4°C per 10 minuti e diluito con il tampone di diluizione del kit (in un range tra 1:10 e 1:100) in base al contenuto di cortisolo precedentemente quantificato. Secondo uno schema prestabilito sono stati aggiunti nei pozzetti della piastra, rivestita con anticorpi specifici contro il 6 β OH-F, 10 μ l dei campioni di urina da analizzare, dei controlli positivi e degli standard di 6 β OH-F (0.05-1 ng/ml). Successivamente sono stati aggiunti 100 μ l di

6 β -OHF coniugato con perossidasi e la piastra è stata incubata per 2 h a 25°C al buio. Dopo aver svuotato e lavato la piastra con la soluzione di lavaggio del kit sono stati aggiunti 100 μ l di substrato di sviluppo e la piastra è stata incubata per 45 min a temperatura ambiente per lo sviluppo della reazione colorimetrica. La reazione è stata bloccata con l'aggiunta di 100 μ l della soluzione di stop del kit (H₂SO₄ 2N) e quindi per mezzo di un lettore di micropiastre Packard SpectraCount Microplate Photometer Model BS 1000 è stata misurata l'assorbanza a 450 nm di ciascun pozzetto della piastra.

Per ciascuna piastra la curva degli standard è stata preparata in triplicato. Tutti i campioni di urina sono stati analizzati in duplicato. Per ridurre l'effetto della variabilità inter-saggio sui risultati dello studio, tutti i campioni di urina sono stati testati con kit appartenenti allo stesso lotto di produzione.

I coefficienti di variazione (CV) intra-assay e inter-assay sono risultati pari a 3.0% e 3.4% rispettivamente. Le cross reattività dichiarate per il lotto utilizzato erano: prednisone 0.7%, prednisolone 0.2 %, cortisolo 3.4 %, 6 β -idrossicortisone 2.8%, 11-deossicortisolo 1.0%, corticosterone 1.3%.

La curva di calibrazione è stata ottenuta plottando il rapporto B/B₀ % vs log₁₀ della concentrazione dello standard di 6 β OH-F, dove B₀ è l'assorbanza massima ottenuta con lo standard zero e B è l'assorbanza di ciascuno standard. I risultati sono stati ottenuti interpolando il rapporto B/B₀ di ciascun campione di urina nella curva di calibrazione e correggendolo per il fattore di diluizione.

Validazione dei metodi per l'analisi dell'urina

Le prove di validazione dei metodi sono state effettuate utilizzando aliquote di urina "steroid free" (USF) cioè non contenente gli steroidi che sono stati dosati. F e 6 β OH-F sono stati allontanati dall'urina utilizzando la capacità adsorbente del carbone attivo. (500 mg di carbone attivo per 10 ml di urina).

Utilizzando il protocollo messo a punto da Simontacchi *et al.* (1997) per la validazione di kit per il dosaggio degli ormoni steroidei entrambi i metodi di analisi sono stati validati per l'applicazione nell'urina di bovino effettuando il test di parallelismo e il test di recupero che permettono di verificare l'accuratezza del dosaggio effettuato e andando a valutare la precisione dei due metodi di analisi in termini di ripetibilità all'interno dello stesso saggio (intra-assay) e tra saggi diversi (inter-assay). Il test di parallelismo consiste nella diluizione di un campione di urina a concentrazione nota di ormone con dell'USF. Le diluizioni vogliono misurare l'andamento dei possibili interferenti alla diminuire della concentrazione dell'ormone. Per F sono state considerate le seguenti diluizioni 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 (v:v) mentre per 6 β OH-F le diluizioni considerate sono state 1:10, 1:25, 1:50 ed 1:100. Il test di recupero consiste nell'aggiungere quantità note di ormone in un urina a concentrazione zero (USF) per verificare la corrispondenza tra le concentrazioni osservate e le concentrazioni aggiunte. Il cortisolo è stato addizionato alle concentrazioni di 0.5, 1.25, 2.5, 5 e 10 ng/ml mentre il 6 β OH-F è stato addizionato alle concentrazioni di 0.125, 0.25 e 0.5 ng/ml. Per calcolare il recupero per ciascuna molecola, sei replicati di ciascuna concentrazione degli addizionati sono stati analizzati in ciascuno di tre diversi saggi; la ripetibilità all'interno dello stesso saggio (intra-assay) e tra saggi diversi (inter-assay) dei due metodi di analisi è stata determinata calcolando il CV% delle misure ripetute effettuate.

Elaborazione statistica dei dati

Il contenuto urinario di 6 β OH-F e F e il rapporto 6 β OH-F/F negli animali controlli (K) e negli animali trattati per via orale e via i.m. (T e B) sono stati sottoposti ad Analisi della Varianza tramite programma SPSS, considerando l'animale come fattore casuale e fattori fissi il trattamento, il tempo di prelievo, il prelievo entro trattamento e trattamento entro animale (significatività con $p < 0,05$).

Quando l'interazione trattamento vs tempo è risultata statisticamente significativa è stato effettuato un confronto tra le medie mediante Test di Dunnet e Duncan.

Risultati e discussione

Utilizzando un kit ELISA commerciale con una elevata sensibilità (50 pg/ml), validato per l'applicazione alle urine di bovino, è stato possibile identificare la presenza nelle urine del bovino del 6β OH-cortisolo (6β OH-F) e valutare una sua escrezione media giornaliera approssimativa in base ad un unico prelievo nelle 24 ore.

Per la quantificazione della concentrazione del cortisolo (F), poiché la sensibilità del kit ELISA disponibile in commercio era troppo lontana dai valori medi di concentrazione di F riscontrati nell'urina di bovino (che sono inferiori a 50 ng/ml), una metodica RIA, già utilizzata per la determinazione di F nel plasma bovino (Simontacchi et al., 1995), è stata validata per essere applicata anche all'urina. Per la validazione dei due metodi sono state effettuate le prove di parallelismo e di recupero. Il test di parallelismo consiste nella diluizione di un campione di urina a concentrazione nota di ormone con dell'urina "steroid free" (USF). Le diluizioni vogliono misurare l'andamento dei possibili interferenti alla diminuire della concentrazione dell'ormone. I risultati di questa prova dimostrano la funzionalità del sistema quando la curva di regressione ottenuta interpolando i reciproci dei fattori di diluizione con le concentrazioni di ormone osservate tende ad una retta, con un coefficiente di correlazione maggiore di 0.98 e con un valore dell'intercetta (b) non significativamente diverso da zero (Simontacchi *et al.*, 1997). Entrambi i test hanno mostrato un buon grado di parallelismo come dimostrato dai valori di intercetta non significativamente diversi da zero ($b=0.11$ per RIA F; $b=0.06$ per ELISA 6β OH-F) e dal coefficiente di correlazione maggiore di 0.99 per entrambi i kit.

Il test di recupero consiste nell'aggiungere quantità note di ormone in un urina a concentrazione zero (USF) per verificare la corrispondenza tra le concentrazioni osservate e le concentrazioni addizionate. Il recupero può essere espresso come percentuale di recupero (valore osservato/valore addizionato x 100) ma può essere valutato anche con l'analisi della regressione lineare; in questo caso i risultati di questa prova dimostrano la funzionalità del sistema quando la linea ottenuta interpolando le concentrazioni addizionate con le concentrazioni di ormone osservate tende ad una retta, con un coefficiente di correlazione maggiore di 0.98 e con un valore di coefficiente angolare (a) non significativamente diverso da uno (Simontacchi *et al.*, 1997). In entrambi i metodi il coefficiente di correlazione della retta di regressione è maggiore di 0.99 e il coefficiente angolare ($a=1.029$ per RIA F; $a=1.061$

per ELISA 6 β OH-F) non significativamente diverso da 1 indica una buona corrispondenza tra i valori addizionati ed i valori osservati.

I coefficienti di variazione intra-assay e inter-assay sono risultati pari a 3.1% e 2.8% per RIA F e 3.0% e 3.4% per ELISA 6 β OH-F.

La concentrazione urinaria media di F riscontrata nel gruppo K si attesta in un range di 9-18 ng/ml (tabella 3.1). Negli animali controllo non sono state riscontrate differenze significative nell'escrezione di F registrata nei diversi prelievi effettuati nel corso della sperimentazione. Durante tutto il periodo di trattamento nell'urina del gruppo T si registra una notevole diminuzione dell'escrezione media di F che scende a valori medi compresi tra 0.3-0.8 ng/ml (tabella 3.2); nel gruppo B la diminuzione di F urinario riscontrata nei prelievi analizzati è minore (1.5-5.5 ng/ml; tabella 3.3) ma non significativamente diversa dal gruppo T; la diminuzione riscontrata della concentrazione di F in entrambi i gruppi di animali trattati è significativamente inferiore ($p < 0.05$) all'interno dei diversi giorni di prelievo rispetto a quella del gruppo K (tabella 3.4).

All'interno di entrambi i gruppi T e B l'escrezione di F è sempre significativamente diversa nei prelievi effettuati nel corso del trattamento rispetto al prelievo del giorno 0 (prelievo iniziale prima dell'inizio dei trattamenti) ma a partire dal giorno 15 non varia in maniera significativa per tutta la durata del trattamento.

La concentrazione urinaria media di 6 β OH-F riscontrata si attesta nei range di 7-18 ng/ml, 0.6-1.7 ng/ml, e 1-1.4 ng/ml nei gruppi K, T e B, rispettivamente (tabelle 3.1, 3.2 e 3.3). Come per F anche la concentrazione media di 6 β OH-F dei gruppi di animali trattati scende a livelli significativamente più bassi ($p < 0.05$) rispetto ai controlli. Solo per il gruppo T è stata evidenziata una variazione significativa tra il giorno zero e gli altri giorni di prelievo durante tutto l'esperimento.

I meccanismi che regolano la liberazione di F endogeno sono molto articolati. L'entità di secrezione dei glucocorticoidi è determinata dalle variazioni nel rilascio di ACTH da parte delle cellule corticotrope dell'ipofisi. Le cellule corticotrope sono a loro volta regolate dall'ormone di rilascio della corticotropina (corticotropin-releasing hormone, CRH) rilasciato dall'ipotalamo endocrino; questi tre organi sono definiti, appunto come asse sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (*hypothalamic-pituitary-adrenal* HPA). Le modalità di regolazioni caratteristiche dell'asse HPA sono tre: il ritmo circadiano della steroidogenesi basale, la regolazione a feedback negativo da parte dei corticosteroidi surrenalici e i notevoli incrementi della steroidogenesi in risposta allo stress (Schimmer *et al.*, 2006). Poiché gli animali controllo e gli animali trattati dei gruppi T e B sono stati allevati nelle stesse condizioni e

sottoposti alle stesse procedure per effettuare i prelievi di urina è possibile ipotizzare che l'effetto dello stress sia stato lo stesso in tutti; il riscontro nel gruppo di controllo che concentrazioni di F e $6\beta\text{OH-F}$ sono costanti nei diversi prelievi effettuati nel corso dell'esperimento conferma che la raccolta ad orario fisso di un unico campione di urina significativo per tutto il giorno di prelievo vista l'impossibilità di effettuare la raccolta di tutte le urine prodotte nelle 24 h permette di minimizzare l'effetto dovuto al ritmo circadiano. La raccolta è stata fissata tra le 7.30 e le 8 del mattino; l'orario scelto corrisponde al momento della giornata in cui, secondo quanto riportato in letteratura, l'escrezione di F è massima (El Desoky *et al.*, 2005). In base a queste considerazioni è possibile affermare che i risultati ottenuti confermano che il DEX è in grado di inibire la produzione endogena di F attraverso un azione di feedback negativo sull'asse HPA come indicato da König *et al.* (2006) e da Schimmer *et al.* (2006). La diminuzione di F influenza presumibilmente anche la produzione di $6\beta\text{OH-F}$.

La scelta di adottare il rapporto $6\beta\text{OH-F/F}$ permette comunque più efficacemente di minimizzare l'influenza della variazione dei parametri considerati dovuta al ritmo circadiano e alle differenze individuali (Ohno *et al.*, 2000).

Nei diversi giorni di prelievo i valori medi del rapporto urinario $6\beta\text{OH-F/F}$ osservato nel gruppo K sono compresi tra 0.6-1.1. I valori ottenuti sono simili a quelli ottenuti per il marmoset in campioni di urina spot (Totsuka *et al.*, 1999). I valori medi del rapporto $6\beta\text{OH-F/F}$ del gruppo T (range 2.2-3.2) sono significativamente diversi ($p < 0.05$) rispetto a quelli del gruppo K all'interno dei diversi giorni di prelievo; questa differenza è confermata anche nei confronti del gruppo B (tranne che per il giorno 43). All'interno del gruppo T inoltre, il rapporto $6\beta\text{OH-F/F}$ è sempre significativamente diverso nei prelievi effettuati nel corso del trattamento rispetto al prelievo del giorno 0. Il confronto del rapporto del gruppo B contro il gruppo K non ha invece evidenziato differenze significative.

Il risultato ottenuto mostra che il basso dosaggio di DXM utilizzato per os (inferiore da 10 a 30 volte la possibile dose terapeutica) causa un aumento rapido e significativo del rapporto urinario $6\beta\text{OH-F/F}$ negli animali del gruppo T rispetto ai controlli e che questo incremento è mantenuto per tutta la lunghezza della sperimentazione. Si può ipotizzare che nonostante il basso dosaggio utilizzato la somministrazione giornaliera per os abbia mantenuto una concentrazione circolante di DXM in grado di interferire sulla produzione endogena di F in maniera più pronunciata rispetto alle somministrazioni intramuscolari intermittenti. L'effetto di interferenza sulla sintesi del F da parte del DXM era già noto (König *et al.*, 2006). Diversi fattori, quali un periodo troppo lungo tra le due somministrazioni o dei prelievi troppo

distanziati, possono fornire una possibile spiegazione al fatto che questo effetto non sia stato evidenziato anche negli animali trattati per via intramuscolare, nonostante la dose elevata utilizzata.

La variazione del rapporto $6\beta\text{OH-F/F}$ negli animali del gruppo T rispetto al gruppo K non è facilmente interpretabile. Ipotizzando che come indicato da Galteau *et al.*, (2003) per numerose specie la percentuale di F metabolizzato in $6\beta\text{OH-F}$ sia costante anche nel bovino, di fronte alla diminuzione di F e $6\beta\text{OH-F}$ urinari riscontrata sarebbe logico supporre che anche il valore del rapporto tra le due molecole diminuisca; l'aumento riscontrato lascia ipotizzare che il trattamento con DEX possa avere avuto un effetto di induzione sulla biotrasformazione di F in $6\beta\text{OH-F}$ e che quindi nonostante la diminuzione della produzione totale di F, in percentuale, la quota che viene metabolizzata a $6\beta\text{OH-F}$ sia maggiore negli animali trattati. Questa ipotesi dovrà essere confermata con ulteriori studi, nei diversi gruppi di animali, sull'espressione del CYP3A che nell'uomo è ritenuto responsabile della produzione di $6\beta\text{OH-F}$. (Galteau *et al.*, 2003) per evidenziare se anche nel bovino, come riscontrato nell'uomo e nel topo (Luo *et al.*, 2004) il DEX sia un induttore del CYP3A.

Un aspetto interessante dei risultati ottenuti è il loro confronto con la ricerca dei residui di DXM negli stessi campioni di urina degli animali del gruppo T in LC/MS-MS. I livelli di DMX riscontrati sono stati molto variabili con un range compreso tra 4.5 e 0.3 ng/ml. La concentrazione dei residui identificata spesso era vicina ad un valore molto prossimo al limite di rilevazione del metodo utilizzato (Contiero *et al.*, 2006) confermando la possibilità che un trattamento a basse dosi come quello utilizzato in questa sperimentazione possa sfuggire a una sorveglianza basata solo sulla ricerca dei residui.

Conclusioni

I risultati ottenuti indicano quindi che il metodo utilizzato potrebbe rappresentare un approccio promettente per l'identificazione dell'uso illecito dei corticosteroidi nel bovino

Il rapporto urinario $6\beta\text{OH-F/F}$ potrebbe essere utilizzato come un test di screening rapido e non invasivo per l'identificazione dei trattamenti illegali a lungo termine con corticosteroidi nel bovino e potrebbe essere utile anche per confermare i risultati dubbi ottenuti nelle analisi di ricerca di residui di corticosteroidi nelle urine con una manipolazione minima dei campioni.

Tabella 3.1 Concentrazione urinaria di 6 β -idrossi cortisolo (6 β OH-F) e cortisolo (F) quantificata negli animali del gruppo K (ng/ml) e valore del rapporto 6 β OH-F/F. Valori individuali e media \pm ds di ciascun giorno di prelievo.

Prelievo	Animale	6βOH-F (ng/ml)	F (ng/ml)	Rapporto
giorno 0	K2	30.2	36.3	0.8
	K3	7.7	11.5	0.7
	K4	32.5	22.0	1.5
	K5	9.0	19.0	0.5
	K6	3.4	11.1	0.3
	K7	10.2	12.5	0.8
	K8	4.3	8.8	0.5
	K9	46.1	23.7	1.9
	Media \pm ds	17.9 \pm 16.0	18.1 \pm 9.1	0.9 \pm 0.6
giorno 7	K2	6.2	16.6	0.4
	K3	7.1	12.0	0.6
	K4	3.4	12.6	0.3
	K5	1.5	5.9	0.3
	K6	22.2	28.3	0.8
	K7	13.6	13.1	1.0
	K8	1.2	2.2	0.5
	K9	7.0	9.5	0.7
	Media \pm ds	7.8 \pm 7.0	12.5 \pm 7.8	0.6 \pm 0.3
giorno 15	K2	4.4	7.1	0.6
	K3	3.3	10.4	0.3
	K4	6.1	8.5	0.7
	K5	5.3	11.6	0.5
	K6	6.7	8.7	0.8
	K7	17.5	15.1	1.2
	K8	2.4	2.8	0.9
	K9	6.8	8.2	0.8
	Media \pm ds	6.6 \pm 4.7	9.1 \pm 3.6	0.7 \pm 0.3
giorno 29	K2	9.8	10.7	0.9
	K3	11.9	10.8	1.1
	K4	14.1	13.2	1.1
	K5	9.5	15.2	0.6
	K6	18.8	17.1	1.1
	K7	20.1	14.3	1.4
	K8	19.4	12.5	1.6
	K9	12.8	10.6	1.2
	Media \pm ds	14.6 \pm 4.3	13.3 \pm 2.4	1.1 \pm 0.3
giorno 43	K2	20.3	19.8	1.0
	K3	6.9	9.8	0.7
	K4	9.2	7.5	1.2
	K5	5.0	5.8	0.9
	K6	4.8	10.9	0.4
	K7	14.9	19.9	0.8
	K8	9.6	8.8	1.1
	K9	11.6	6.4	1.8
	Media \pm ds	10.3 \pm 5.3	11.1 \pm 5.6	1.0 \pm 0.4
giorno 50	K2	9.8	17.5	0.6
	K3	8.8	14.3	0.6
	K4	15.9	13.7	1.2
	K5	15.5	14.5	1.1
	K6	2.9	11.8	0.2
	K7	38.6	17.1	2.3
	K8	18.5	15.4	1.2
	K9	18.5	11.8	1.6
	Media \pm ds	16.1 \pm 10.6	14.5 \pm 2.1	1.1 \pm 0.6

Tabella 3.2 Concentrazione urinaria di 6 β -idrossi cortisolo (6 β OH-F) e cortisolo (F) quantificata negli animali del gruppo T (ng/ml) e valore del rapporto 6 β OH-F/F. Valori individuali e media \pm ds di ciascun giorno di prelievo.

Prelievo	Animale	6βOH-F ng/ml	F (ng mL⁻¹)	Rapporto
giorno 0	T13	11.5	15.8	0.7
	T14	1.63	1.91	0.9
	T15	14.0	28.3	0.5
	T16	4.4	12.8	0.3
	T17	6.2	15.7	0.4
	T18	1.7	29.2	0.6
	Media \pm ds	11.6 \pm 5.3	20.1 \pm 7.0	0.6 \pm 0.2
giorno 7	T13	1.1	0.2	5.5
	T14	1.1	0.7	2.7
	T15	2.3	0.7	3.2
	T16	2.1	1.0	2.2
	T17	1.2	0.5	2.8
	T18	2.2	0.6	2.8
	Media \pm ds	1.7 \pm 0.6	0.6 \pm 0.3	3.2 \pm 1.2
giorno 15	T13	1.6	0.6	2.6
	T14	1.0	0.2	4.9
	T15	0.5	0.3	1.4
	T16	0.5	0.2	2.3
	T17	0.6	0.2	2.7
	T18	1.1	0.3	3.9
	Media \pm ds	0.9 \pm 0.4	0.3 \pm 0.2	3.0 \pm 1.2
giorno 29	T13	1.3	0.3	3.9
	T14	1.1	0.6	2.0
	T15	0.6	0.2	3.7
	T16	0.9	0.2	4.5
	T17	1.4	0.6	2.3
	T18	0.8	0.4	2.3
	Media \pm ds	1.0 \pm 0.3	0.4 \pm 0.2	3.1 \pm 1.1
giorno 43	T13	1.0	0.3	2.9
	T14	0.9	0.2	5.2
	T15	0.8	0.2	4.0
	T16	0.7	0.2	3.7
	T17	0.6	0.3	2.0
	T18	0.7	0.4	1.8
	Media \pm ds	0.8 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	3.3 \pm 1.3
giorno 50	T13	1.8	0.8	2.4
	T14	3.1	1.0	3.0
	T15	1.4	0.7	2.0
	T16	1.8	0.9	2.0
	T17	1.5	0.9	1.7
	T18	0.9	0.4	2.4
	Media \pm ds	1.7 \pm 0.7	0.8 \pm 0.2	2.2 \pm 0.5

Tabella 3.3 Concentrazione urinaria di 6 β -idrossi cortisolo (6 β OH-F) e cortisolo (F) quantificata negli animali del gruppo B (ng/ml) e valore del rapporto 6 β OH-F/F. Valori individuali e media \pm ds di ciascun giorno di prelievo.

Prelievo	Animale	6βOH-F ng /ml	F (ng mL⁻¹)	Rapporto
giorno 0	B20	45.5	17.3	2.6
	B21	4.1	48.2	0.1
	B22	20.4	9.8	2.1
	B23	2.9	7.5	0.4
	B24	2.7	8.4	0.3
	Media \pm ds	15.1 \pm 18.6	18.2 \pm 17.2	1.1 \pm 1.2
giorno 15	B20	0.8	0.8	1.1
	B21	6.5	5.8	1.1
	B22	2.6	3.7	0.7
	B23	2.8	1.8	1.5
	B24	1.1	1.4	0.8
	Media \pm ds	2.8 \pm 2.3	2.7 \pm 2.1^a	1.0 \pm 0.3^b
giorno 29	B20	1.1	2.4	0.5
	B21	1.7	0.8	2.1
	B22	2.4	1.4	1.7
	B23	2.7	2.7	1.0
	B24	3.6	6.4	0.6
	Media \pm ds	2.3 \pm 1.0	2.7 \pm 2.2^a	1.2 \pm 0.7^b
giorno 43	B20	0.68	3.1	0.2
	B21	1.21	3.7	0.3
	B22	0.98	0.3	3.3
	B23	0.81	0.2	4.1
	B24	1.55	0.2	6.5
	Media \pm ds	1.0 \pm 0.3	1.5 \pm 1.7^a	2.9 \pm 2.6
giorno 50	B20	6.5	8.3	0.9
	B21	2.5	1.2	2.0
	B22	2.1	1.6	1.4
	B23	5.4	8.5	1.0
	B24	4.1	7.9	0.8
	Media \pm ds	4.1 \pm 1.9	5.5 \pm 3.8^a	1.2 \pm 0.5

Tabella 3.4 Concentrazione urinaria di cortisolo (F) quantificata in ciascun giorno di prelievo(media \pm ds): confronto tra i valori del gruppo di controllo K e dei gruppi T e B all'interno dei giorni di prelievo.

prelievo		F (ng/ml)		
		K	T	B
giorno 0	media	18.1	20.1	18.2
	ds	9.1	7.0	17.2
giorno 7	media	12.5	0.6 ^a	-
	ds	7.8	0.3	-
giorno 15	media	9.1	0.3 ^a	2.7 ^a
	ds	3.6	0.2	2.1
giorno 29	media	13.3	0.4 ^a	2.7 ^a
	ds	2.4	0.2	2.2
giorno 43	media	11.1	0.3 ^a	1.5 ^a
	ds	5.6	0.1	1.7
giorno 50	media	14.5	0.8 ^a	5.5 ^a
	ds	2.1	0.2	3.8

ANOVA con confronto multiplo tra le medie mediante Test di Dunnet e Duncan (a = p<0.05)

Tabella 3.5 Concentrazione urinaria di 6 β -idrossicortisolo (6 β OH-F) quantificata in ciascun giorno di prelievo(media \pm ds di ciascun giorno di prelievo): confronto tra i valori del gruppo di controllo K e dei gruppi T e B all'interno dei giorni di prelievo.

prelievo		6 β OH-F (ng/ml)		
		K	T	B
giorno 0	media	17.9	11.6	15.1
	ds	16.0	5.3	18.6
giorno 7	media	7.8	1.7	-
	ds	7.0	0.6	-
giorno 15	media	6.6	0.9 ^a	2.8
	ds	4.7	0.4	2.3
giorno 29	media	14.6	1.0 ^a	2.3
	ds	4.3	0.3	1.0
giorno 43	media	10.3	0.8 ^a	1.0
	ds	5.3	0.1	0.3
giorno 50	media	16.1	1.7 ^a	4.1
	ds	10.6	0.7	1.9

ANOVA con confronto multiplo tra le medie mediante Test di Dunnet e Duncan (a = p<0.05)

Tabella 3.6 Rapporto 6 β OH-F/F (media \pm ds): confronto tra i valori del gruppo di controllo K e dei gruppi T e B all'interno dei giorni di prelievo.

prelievo		rapporto 6 β OH-F/F		
		K	T	B
giorno 0	media	0.9	0.6	1.1
	ds	0.6	0.2	1.2
giorno 7	media	0.6	3.2 ^a	-
	ds	0.3	1.2	-
giorno 15	media	0.7	3.0 ^a	1.0 ^b
	ds	0.3	1.2	0.3
giorno 29	media	1.1	3.1 ^a	1.2 ^b
	ds	0.3	1.1	0.7
giorno 43	media	1.0	3.3 ^a	2.9
	ds	0.4	1.3	2.6
giorno 50	media	1.1	2.2 ^a	1.2
	ds	0.6	0.5	0.5

ANOVA tramite programma SPSS con confronto multiplo tra le medie mediante Test di Dunnet e Duncan. Lettere diverse indicano valori medi differenti (p<0.05)

Publicazioni su rivista:

- 2) Capolongo F, Tapparo M, Merlanti R, Ravarotto L, Tealdo E, **Gallina G**, Montesissa C, Dacasto M. "Illicit treatments in cattle and urinary δ beta-hydroxycortisol/cortisol ratio". *Anal Chim Acta*. 2007 Mar 14; 586(1-2):228-32.

Comunicazioni a congresso:

- 1) Capolongo F., Tapparo M., Merlanti R., **Gallina G.**, Tealdo E., Montesissa C., Dacasto M. (2006): "Illicit treatments in cattle and urinary δ beta-hydroxycortisol cortisol ratio". *Abstract from the 5th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis*, May 16-19 2006, Antwerp, Belgium; pag. 246

CAPITOLO 4

Influenza della dieta e del trattamento con boldenone e boldione sull'escrezione urinaria del boldenone e dei suoi metaboliti

Il 17β -boldenone (androsta-1,4-diene- 17β -ol-3-one) è uno steroide androgeno con spiccate proprietà anabolizzanti che si differenzia dal testosterone (androsta-4-ene- 17β -ol-3-one) esclusivamente per la presenza di un doppio legame in posizione 1 (Fig. 3.1). Altri steroidi strettamente correlati al 17β -boldenone (17β -bol) e al testosterone (17β -T) sono il 17α -bol (l'epimero del 17β -bol), l'androsta-1,4-diene-3,17-dione (boldione o ADD) e l'androsta-4-ene-3,17-dione (AED). Nell'uomo e in numerose specie animali ADD e AED sono i precursori rispettivamente del 17β -bol e del 17β -T (Schänzer *et al.*, 1992).

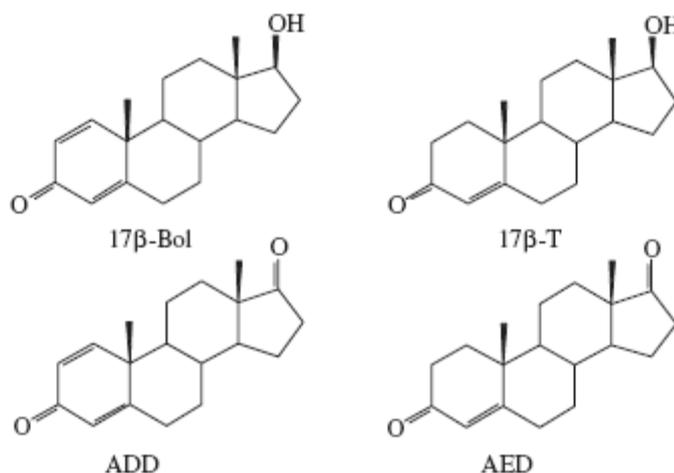


Fig. 4.1 Strutture del 17β -bol , del 17β -T, dell'ADD e dell'AED.

E' noto che il 17β -bol e l'ADD sono utilizzati negli atleti e nei cavalli da competizione per incrementare le prestazioni sportive; l'ADD è facilmente reperibile sul web, come un prodotto con proprietà anabolizzanti addirittura maggiori del 17β -bol stesso (De Brabander *et al.*, 2004). La segnalazione della presenza di esteri del 17β -bol in siti di iniezione nelle carcasse di

animali macellati e il sequestro di preparazioni a base di miscele a base di esteri del 17 β -bol , 17 β -bol e ADD destinate ad aziende zootecniche dimostra che in virtù degli effetti favorevoli sull'incremento ponderale e sul miglioramento degli indici di conversione alimentare, il 17 β -bol è impiegato come promotore di crescita anche nell'allevamento del bovino da carne (Arts *et al.*, 1996; Draisci *et al.*, 2007).

Come altri steroidi, il 17 β -bol è stato classificato dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) come un probabile carcinogeno nell'uomo, con un indice di carcinogenicità superiore a quello di altri androgeni quali il nortestosterone, lo stanozololo, il testosterone e il clostebol; uno studio ha dimostrato inoltre il ruolo del 17 α -bol nello sviluppo di carcinomi prostatici umani impiantanti nel topo (Baisch *et al.*, 1998).

Per tutelare la salute dei consumatori dai rischi della presenza nelle derrate alimentari di sostanze ad azione ormonale, l'Unione Europea ha vietato l'uso del 17 β -bol e degli altri agenti anabolizzanti nell'allevamento del bovino e degli altri animali da produzione; di conseguenza la presenza di residui di 17 β -bol è vietata negli animali da produzione e nei loro prodotti (Direttiva 03/74/EC).

A partire dal 1996 è in corso un dibattito scientifico sull'origine endogena od esogena del boldenone nel bovino. Alcuni ormoni sintetici essendo strutturalmente simili ai loro analoghi naturali, in alcuni casi, possano essere prodotti anche dal metabolismo endogeno degli animali; un esempio a tale riguardo è quello del nortestosterone; il 17 β -nortestosterone è presente naturalmente nel maiale e il suo isomero, 17 α -nortestosterone, può essere di origine endogena nelle urine delle vacche incinte e nei vitelli neonati (Daeseleire *et al.*, 1993); è stato dimostrato che nel maiale maschio non castrato anche il 17 β -bol può essere di origine endogena (De Wasch *et al.*, 2003). La possibile natura endogena del boldenone nel bovino è stata per la prima volta sostenuta nel 1996 da Arts *et al.* che riscontrarono la presenza di 17 α -bol in concentrazioni comprese tra 0.1 e 2.7 ng/ml in urine di bovini dichiarati come non trattati; tale riscontro fu successivamente confermato da Sterk *et al.* (1998) che quantificarono la presenza, nel range di concentrazione tra 1.2 e 1.8 ng/ml, di 17 α -bol in due campioni di urina su venti provenienti da vitelli non trattati. La presenza di 17 α -bol fu segnalata anche in campioni di feci analizzate in controlli di routine nelle quali fu individuata la presenza di ADD e AED; solo alcuni di questi campioni contenevano 17 β -bol.

I risultati di questi studi erano però in contrasto con quanto pubblicato nel 1998 da Van Puymbroeck *et al.* che identificarono il 17 α -bol esclusivamente nelle urine di bovini trattati sperimentalmente con 17 β -bol; in questo studio il 17 α -bol fu quantificato come il maggiore

metabolita *in vivo* del 17 β -bol insieme a ridotte quantità di 17 β -bol e ADD; nelle feci non furono riscontrati né 17 β -bol né ADD.

In Italia il controllo della presenza di residui di boldenone nelle urine di bovino è iniziata ufficialmente nel 1996 con l'inserimento di questa molecola nel Piano Nazionale Residui (PNR). La ricerca del boldenone era prevista anche in altri 10 paesi dell'Unione Europea ma le strategie di sorveglianza nei diversi paesi inizialmente non erano uniformi, a causa dei dati discordanti disponibili in letteratura, derivati da prove di somministrazione sperimentale, in alcuni paesi il 17 α -bol era ritenuto di origine endogena, in altri (come in Italia) era considerato marker di trattamento illegale (De Brabander *et al.*, 2004). Quando, a partire dalla fine del 2000, per alcuni anni in Italia (vedi tabella 4.1) e in altri paesi dell'Unione Europea, nel corso dei piani nazionali di monitoraggio fu riscontrato nei campioni di urina provenienti da bovini un improvviso incremento di non conformità riguardanti il boldenone (sia 17 β -bol che 17 α -bol) si impose la necessità di stabilire una strategia di sorveglianza comune in tutta l'UE e a questo scopo numerosi studi sono stati intrapresi per ottenere ulteriori informazioni sul metabolismo e l'origine del boldenone nel bovino.

Tabella 4.1 Campioni di urina di bovino analizzati nel corso del PNR e confermati positivi per la presenza di 17 α -bol e 17 β -bol (Fonte: Istituto Superiore di Sanità, 2002)

Regione	n. di campioni	campioni positivi confermati	positivi confermati (17α-bol)	positivi confermati (17α-bo + 17β-bol)
2000				
Piemonte	184	39	35	4
2001				
Piemonte	475	105	104	1
Lombardia	1201	220	183	37
Veneto	186	13	13	0
2002				
Piemonte	1221	186	186	2
Lombardia	1436	304	304	52

I dati che sono stati prodotti hanno permesso di stabilire dei criteri condivisi in base ai quali stabilire la presenza di un trattamento illegale con 17 β -bol nel bovino.

Poiché in base alle attuali conoscenze il 17α -bol nel bovino è considerato di origine endogena, la sua presenza non è sufficiente a dimostrare un trattamento illegale; al contrario, dato che la presenza di 17β -bol nelle urine di animali non trattati non è stata dimostrata da nessuno studio, la presenza di 17β -bol nelle urine può essere utilizzata come marker per identificare gli animali sospetti di trattamento. In particolare dato che dopo un trattamento il 17β -bol viene escreto nell'urina sotto forma di coniugato l'analisi delle urine con e senza deconiugazione enzimatica dei metaboliti di fase II fornisce un ulteriore elemento per confermare l'origine esogena del 17β -bol (De Brabander et al. , 2004).

Il riscontro occasionale di 17β -bol nelle feci di bovini non trattati probabilmente causato dalla conversione microbica di alcuni precursori del boldenone, impone sicuramente di porre particolare attenzione alle modalità con cui si effettua il prelievo di urine per evitare la contaminazione fecale ma la distinzione tra 17β -bol coniugato e libero permette di superare il problema delle false positività causate dalla neoformazione di boldenone nelle feci segnalate in alcuni lavori (Sgoifo Rossi et al., 2004) ; l'eventuale 17β -bol di origine fecale è infatti sempre in forma non coniugata a causa della presenza delle glucuronidasi intestinali (Nielen et al., 2004)

La presenza di ADD nelle urine può essere di origine endogena ma nel bovino l'ADD deve essere considerato sia un metabolita che un precursore del 17β -bol e le metodiche di analisi dovrebbero preferibilmente prevedere anche la sua ricerca.

Rimangono ancora da chiarire i meccanismi che portano alla formazione endogena del 17α -bol nel bovino. Studi in vitro hanno dimostrato la possibilità della trasformazione di alcuni fitosteroli come per esempio β -sitosterolo in sostanze con attività ormonale. In particolare è stato riportato che il *Mycobacterium sp.* NRRLB3683 è in grado di convertire il β -sitosterolo ad ADD e testosterone (Barthakur et al.,1996). La somministrazione orale di miscele di steroli vegetali a ratti ha portato alla formazione in ambito intestinale di ADD (Song *et al.*, 2000). Utilizzando l'invertebrato *Neomysis integer* (che viene usato come modello alternativo agli animali vertebrati negli esperimenti di metabolismo *in vitro*) è stato possibile dimostrare, anche se la riproducibilità dei risultati ottenuti non è stata molto soddisfacente, la trasformazione del β -sitosterolo in AED e dell'ADD a AED e a 17β -bol (Poelmans,2003 a) e la trasformazione del testosterone e dello stanozololo in 17β -bol.

I dati riportati lasciano ipotizzare che possa esistere un legame tra l'assunzione di specifici componenti alimentari quali per esempio i fitosteroli e la presenza di residui di 17α -boldenone e sostanze correlate nelle urine e nelle feci di bovino; al momento però non sono disponibili dati sugli effetti di un'alimentazione ricca di steroli vegetali sul profilo residuale urinario.

L'obiettivo di questo lavoro è quello di verificare l'influenza dei fitosteroli contenuti nei sostituti del latte (latte in polvere) per vitelli a carne bianca nell'eliminazione dei metaboliti del boldenone; a questo scopo la concentrazione delle forme coniugate di 17β -Bol e 17α -Bol e dell' ADD è stata misurata per un periodo di 40 giorni nell'urina in due gruppi di vitelli a carne bianca alimentati con due diete con diverso contenuto di fitosteroli e in due gruppi di vitelli alimentati con le stesse due diete ma contemporaneamente trattati con una miscela di 17β -bol e ADD per via orale.

Il confronto tra il profilo urinario di escrezione degli animali controllo e degli animali trattati consentirà di verificare quali siano i metaboliti del boldenone indicativi di un trattamento illecito e quali invece possano essere considerati di origine endogena in funzione di un rafforzamento dell'attività di sorveglianza e di verifica dei parametri attualmente utilizzati.

Per ottenere questi obiettivi le urine dei vitelli sono state analizzate con in cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC/MS-MS).

Materiali e metodi

Reagenti e composti chimici

Tutti i solventi che sono stati utilizzati erano di tipo “HPLC grade” o “analytical grade” e sono stati acquistati presso la Riedel-de Haen (Seelze, Germany). L’acqua è stata purificata da un sistema MILLI-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). L’enzima β -Glucuronidasi/arilsulfatasi (da *Helix pomatia*) è stato acquistato presso la Merck (Darmstadt, Germany). Gli standard analitici di 17α -Bol and 17β -Testosterone- d_2 sono stati acquistati presso il RIVM (Bilthoven, The Netherlands). Il 17β -Bol è stato acquisito dalla Riedel-de Haen (Seelze, Germany) e l’ADD dalla Steraloids (Newport, RI, USA).

Animali

Ventisei vitelli di razza Bruna Austriaca sono stati stabulati in condizioni controllate presso un’azienda agricola a Carrè (Vicenza). 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 ed allevati nel rispetto delle linee guida europee sul benessere animale.

La permanenza degli animali nella struttura indicata si è protratta per tutta la durata della prova sperimentale a partire da alcuni giorni di vita (peso iniziale medio kg 68.7 ± 0.13) fino al momento del loro sacrificio (peso finale medio kg 245 ± 15) per un periodo complessivo di 186 giorni.

Durante tutta la fase sperimentale i vitelli sono stati sottoposti alle normali pratiche di profilassi vaccinale ed antibiotica ed inoltre sono stati effettuati periodici controlli dei parametri emato-biochimici per verificare le condizioni di benessere e di salute degli animali. La prova si è svolta sotto la supervisione di personale specializzato e dei Servizi Veterinari dell’ASL 4 della Regione Veneto.

Dieta

Tutti i vitelli sono stati alimentati con una dieta comune (latte di “svezzamento”) fino al 120° giorno; successivamente gli animali sono stati divisi in due gruppi (giorno 0):

- tredici vitelli sono stati alimentati con una dieta costituita da un sostituto del latte costituito al 60% da derivati del latte (gruppo Latte Commerciale- M) normalmente utilizzato nell'allevamento dei vitelli a carne bianca;
- tredici vitelli sono stati alimentati con una dieta a base di un sostituto del latte, preparato appositamente per la prova sperimentale, costituito prevalentemente da oli vegetali (gruppo Latte Vegetale - V).

Tabella 4.2 Contenuto di steroli (mg/100 g).

	“Latte Vegetale” (V)	“Latte Commerciale” (M)
Colesterolo	47,8	87,4
Brassicasterolo	0,3	0,3
24-Metilencolesterolo	0,2	0,7
<i>Campesterolo</i>	30,5	12,0
Campestanolo	1,8	1,6
Stigmasterolo	<0,1	<0,1
Δ -7- <i>Campesterolo</i>	29,0	8,1
Δ -5,23-Stigmastadienolo	1,7	1,1
Δ -5,24- Stigmastadienolo	5,6	1,9
Clerosterolo	2,2	1,1
β - <i>Sitosterolo</i>	103,2	44,9
Sitostanolo	3,0	2,0
Δ -5-Avenasterolo	6,4	3,3
Δ -5,23-Avenasterolo	2,6	1,4
Δ -7-Stigmastenolo	2,2	0,3
Fitosteroli totali	~ 188	~ 79

La differente alimentazione è stata mantenuta fino al momento del sacrificio degli animali.

Il contenuto di steroli e la composizione centesimale e delle diete somministrate dal 120° giorno sono riportate in Tabella 4.2 e Tabella 4.3.

Le due diete si differenziavano sia nel contenuto totale di fitosteroli che nel contenuto in colesterolo. Il contenuto totale di fitosteroli era infatti pari a 79 mg/100 g nel “latte” M e a

188 mg/100 g nel latte V, mentre il contenuto di colesterolo ammontava a 87,4 mg/100 g nel “latte” M e a 47,8 mg/100 g nel latte V.

Tabella 4.3 Composizione centesimale delle diete (% s.s.)

	“Latte Vegetale” (V)	“Latte Commerciale” (M)
Proteina grezza	20,0	24,5
Estratto Etereo	21,5	24,0
Ceneri	7,0	5,4
Fibra Grezza	0,2	0,1
Estrattivi Inazotati	51,3	46,0

Schema dei trattamenti

Al 146° giorno, dopo 26 giorni dall’inizio della somministrazione delle due diete con diverso contenuto in fitosteroli con la conseguente divisione degli animali in due gruppi (V, “latte vegetale”; M, “latte commerciale”), 6 animali per ciascun gruppo sono stati separati dagli altri per formare due nuovi gruppi da sottoporre al trattamento previsto. I due gruppi di animali trattati sono stati identificati come TV (dieta vegetale associata al trattamento) e TM (dieta commerciale associata al trattamento). Per 38 giorni gli animali trattati hanno ricevuto per via orale una associazione di 0,9 mg di 17 β -bol e 0,1 mg di ADD preventivamente disciolti in 5 ml di etanolo. La soluzione contenente i principi attivi veniva somministrata dopo essere stata addizionata a 200 ml del “latte” ricostituito; il trattamento è stato effettuato una volta al giorno, al mattino, prima della distribuzione del pasto, per 38 giorni.

I rimanenti 7 vitelli di ciascun gruppo non sottoposti a trattamento, identificati come FV (dieta vegetale) e FM (dieta commerciale), sono stati considerati come gruppi di controllo. Durante il periodo di trattamento gli animali controllo hanno ricevuto solo 5 ml di etanolo con le stesse modalità degli animali trattati.

Riassumendo, gli animali coinvolti nel progetto sperimentale sono stati suddivisi nei seguenti gruppi:

- gruppo **FM**: 7 vitelli alimentati con dieta commerciale M che non hanno subito alcun trattamento;
- gruppo **FV**: 7 vitelli alimentati con dieta sperimentale V definita “vegetale” (con un maggiore contenuto in fitosteroli), che non hanno subito alcun trattamento;
- gruppo **TM**: 6 vitelli alimentati con dieta commerciale M che sono stati trattati per 38 giorni consecutivi con un’associazione di 17 β -bol e ADD 1mg/capo per via orale (0,9 mg/capo 17 β -bol + 0,1 mg/capo ADD);
- gruppo **TV**: 6 vitelli alimentati con dieta V che sono stati trattati per 38 giorni consecutivi con un’associazione di 17 β -bol e ADD 1mg/capo per via orale (0,9 mg/capo 17 β -bol + 0,1 mg/capo ADD).

Raccolta dei campioni di urina

I campioni di urina sono stati raccolti da tutti gli animali secondo quanto riportato di seguito. Il primo prelievo è stato effettuato 26 giorni prima dell’inizio dei trattamenti (giorno 0) al momento della divisione degli animali nei due gruppi alimentati con le due diverse diete. Successivamente i prelievi sono stati eseguiti il giorno d’inizio del protocollo sperimentale di trattamento con 17 β -bol e ADD (giorno 1) e nei due giorni successivi (giorno 2 e 3) e in seguito con cadenza settimanale per tutta la durata del protocollo (giorno 11, 18, 25 e 32) e di nuovo a cadenza giornaliera negli ultimi tre giorni di trattamento (giorno 36, 37 e 38). I campioni di urina sono stati raccolti anche 2 giorni dopo la sospensione dei trattamenti (giorno 40) al momento del sacrificio degli animali al macello.

La raccolta dei campioni di urina è stata effettuata sempre al mattino dopo il pasto, in un intervallo di tempo di massimo 4 ore dopo l’eventuale trattamento, aspettando la minzione spontanea degli animali. I prelievi di urina sono stati effettuati prestando la massima attenzione ad evitare qualsiasi cross-contaminazione o contaminazione fecale.

Per ogni animale ad ogni prelievo sono stati raccolti circa 400 ml di urina che sono stati aliquotati in provette sterili opportunamente siglate e subito congelati e mantenuti alla temperatura di -20°C al riparo dalla luce fino al momento delle analisi.

Preparazione dei campioni di urina

Al momento dell’analisi per ciascun campione è stata prelevata una aliquota di 2 ml di urina a cui sono stati aggiunti: 5 ng/ml di Standard Interno 17 β -Testosterone-d2, 6 ml di ABS 0,15 M pH 5.0 e 50 μ l di una soluzione enzimatica di β -glucuronidasi/arilsulfatasi.

Il campione è stato posto in bagnetto ad ultrasuoni per 5 minuti e incubato per 12h a 37°C.

Successivamente è stato centrifugato per 10 minuti a 3000g.

Al termine dell'incubazione il campione, riportato a temperatura ambiente, è stato sottoposto ad una estrazione in fase solida (SPE) per mezzo di una cartuccia C18 (Baker) precedentemente condizionata con metanolo ed acqua. La cartuccia era di seguito lavata con acqua, con ABS e con una soluzione metanolo/acqua (70:30). Dopo aver portato a secco la cartuccia l'eluizione finale era effettuata con 3 ml di metanolo L'eluato finale veniva portato a secco in flusso d'azoto a temperatura di 40°C per mezzo di un evaporatore Zymark .

Una seconda aliquota di ciascun campione è stato processato allo stesso modo senza l'aggiunta della β -glucuronidasi/arilsulfatasi per quantificare l'eventuale presenza di boldenone in forma libera.

Analisi in cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS/MS)

Tutte le analisi sono state effettuate presso i laboratori del Reparto Rischio chimico nella filiera produttiva e qualità del controllo del Dipartimento Sanità alimentare e animale dell'Istituto Superiore di Sanità.

Le analisi in cromatografia sono state effettuate per mezzo di un sistema LC Perkin Elmer Series 200 Micro Pump (Perkin Elmer, USA) equipaggiato con autocampionatore PE Series 200.

La separazione cromatografica è stata ottenuta in condizioni isocratiche a temperatura ambiente usando una colonna per HPLC Allure C₁₈ (250 x 2.1 mm I.D., 5 μ m) (Restek, Bellefonte, PA, USA) con precolonna C₁₈ (4x2 mm ID) (SecurityGuard, Phenomenex, USA); la fase mobile utilizzata è acetonitrile-acqua (60:40, v/v) con ammonio acetato 5 mM con flusso di 130 μ L min⁻¹.

Lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo API 3000 (AB Sciex Instruments, Foster City, CA, USA), equipaggiato con una sorgente di ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI) operante in modalità di ionizzazione positiva con temperatura della sorgente di 400°C e needle current di 3 μ A.

Le analisi sono state eseguite utilizzando la modalità Multiple Reaction Monitoring (MRM). Per ciascun analita sono stati monitorati i tre ioni prodotto (product ion o daughter ion) più abbondanti come riportato nella tabella 4.1.

Tabella 4.4 Performance del metodo e condizioni della MS/MS per l'acquisizione in modalità MRM del 17 β -bol e dei composti correlati.

Analita	Precursore <i>m/z</i>	Prodotti <i>m/z</i>	CE (eV)	DP (V)	<i>t_R</i> (min)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
17 β -Bol	287.4 (<i>M + H</i>) ⁺	121.1, 135.3, 173.1	21	23	5.8	0.15	0.40
17 α -Bol	287.4 (<i>M + H</i>) ⁺	121.1, 135.3, 173.1	21	23	7.1	0.25	0.40
ADD	285.4 (<i>M + H</i>) ⁺	121.2, 147.3, 151.1	21	26	6.9	0.34	0.50
17 β T- <i>d</i> ₂ ^a	291.5 (<i>M + H</i>) ⁺	99.1	27	35	7.2	-	-

^a 17 β T-*d*₂ standard interno

L'energia di collisione (CE) e il potenziale di declustering (DP) è stato settato in MRM mode per ciascuna transizione monitorata per ottenere la maggiore sensibilità per ciascun analita. I parametri utilizzati sono riportati nella tabella 4.4.

Calibrazione, ripetibilità, riproducibilità intra-laboratorio e recupero.

Tutte le prove di validazione del metodo sono state effettuate utilizzando campioni di urina bianca (controllo negativo). Campioni (2 ml) di urina bianca sono stati addizionati con gli analiti e con lo standard interno (5 ng/ml) per ottenere tre serie analitiche ciascuna con 5 concentrazioni degli ormoni ricercati (vedi tabella 4.5) e sei repliche per ciascuna concentrazione. Le serie ottenute sono state analizzate in tre giorni differenti per valutare la ripetibilità, la riproducibilità intra-laboratorio (operatori e condizioni ambientali differenti) e il recupero (corretto per lo standard interno) del metodo analitico.

Una retta dei recuperi su matrice (retta di taratura) è stata preparata per ogni giorno di analisi addizionando campioni di urina bianca con lo standard interno e miscele degli standard analitici per ottenere delle concentrazioni comprese tra 0.25-50 ng/ml per il 17 α -Bol, tra 0.15-50 ng/ml per il 17 β -Bol e tra 0.34-50 ng/ml per l'ADD. La quantificazione delle concentrazioni degli analiti nei campioni addizionati e positivi (non conformi) è stata interpolata dalle rette di taratura ottenute plottando le aree degli analiti (corrette con il recupero dello standard interno) contro le concentrazioni ormonali utilizzando un modello di regressione lineare quadratica.

RISULTATI

Il metodo utilizzato permette di identificare e quantificare le tre molecole ricercate (17 β -Bol, 17 α -Bol e ADD) a concentrazioni inferiori a 1 ng/ml.

L'identificazione delle molecole è stata effettuata monitorando nelle analisi LC-MS/MS in modalità MRM tre transizioni per ogni analita (tabella 4.4). Le figure 4.1 A e 4.1 B mostrano lo spettro di massa degli ioni prodotto (positive-product ion) (range di massa m/z 50-300) delle molecole protonate $[M+H]^+$ di 17 β -Bol e ADD ottenute per mezzo delle analisi in LC/MS-MS sulle soluzioni standard dei singoli ormoni. L'analisi degli spettri ha permesso di identificare gli ioni prodotto più abbondanti che si formano, che sono stati quindi quelli monitorati con la tecnica MRM, che corrispondono a m/z 121, 135 e 173 per 17 β -Bol e 17 α -Bol e a m/z 121, 147 e 151 per ADD.

La buona risoluzione cromatografica (separazione) ottenuta in LC-MS/MS con i tempi di ritenzione per 17 β -Bol, ADD e 17 α -Bol pari a 5.9, 6.9 e 7.1 minuti rispettivamente, ha permesso di separare e distinguere 17 β -Bol e 17 α -Bol che sono caratterizzati dalle stesse transizioni MRM.

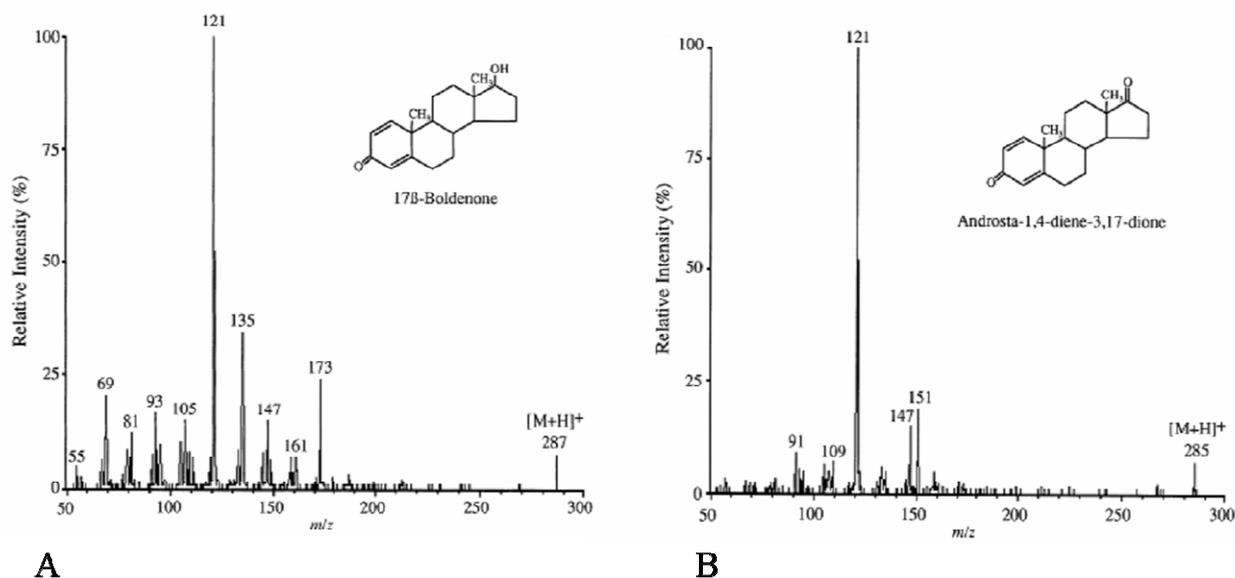


Figura 4.2 A) Spettro di massa degli ioni prodotto (positive product ion m/z 121.1, 135.3, 173.1) del 17 β -bol con lo ione $[M+H]^+$ m/z 287 come precursore. B) Spettro di massa degli ioni prodotto (positive product ion m/z 121.2, 147.3, 151.1) dell'ADD con lo ione $[M+H]^+$ m/z 285 come precursore.

La specificità del metodo è stata dimostrata anche attraverso la preparazione e l'analisi di 20 campioni bianchi di urina con e senza lo S.I., dove non sono stati riscontrati interferenti in corrispondenza dei tempi di ritenzione degli analiti.

Il limite di rilevazione (LOD) è 0.15 ng/ml per il 17 β -Bol, 0.25 ng/mL per il 17 α -Bol e 0.34 ng/mL per l'ADD. Il limite di quantificazione (LOQ) risulta essere 0.40 ng/mL sia per il 17 α -Bol che per il 17 β -Bol e 0.50 ng/mL per l'ADD. I valori ottenuti sono da ritenersi soddisfacenti considerando la complessità della matrice biologica e rendono il metodo utilizzato adeguato agli scopi del lavoro.

Per ciascun analita la curva di calibrazione è stata valutata nel range LOD-50 ng/ml; la buona linearità è dimostrata dai coefficienti di correlazione ottenuti che sono risultati sempre superiori a 0.998 per tutte le curve.

La tabella 4.5 riporta i valori di recupero, riproducibilità intra laboratorio e ripetibilità del metodo analitico ottenuti addizionando campioni di urina bianca con ciascun analita alle concentrazioni riportate.

Tabella 4.5. Recupero, riproducibilità intra laboratorio e ripetibilità di 17 α -Bol, 17 β -Bol e ADD.

Analita/parametro	Addizionati (ng/mL)	Concentrazione quantificata (ng/mL)	Recupero (%)	Riproducibilità (RSD)	Ripetibilità (CV %)
17α-Bol	0.50	0.52	103.7	0.05	10.6
	1.00	1.02	102.4	0.03	3.1
	2.00	2.01	100.9	0.06	2.9
	10.00	9.96	99.6	0.15	1.5
	20.00	20.02	100.1	0.07	0.4
17β-Bol	0.20	0.20	100.9	0.01	7.2
	0.50	0.49	99.2	0.02	3.8
	1.01	1.01	100.5	0.02	2.6
	2.02	2.01	99.9	0.04	2.1
	5.05	5.05	100.0	0.02	0.3
ADD	0.99	0.95	95.8	0.12	12.4
	4.98	4.92	98.7	0.32	6.6
	10.15	10.18	100.2	0.26	2.5
	20.34	20.49	100.7	0.49	2.4
	50.83	50.77	99.9	0.63	1.2

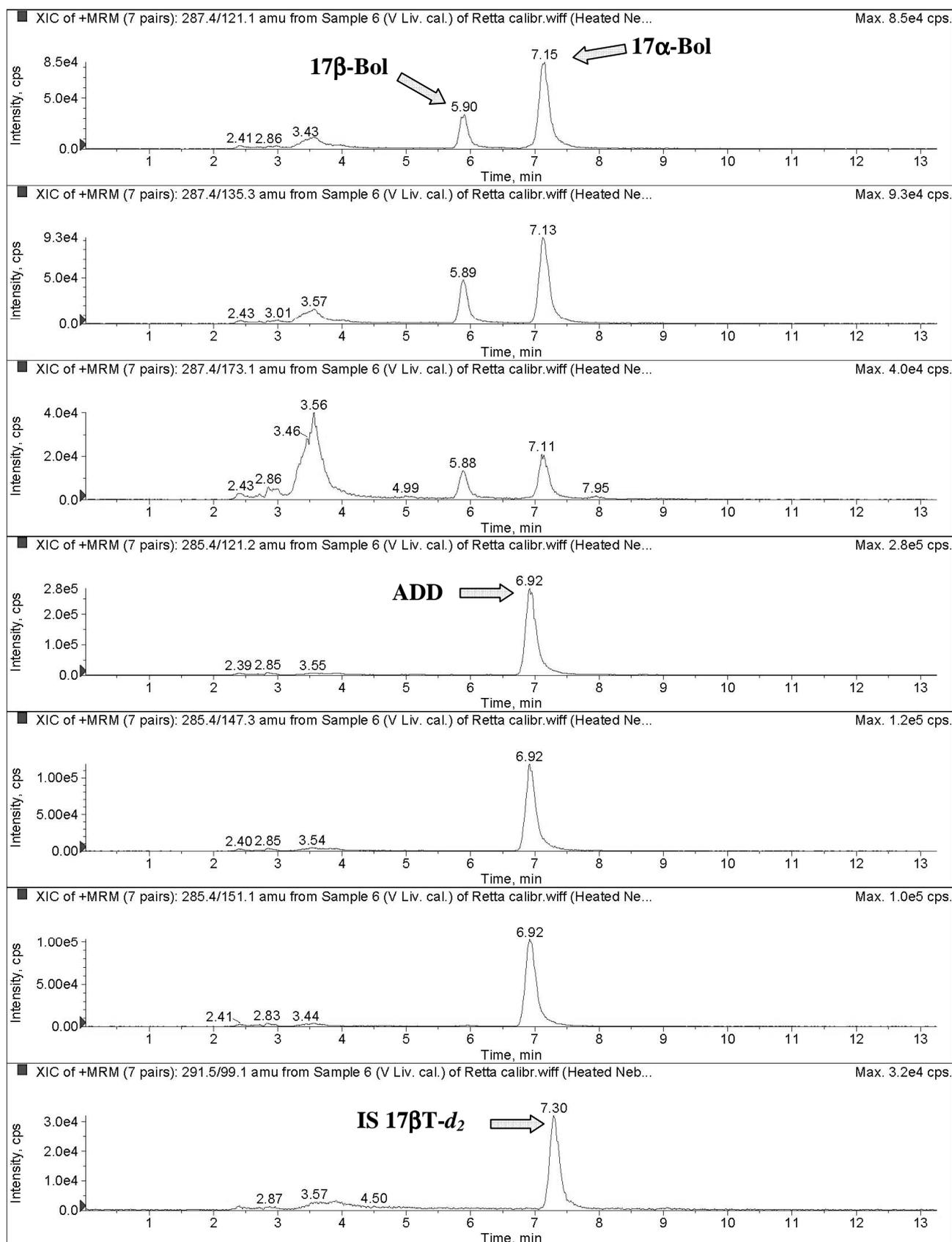


Figura 4.3. Extracted ion currents (XIC) in modalità MRM di $17\alpha/\beta$ -Bol, ADD and 17β -Testosterone- d_2 addizionati ad un campione di urina bianco addizionati alle concentrazioni di 20.0, 5.0, 50.8 e 5 ng/ml .

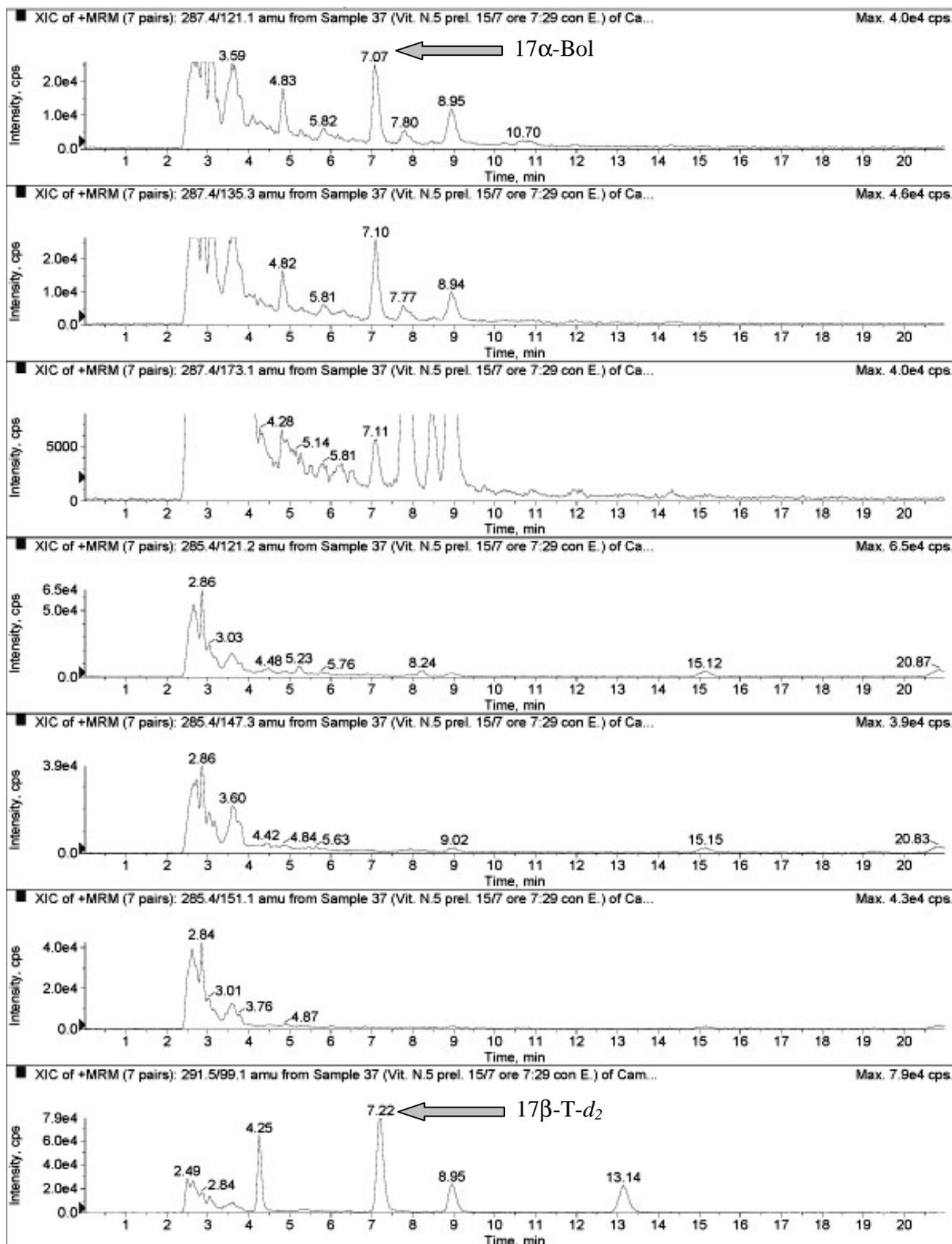


Figura 4.4. Estratti ion currents (XIC) modalità MRM di 17 α / β -Bol, ADD e 17 β -Testosterone- d_2 di un campione del gruppo FV.

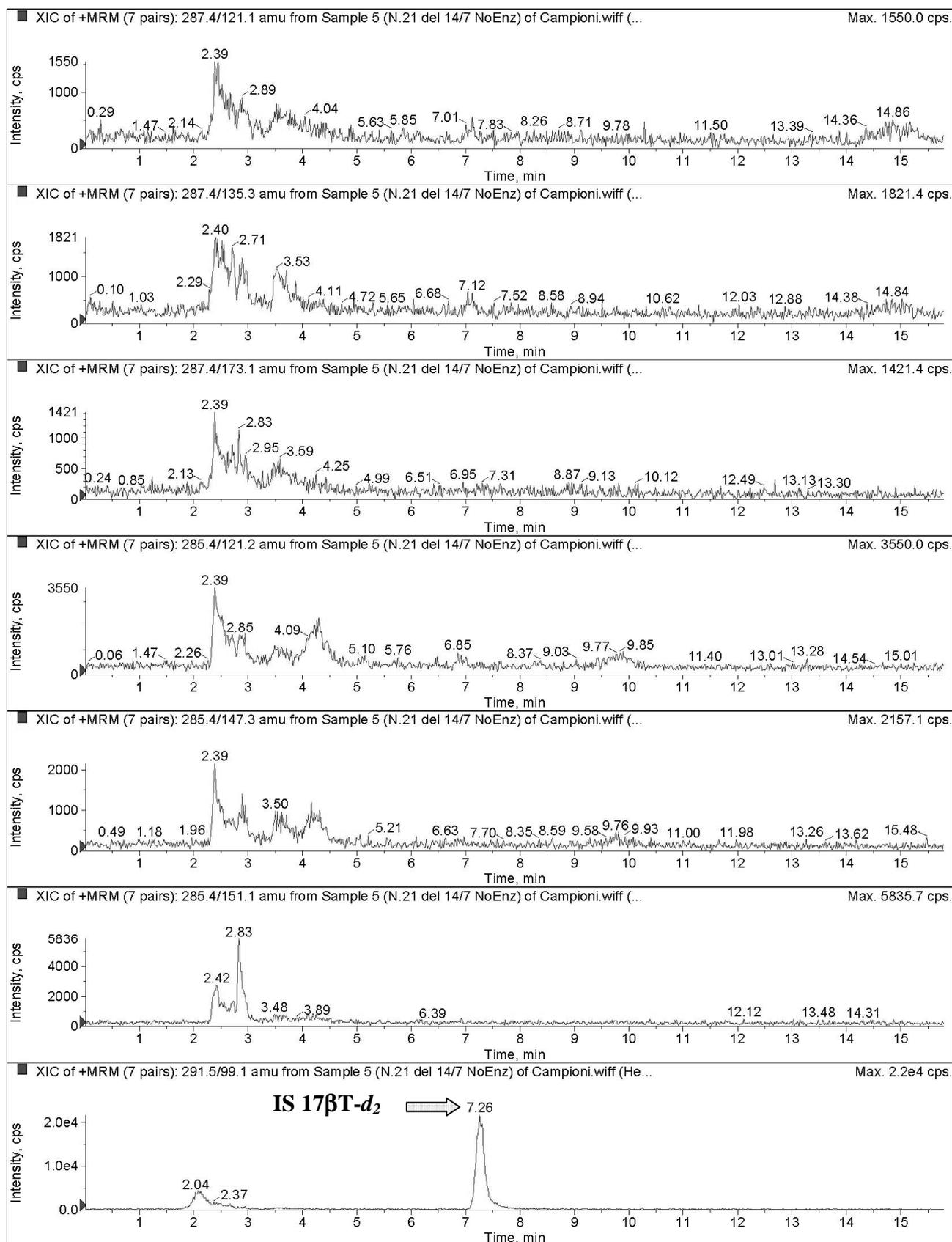


Figura 4.5 Extracted ion currents (XIC) in modalità MRM di 17 α / β -Bol, ADD e 17 β -Testosterone- d_2 di un campione positivo prima della deconiugazione enzimatica.

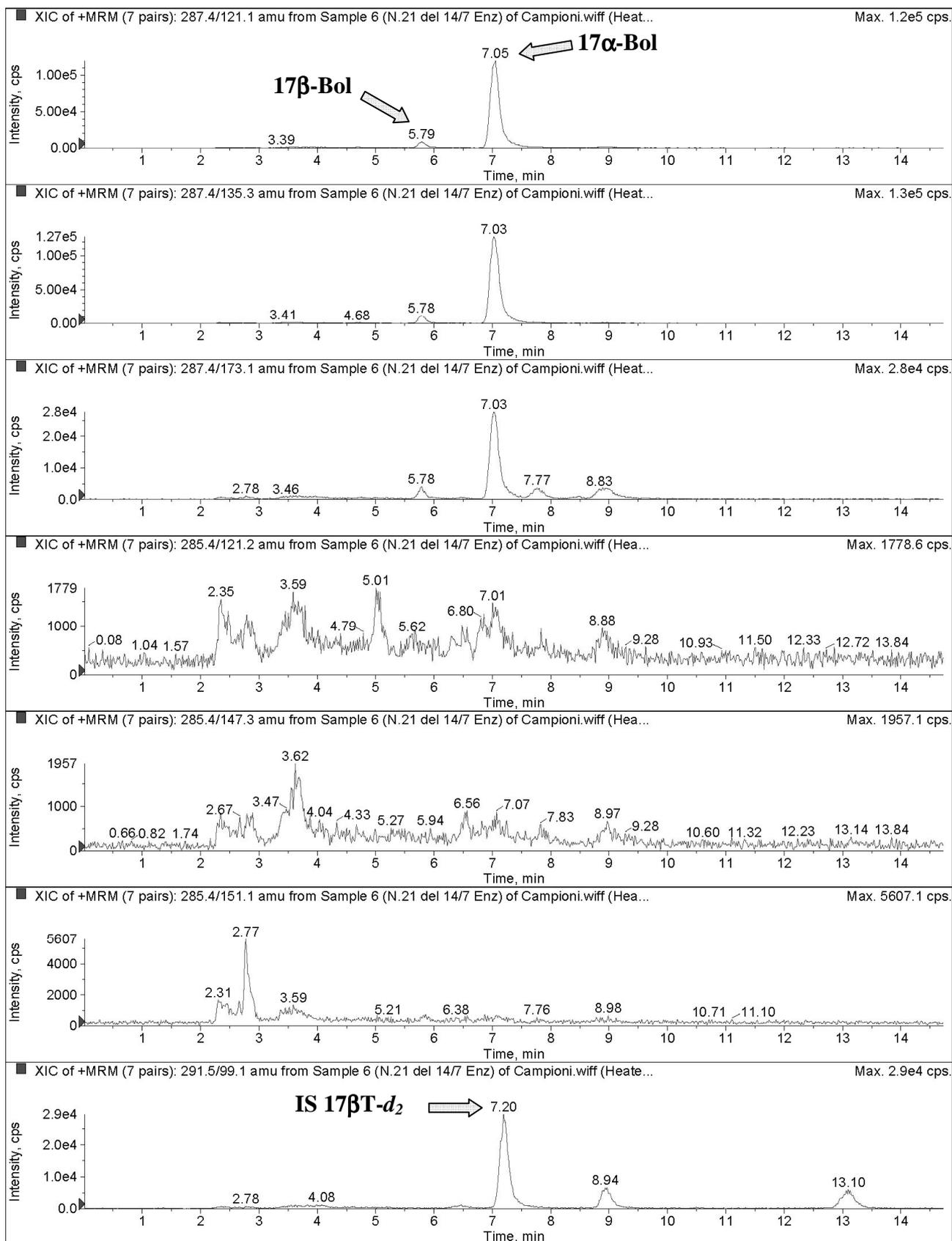


Figura 4.6 Extracted ion currents (XIC) in modalità MRM di 17α/β-Bol, ADD e 17β-Testosterone-d₂ di un campione positivo dopo la deconiugazione enzimatica. 17α-Bol quantificato alla concentrazione di 33.7 ng/ml e 17β-Bol a 1.45 ng/ml. Lo standard interno è stato aggiunto a 5 ng/mL.

Tutti i campioni sono stati analizzati in doppio per determinare la presenza delle forme libere (analisi senza deconiugazione) e delle forme coniugate (analisi dopo deconiugazione) di 17β -bol e 17α -bol nelle urine raccolte dai vitelli nel corso dell'esperimento.

Nei campioni di urina raccolti prima dell'inizio dei trattamenti, al momento della divisione degli animali nei due gruppi con diete differenti (giorno 0), e nei campioni provenienti dagli animali controllo (FM e FV) durante il periodo di trattamento (dal giorno 1 al giorno 38) non è mai stata rilevata la presenza di 17β -Bol (cioè: valori sempre inferiori al LOD) né in forma coniugata né in forma libera.

La presenza di 17β -Bol è stata invece riscontrata nel 76% dei campioni di urina degli animali trattati (TM e TV) con un valore medio di eliminazione che varia tra 0.15 e 1.37 ng/mL (figura 4.7). Il 17β -Bol è stato rilevato sempre solamente dopo deconiugazione con β -glucuronidasi/arilsulfatasi tranne in un campione del gruppo TV (giorno di trattamento 1) in cui era presente una concentrazione di 17β -Bol libero pari a 3.7 ng/ml (17β -Bol coniugato 2.2 ng/mL).

La Tabella 4.6 riporta i range e il valore di mediana dell'eliminazione urinaria di 17β -Bol.

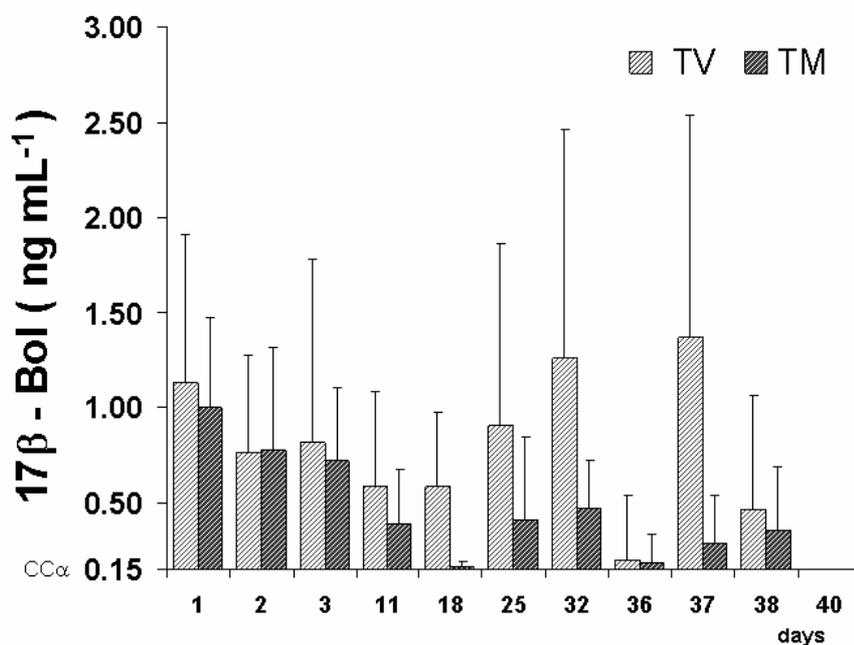


Figura 4.7 Profilo di escrezione giornaliero di 17β -Bol coniugato rilevato nelle urine dei vitelli dei gruppi TV e TM durante i 38 giorni di trattamento e al momento della macellazione (giorno 40). I valori sono riportati come media \pm deviazione standard di tutti i campioni di urina raccolti nello stesso giorno.

Tabella 4.6 Eliminazione urinaria del 17 β -boldenone coniugato: range di escrezione, mediana e numero di campioni con concentrazione superiore al livello di attenzione DG SANCO per ciascun gruppo per ogni giorno di prelievo.

		17 β-boldenone (ng/mL)			
		gruppi vitelli			
giorno di prelievo		controllo		trattamento	
		FM	FV	TM	TV
1	range	< 0.15	< 0.15	0.15 - 1.40	0.44-2.20
	mediana	< 0.15	< 0.15	1.15	0.82
	n >1	-	-	50%	40%
2	range	< 0.15	< 0.15	<0.15 - 1.40	0.16-1.50
	mediana	< 0.15	< 0.15	0.80	0.67
	n >1	-	-	40%	33%
3	range	< 0.15	< 0.15	0.3 - 1.30	0.20-2.70
	mediana	< 0.15	< 0.15	0.69	0.37
	n >1	-	-	17%	17%
11	range	< 0.15	< 0.15	0.15 - 0.92	<0.15-1.25
	mediana	< 0.15	< 0.15	0.36	0.50
	n >1	-	-	-	17%
18	range	< 0.15	< 0.15	< 0.15 -0.20	<0.15-1.20
	mediana	< 0.15	< 0.15	0.15	0.55
	n >1	-	-	-	17%
25	range	< 0.15	< 0.15	< 0.15 -1.20	0.20-2.70
	mediana	< 0.15	< 0.15	0.27	0.49
	n >1	-	-	17%	33%
32	range	< 0.15	< 0.15	< 0.15 -0.82	<0.15-6.40
	mediana	< 0.15	< 0.15	0.50	0.20
	n >1	-	-	-	17%
36	range	< 0.15	< 0.15	< 0.15 -0.3	<0.15-0.78
	mediana	< 0.15	< 0.15	0.26	< 0.15
	n >1	-	-	-	-
37	range	< 0.15	< 0.15	< 0.15 -0.67	<0.15-5.17
	mediana	< 0.15	< 0.15	0.30	0.71
	n >1	-	-	-	17%
38	range	< 0.15	< 0.15	< 0.15 -0.95	<0.15-1.50
	mediana	< 0.15	< 0.15	0.32	0.29
	n >1	-	-	-	17%
40	range	< 0.15	< 0.15	< 0.15	< 0.15
	mediana	< 0.15	< 0.15	< 0.15	< 0.15
	n >1	-	-	-	-

Appare evidente che la variazione delle concentrazioni di 17β -Bol è molto ampia. Complessivamente nei campioni prelevati durante i 38 giorni di trattamento concentrazioni superiori al valore di LOD (0.15 ng/mL) sono state riscontrate nell'80.4% dei campioni del gruppo TV e nell'84.5% dei campioni del gruppo TM mentre le analisi risultate superiori al limite di 1 ng/mL (livello di attenzione raccomandato dal DG SANCO e limite di previsto dal Piano Nazionale Residui per considerare un campione non conforme) sono state 21.4 e 12% per TV e TM rispettivamente.

Al momento della macellazione (giorno 40), due giorni dopo la sospensione dei trattamenti, non è stata rilevata la presenza di 17β -Bol.

Le figure 4.8 e 4.9 riportano l'eliminazione urinaria media di 17α -Bol negli animali controllo e negli animali trattati. La presenza del 17α -Bol in forma coniugata è stata riscontrata oltre che nel 90% dei campioni prelevati da animali trattati anche nel 67% dei campioni raccolti prima dell'inizio dei trattamenti e nel 61% degli animali di controllo durante i trattamenti.

Solo l'8% dei campioni di urina presentava anche la presenza di 17α -Bol nella forma libera.

Il riscontro del 17α -Bol nelle urine degli animali non trattati (FM e FV) è strettamente legata al contenuto di fitosteroli (β -sitosterolo, in particolare) nelle due diete. Infatti la dieta V, che presentava un contenuto di fitosteroli doppio rispetto alla dieta M causa una maggiore eliminazione di 17α -Bol coniugato (figura 4.8 e tabella 4.6); per il gruppo FM il valore medio di escrezione individuale è di circa 0.50 ng/ml (con il valore individuale più alto pari a 0.91 ng/ml), mentre per il gruppo FV il valore medio di escrezione varia tra 0.65 - 1.12 ng/ml (con il valore individuale più alto pari a 2.02 ng/ml). Il 17α -Bol coniugato è presente nel 79% e nel 42% dei prelievi eseguiti su animali dei gruppi FV ed FM rispettivamente.

Il range di escrezione di 17α -Bol coniugato riscontrato a seguito dei trattamenti è molto ampio (tabella 4.6) ma la somministrazione esogena della miscela di 17β -Bol e ADD risulta essere il fattore che maggiormente influenza l'eliminazione del 17α -Bol. Infatti la concentrazione media di 17α -Bol nelle urine raccolte il giorno 1 nei gruppi TM e TV è rispettivamente pari a 36.30 e 15.98 ng/mL e nonostante che, già ai giorni 2 e 3 la concentrazione nel gruppo TM si sia dimezzata (figura 4.9) e che nei giorni successivi si registri una lenta diminuzione dell'escrezione media nel complesso la quantità di 17α -Bol escreta dagli animali trattati è maggiore sia di quella escreta dagli animali prima dei trattamenti sia di quella escreta dagli animali controllo. L'eliminazione urinaria di 17α -Bol è sempre maggiore dell'eliminazione di 17β -Bol.

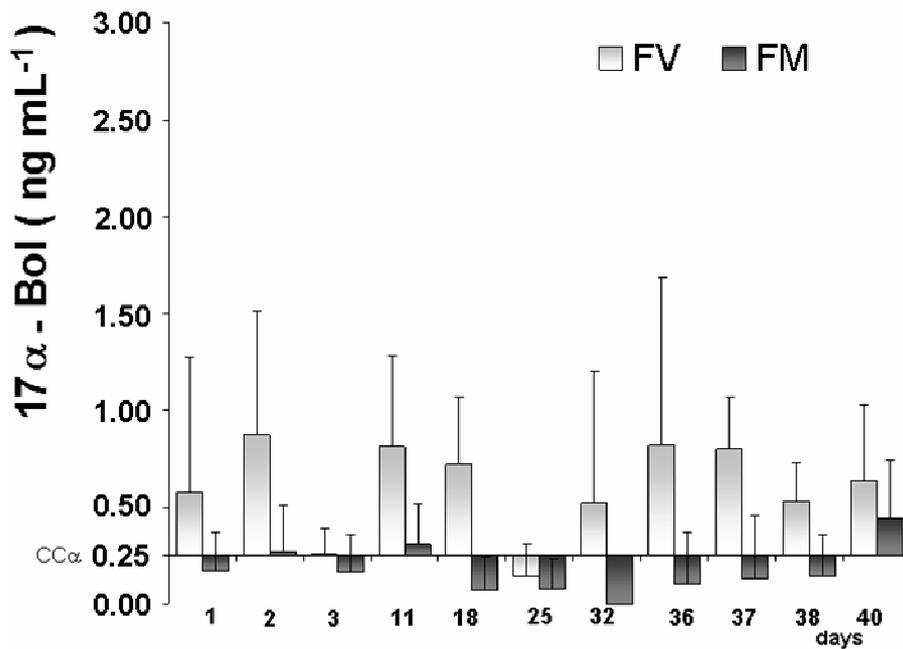


Figura 4.8 Profilo di escrezione giornaliero di 17α -Bol coniugato rilevato nelle urine dei vitelli dei gruppi FV e FM. I valori sono riportati come media \pm deviazione standard (i valori negativi riportati indicano che solo alcuni campioni raccolti in quei giorni erano superiori al valore di LOQ).

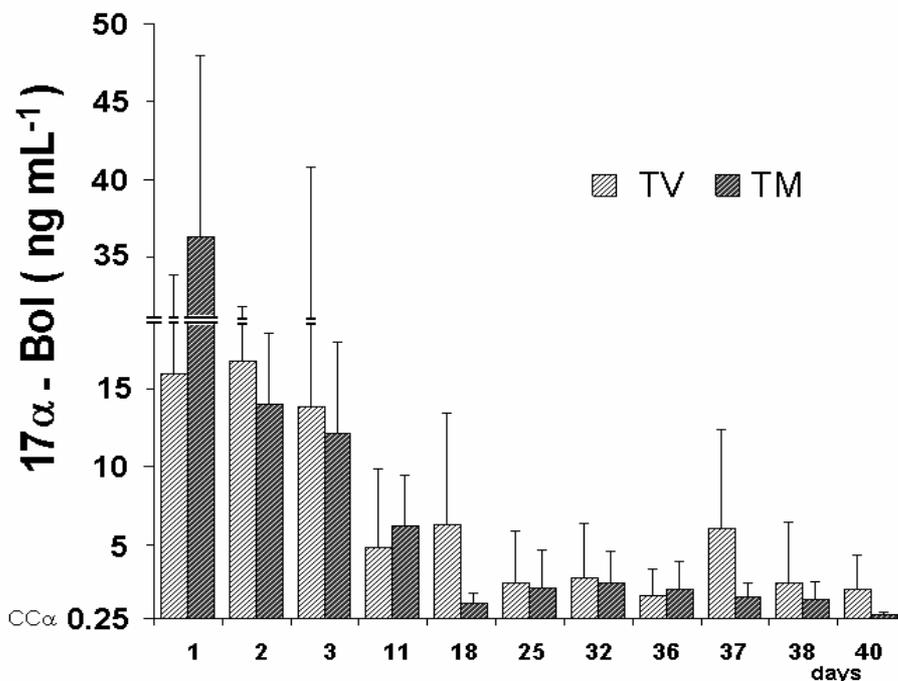


Figura 4.9 Profilo di escrezione giornaliero di 17α -Bol coniugato rilevato nelle urine dei vitelli dei gruppi TV e TM durante i 38 giorni di trattamento e al momento della macellazione (giorno 40). I valori sono riportati come media \pm deviazione standard di tutti i campioni di urina raccolti nello stesso giorno.

Tabella 4.7 Eliminazione urinaria del 17 α -boldenone coniugato: range di escrezione, mediana e numero di campioni con concentrazione superiore al livello di attenzione DG SANCO per ciascun gruppo per ogni giorno di prelievo.

		17 α-boldenone (ng/mL)			
		gruppi vitelli			
		controllo		trattamento	
giorno di prelievo		FM	FV	TM	TV
1	range	< 0.25 - 0.46	< 0.25 - 1.94	24.80 - 55.00	2.90 - 47.10
	mediana	< 0.25	0.48	31.6	9.20
	n > 2	-	-	100%	100%
2	range	< 0.25 - 0.60	< 0.25 - 1.8	6.80 - 24.00	1.70 - 35.30
	mediana	< 0.25	0.70	12.3	16.75
	n > 2	-	-	100%	67%
3	range	< 0.25 - 0.44	< 0.25 - 0.37	3.40 - 24.00	1.70 - 68.80
	mediana	< 0.25	0.30	11	2.85
	n > 2	-	-	100%	83%
11	range	< 0.25 - 0.56	< 0.25 - 1.23	2.80 - 11.40	< 0.25 - 11.4
	mediana	< 0.25	0.95	5.75	3.80
	n > 2	-	-	100%	60%
18	range	< 0.25	0.40 - 1.20	0.25 - 2.2	1.1 - 19.4
	mediana	< 0.25	0.59	1.15	3.30
	n > 2	-	-	17%	67%
25	range	< 0.25	< 0.25 - 0.39	< 0.25 - 6.0	< 0.25 - 9.1
	mediana	< 0.25	< 0.25	1.2	1.50
	n > 2	-	-	33%	17%
32	range	< 0.25	< 0.25 - 1.65	0.86 - 6.3	< 0.25 - 9.7
	mediana	< 0.25	< 0.25	1.95	2.20
	n > 2	-	-	50%	67%
36	range	< 0.25 - 0.65	< 0.25 - 2.20	< 0.25 - 4.8	< 0.25 - 4.5
	mediana	< 0.25	0.67	1.9	1.40
	n > 2	-	17%	33%	20%
37	range	< 0.25 - 0.8	0.56 - 1.20	0.57 - 3.1	< 0.25 - 16
	mediana	< 0.25	0.72	1.7	5.5
	n > 2	-	-	33%	60%
38	range	< 0.25	0.28 - 0.8	< 0.25 - 3	< 0.25 - 10.3
	mediana	< 0.25	0.54	1.5	0.77
	n > 2	-	-	33%	33%
40	range	< 0.25 - 0.91	0.30 - 1.40	< 0.25 - 0.66	< 0.25
	mediana	< 0.25	0.54	0.50	< 0.25
	n > 2	-	-	-	-

Un altro risultato da sottolineare è che una concentrazione di 17α -Bol superiore a 2 ng/mL (livello di attenzione raccomandato dal DG SANCO) è stata riscontrata nel 57,1 e nel 58,6% dei campioni dei gruppi TV e TM e solo nell'1% degli animali controllo. In particolare, durante i primi 3 giorni di trattamento la percentuale di superamento del livello di attenzione nei campioni raccolti dagli animali trattati è del 100% nei vitelli TM e dell'83% nei vitelli TV.

L'ADD è stato rilevato solo in alcuni campioni a una concentrazione vicina al LOD, con l'unica eccezione di un campione del gruppo TV (lo stesso in cui è stato riscontrato 17β -Bol libero) in cui l'ADD era presente ad una concentrazione pari a 1.5 ng/mL.

DISCUSSIONE

Per verificare l'influenza dei fitosteroli contenuti nei sostituti del latte (latte in polvere) per vitelli a carne bianca nell'eliminazione dei metaboliti del boldenone, la concentrazione delle forme coniugate di 17β -Bol e 17α -Bol e dell' ADD è stata misurata per un periodo di 40 giorni nell'urina in due gruppi di vitelli a carne bianca alimentati con due diete con diverso contenuto di fitosteroli e in due gruppi di vitelli alimentati con le stesse due diete ma contemporaneamente trattati con una miscela di 17β -bol e ADD per via orale.

I fitosteroli sono strutturalmente simili al colesterolo che come è noto rappresenta il maggiore componente della frazione lipidica di origine animale ed è il precursore degli steroidi naturali. La presenza degli steroli vegetali nei mangimi destinati ai vitelli a carne bianca è aumentata dopo la crisi della BSE quando è aumentato l'utilizzo di grassi di origine vegetale. I fitosteroli sono scarsamente assorbiti a livello intestinale e alcuni di essi (incluso il β -sitosterolo) possono essere trasformati dalla flora microbica intestinale in sostanze con attività ormonale. A causa di questa possibile interferenza metabolica particolare attenzione è stata dedicata al ruolo dei fitosteroli e dei loro derivati saturi denominati fitostanoli nei mangimi animali.

Utilizzando l'invertebrato *Neomysis integer* e le larve di *Lucilia serricata* (due modelli alternativi agli animali vertebrati negli esperimenti di metabolismo *in vitro*) è stato possibile dimostrare la trasformazione del β -sitosterolo in AED, il precursore del 17β -testosterone (figura 4.10).

Queste osservazioni suggeriscono che la presenza di 17α -Bol, 17β -Bol e ADD nell'urina dei vitelli a carne bianca possa essere influenzata dalle quantità di fitosteroli assunti con la dieta.

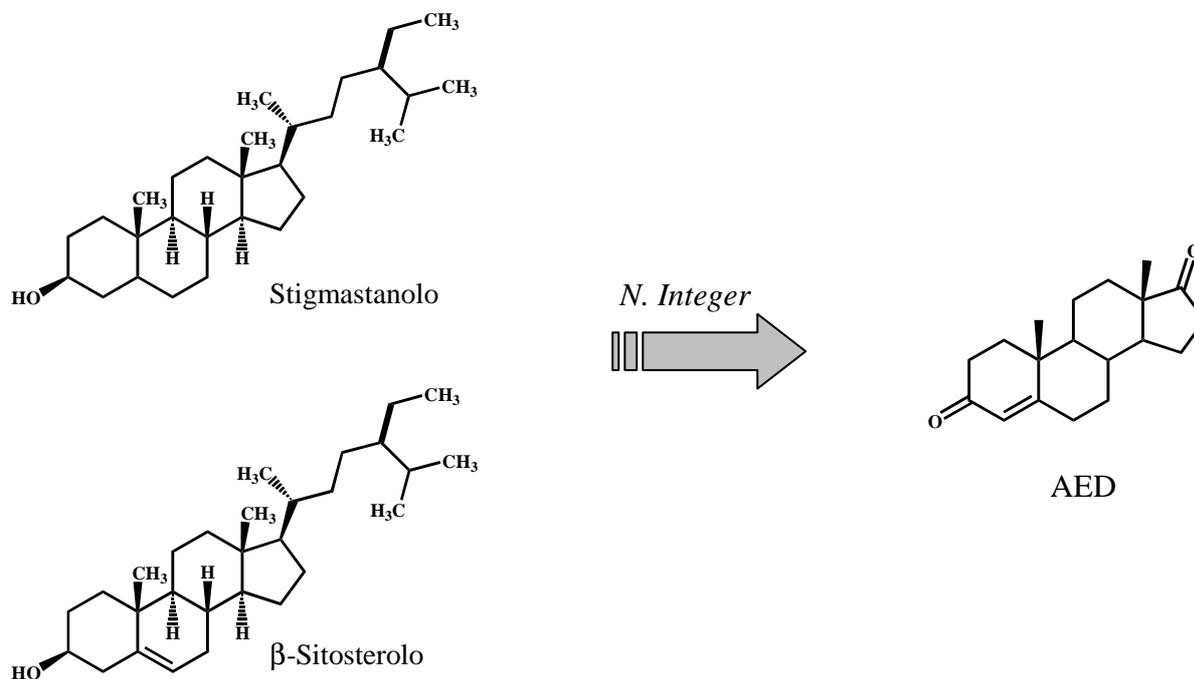


Figura 4.10. Conversione di alcuni steroli vegetali in AED .

Contemporaneamente si è voluto valutare l'effetto della dieta sull'escrezione dei metaboliti del boldenone in seguito ad un trattamento effettuato per via orale associato all'alimento con una combinazione di 17β -Bol e ADD nel rapporto di 9 a 1. La scelta della posologia deriva dalle indicazioni ricavate in seguito a numerosi sequestri di preparazioni farmaceutiche clandestine contenenti miscele di 17β -Bol e ADD, destinate ad aziende agricole, effettuati dai NAS e dai campioni di urina di vitelli a carne bianca risultati non conformi per la presenza di residui di boldenone nel PNR.

In assenza di qualsiasi somministrazione esogena di 17β -Bol, la concentrazione più elevata di 17α -Bol coniugato è stata riscontrata nelle urine dei vitelli alimentati con il latte con la concentrazione più elevata di β -sitosterolo. Questi risultati confermano quindi la teoria che il β -sitosterolo possa svolgere un ruolo nella produzione di ADD come precursore dell' 17α -Bol coniugato escreto nell'urina e che di conseguenza parte del 17α -Bol urinario possa essere originato dalla dieta (De Brabander et al., 2004) ma i livelli urinari riscontrati sono sempre stati (99%) inferiori al limite di attenzione di 2 ng/ml raccomandato dal DG SANCO.

L'elevata variabilità osservata nell'escrezione del 17α - e 17β -Bol nel corso dei trattamenti può essere attribuita alla tipologia di campionamento utilizzata (attesa della minzione spontanea dell'animale e conseguente possibile raccolta di un volume variabile di urina) e alla mancanza di una normalizzazione dei dati di escrezione ma si è ritenuto di applicare le stesse procedure usate nella sorveglianza

Nel complesso la concentrazione di 17α -Bol durante il trattamento è stata molto superiore a quella escreta in assenza di trattamento questo può essere dovuto alla trasformazione della miscela di 17β -Bol e ADD somministrata nell' α -epimero inattivo. La via metabolica ipotizzata è che il 17β -Bol sia sottoposto prima ad una ossidazione dalla 17β -idrossisteroide ossidoriduttasi che portano alla formazione di ADD e che successivamente da ADD sia ridotto a 17α -Bol dall'enzima 17α -idrossisteroide ossidoriduttasi, molto attivo nel bovino.

La quantità di 17α -Bol eliminato poche ore dopo il primo trattamento nelle urine degli animali trattati conferma che 17β -Bol e ADD sono rapidamente assorbiti per os e prontamente metabolizzati in 17α -Bol, che si conferma come il maggiore metabolita in vivo (Merlanti et al, 2006). La concentrazione di 17α -Bol nell'urina sempre più elevata di quella del 17β -Bol, suggerisce che come accade per il testosterone e il nortestosterone (Daeseleire et al., 1993) l'interconversione della forma β a quella α avviene rapidamente (più rapidamente della reazione inversa) e che allo stesso modo la coniugazione del 17α -Bol potrebbe essere più veloce di quella del 17β -Bol.

Durante il trattamento, con l'eccezione del primo giorno, l'escrezione di 17α -Bol nei due gruppi di trattamento è stato sempre dello stesso ordine di grandezza come se l'aumento dell'escrezione dovuta al trattamento sia in grado di mascherare le differenze causate dalla dieta riscontrati nei gruppi FV e FM. Questi risultati confermano quindi che la somministrazione giornaliera esogena a basso dosaggio di 17β -bol e ADD è in grado di causare l'escrezione di 17α -bol in quantità molto più elevate rispetto ai fitosteroli presenti nella dieta. Alla luce di questi risultati il riscontro di una concentrazione urinaria di 17α -bol coniugato superiore a 2 ng/ml può essere attribuita ad una somministrazione esogena confermando quindi la validità del limite di attenzione raccomandato dal DG SANCO che nel caso di riscontro di una concentrazione di 17α -bol in urine di bovino superiore alla soglia di 2 ng/ml impone di approfondire le indagini per verificare la possibilità di un trattamento illecito con boldenone.

La presenza di 17β -bol coniugato nelle urine è stata riscontrata solo in seguito ai trattamenti. Questo risultato concorda con quanto riportato da Nielen et al., (2003, 2007) e conferma che la ricerca delle forme coniugate di 17β -bol permette di identificare l'uso illegale del

boldenone permettendo anche di superare il problema di eventuali contaminazioni fecali dell'urina.

In base ai nostri risultati qualsiasi concentrazione di 17β -bol coniugato nell'urina può essere considerato segno di trattamento illecito.

La questione che rimane aperta è però per quanto tempo dopo la sospensione del trattamento questo sia ancora identificabile grazie alla ricerca nelle urine del 17β -bol coniugato.

Nel corso dell'esperimento la presenza del 17β -bol coniugato è stata rilevata solo durante il periodo di trattamento; infatti probabilmente a causa del basso dosaggio utilizzato e della modalità di somministrazione per os già due giorni dopo la sospensione del trattamento nell'urina non è stata riscontrata la presenza di 17β -bol mentre è riportato che la sua presenza, dopo una somministrazione di 17β -bol undecanoato per via intramuscolare, è quantificabile fino a 20 giorni dopo la sospensione del trattamento (Sangiorgi et al., 2005). I fattori che possono influenzare la possibilità di identificare i campioni di urina non conformi in seguito ad un trattamento sono numerosi. Influenzano la presenza di residui nelle urine sia la via di somministrazione utilizzata (via intramuscolare o via orale) che i composti (forme esterificate o forme libere), le preparazioni farmaceutiche (soluzioni oleose iniettabili o soluzioni diluite nel latte) e le dosi impiegate.

Anche durante il trattamento la diminuzione dell'eliminazione urinaria dei metaboliti di 17β -bol e ADD appare evidente. La diminuzione delle concentrazioni urinarie del 17α -bol durante la prima settimana è notevole (Fig. 4.9) e anche i livelli urinari di 17β -bol mostrano un trend discendente durante il trattamento (i valori medi di escrezione dei vitelli del gruppo TV nei giorni di prelievo 25, 32 e 37 rappresentano un'eccezione a questa tendenza solo per l'escrezione particolarmente elevata di 17β -bol da parte di un singolo animale).

La rapida diminuzione delle concentrazioni urinarie nonostante la somministrazione giornaliera della miscela di 17β -bol e ADD sempre alla stessa dose potrebbe essere stata causata dal coinvolgimento nel metabolismo di queste sostanze, in aggiunta alle idrossisteroido ossidoriduttasi, anche di altri enzimi epatici quali le idrossilasi citocromo P450 dipendenti che potrebbero catalizzare la trasformazione del 17β -bol e dell'ADD in altri metaboliti rispetto a quelli da noi ricercati nelle urine. Il metabolismo in vitro del 17β -bol e dell'ADD (che verrà trattato in esteso nel prossimo capitolo) conferma che i microsomi epatici di bovino producono diversi metaboliti idrossilati tra cui il 6β -idrossi- 17β -bold (Merlanti et al., 2007).

I risultati preliminari degli studi effettuati sulle attività enzimatiche delle ossigenasi a funzione mista dei fegati dei vitelli sottoposti a trattamento nel corso della sperimentazione

indicano una debole induzione solo di alcune isoforme nei fegati degli animali del gruppo TM che sono quelli che hanno evidenziato la diminuzione più accentuata dell'escrezione dei coniugati nel tempo.

Le variabili elencate rendono evidente le difficoltà che incontra l'attività di sorveglianza dei trattamenti illegali. Appare evidente che data la rapidità con cui il 17β -bol coniugato, che rappresenta la prova della somministrazione illegale, viene completamente eliminato dall'organismo sarebbe necessario riuscire ad individuare dei metaboliti marker alternativi.

Attualmente numerosi studi sono in corso per cercare di individuare dei metaboliti specifici (prodotti sia dalle reazioni di fase I che di fase II) che permettano di rafforzare la sorveglianza (Le Bizec et al., 2006).

Conclusioni

I risultati ottenuti dal presente studio confermano che in assenza di trattamento le urine di vitello non contengono residui di 17β -bol (libero e coniugato) e di ADD e contribuiscono a chiarire l'origine del 17α -bol che sembra essere collegata alla dieta. Infatti, come indicato da De Brabander et al. (2004) il β -sitosterolo riveste un ruolo significativo nella produzione del 17α -bol e di conseguenza influenza l'eliminazione di 17α -bol coniugato nelle urine come dimostra la presenza ubiqua e a concentrazioni maggiore di 17α -bol coniugato nelle urine degli animali nutriti con una dieta con un maggiore contenuto di fitosteroli.

I profili di eliminazione dei metaboliti coniugati del boldenone in caso di trattamento per via orale evidenziati nel corso di questa prova sperimentale suggeriscono la necessità di individuare ulteriori metaboliti marker per rafforzare le strategie di sorveglianza come già suggerito da Le Bizec et al. (2006).

PUBBLICAZIONI

Publicazioni su rivista:

- 3) **Gallina G**, Ferretti G, Merlanti R, Civitareale C, Capolongo F, Draisci R, Montesissa C. “Boldenone, boldione, and milk replacers in the diet of veal calves: the effects of phytosterol content on the urinary excretion of boldenone metabolites”. *J Agric Food Chem.* 2007 Oct 3; 55(20):8275-83.

Comunicazioni a congresso:

- 2) Merlanti R., Ferranti C., Ferretti G., De Liguoro M, Civitareale C., **Gallina G.**, Draisci R., Montesissa C. (2006): “Oral administration of boldenone and boldione to veal calves: disposition and elimination rate of boldenone metabolites”. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics (October 2006); Vol. 29 s 1: 167 (Proceedings of the 10th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology).*
- 3) Ferretti G., Merlanti R., Fantozzi C., Capolongo F., **Gallina G.**, Draisci R., Montesissa C. (2006): “Excretion profile of α -boldenone in urine of veal calves fed with milk replacer”. *Abstract from the 5th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis* May 16-19 2006, Antwerp, Belgium; pag. 15.

CAPITOLO 5

Studio *in vitro* del metabolismo del boldenone e del boldione nel bovino

La conoscenza delle vie metaboliche di un particolare steroide sintetico può essere importante per migliorare la sorveglianza di un suo eventuale abuso nell'allevamento del bovino. Molti steroidi anabolizzanti sono infatti estensivamente metabolizzati e, di conseguenza nelle urine o in altri escreti e tessuti, i composti parentali non sono identificabili o lo sono solo per breve tempo dopo la somministrazione (Batjoens *et al.*, 1994; Schänzer, 1996). Questa possibilità è ben esemplificata dai metodi di screening utilizzati per identificare l'uso illegale di alcuni steroidi quali il clortestosterone, lo stanozololo e il trembolone dove la presenza delle sostanze proibite è dimostrata per mezzo della ricerca di un loro metabolita (Leyssens *et al.*, 1993; Courtheyn *et al.*, 2002). Purtroppo le informazioni disponibili sull'importanza di singoli metaboliti rispetto alla biotrasformazione complessiva e alla conseguente eliminazione di molti promotori di crescita nel bovino sono ancora abbastanza limitate. E' possibile affermare quindi che le possibilità offerte dall'applicazione della ricerca dei metaboliti per il controllo dell'uso degli steroidi non siano ancora pienamente sfruttate.

In generale, per approfondire la biotrasformazione di uno xenobiotico nell'organismo animale, accanto agli studi *in vivo*, che prevedono l'utilizzo di animali da sperimentazione per il monitoraggio delle concentrazioni plasmatiche delle sostanze somministrate e la ricerca degli eventuali metaboliti presenti negli escreti, possono essere utilizzati dei sistemi *in vitro* quali per esempio le frazioni subcellulari epatiche e le colture primarie di epatociti. Negli anni, l'enorme progresso nella produzione di farmaci e composti chimici ha generato un crescente interesse per lo sviluppo e l'applicazione delle metodiche alternative *in vitro* anche in campo veterinario e in particolare nel settore delle produzioni animali, sia per motivi di tutela della salute pubblica che, da un punto di vista etico ed economico, per una limitazione dell'utilizzo di animali da esperimento (Van't Klooster, 1992 a).

Le tecniche *in vitro*, anche se non possono sostituire completamente le sperimentazioni sugli animali, hanno dimostrato di essere in grado di fornire indicazioni per le successive ricerche *in vivo* e si sono rilevate utili come metodiche di screening preventivo per la ricerca di metaboliti e nei test di tossicità. I sistemi *in vitro* infatti permettono lo studio di specifiche vie metaboliche in condizioni strettamente controllate, permettono di effettuare rapidamente e in

contemporanea numerose prove su sostanze diverse, permettono di utilizzare dosi dello xenobiotico testato che sarebbero tossiche per l'animale facilitando così l'identificazione dei metaboliti prodotti grazie anche alla semplicità della matrice utilizzata (Van't Klooster, 1992 b).

Schematicamente, la biotrasformazione degli xenobiotici può essere considerata come un processo bifasico. Ossidazione, riduzione, dealogenazione e idrolisi sono tra le principali reazioni definite di fase I, mentre le reazioni di coniugazione e sintesi sono chiamate nel loro insieme reazioni di fase II. Le reazioni di fase I trasformano i substrati in derivati più idrosolubili; la loro funzione primaria è quella di aggiungere e di esporre determinati gruppi funzionali nella molecola del composto che viene metabolizzato per consentire che il composto possa subire ulteriori processi metabolici attraverso le reazioni di fase II che sono reazioni biosintetiche con molecole endogene (ad es. acido glucoronico, acido acetico, ecc.) che portano alla formazione di un coniugato dotato di maggiore solubilità in acqua ed elevata ionizzazione a pH fisiologico. Il fegato è l'organo che quantitativamente è il maggiore responsabile delle reazioni di biotrasformazione. (Nebbia et al, 2003).

Le due famiglie enzimatiche principali coinvolte nelle biotrasformazioni di fase I sono il sistema delle monossigenasi citocromo P450 dipendenti o monoossigenasi a funzione mista (MFO) e il sistema delle monossigenasi flaviniche (FMO); questi sistemi enzimatici sono localizzati nelle membrane del reticolo endoplasmatico delle cellule. La superfamiglia del P450 può essere considerata il catalizzatore biologico più versatile, essendo implicata non solo nel metabolismo di sostanze di origine esogena ma anche di vari composti endogeni come ormoni steroidei, acidi biliari, prostaglandine, leucotrieni, acidi grassi e vitamine. Ciascuna isoforma di P450 può avere un'assoluta specificità di substrato, ma generalmente catalizza reazioni di ossigenazione di substrati diversi, sovrapponendo la propria attività catalitica a quella di altri enzimi. Le ossidazioni delle MFO sono le principali vie di biotrasformazione di numerosi composti endogeni ed esogeni. Il metabolismo ossidativo epatico riflette l'attività di diverse isoforme di citocromo P450 (Paine, 1991; Nebert, *et al.*, 1991).

Tra i sistemi *in vitro* per lo studio del metabolismo epatico quelli più frequentemente utilizzati, nelle specie di interesse veterinario, sono le colture primarie di epatociti e le frazioni subcellulari (omogeneo di tessuto, frazione post mitocondriale, frazione microsomiale, frazione citosolica).

Le colture cellulari primarie di epatociti isolati dal fegato di un 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 (Snell *et al.*, 1987).

Poichè le biotrasformazioni ossidative di fase I sono le reazioni più importanti per il metabolismo degli steroidi (Van Puymbroeck *et al.*, 1998 a) e gli enzimi coinvolti sono quasi esclusivamente localizzati a livello cellulare nel reticolo endoplasmatico, tra le frazioni subcellulari quelle più frequentemente utilizzate negli studi di metabolismo *in vitro* degli steroidi sono i microsomi. I microsomi infatti, sono delle microvescicole ottenute dalla frammentazione del reticolo citoplasmatico che conservano quasi intatta la sua attività enzimatica. In laboratorio il loro isolamento avviene mediante centrifugazione differenziale dell'omogenato di tessuto. In seguito a omogenizzazione di un campione di tessuto si ottiene la rottura del reticolo endoplasmatico e i frammenti delle membrane si aggregano a formare microvescicole: i microsomi. Il surnatante, che si ottiene dopo centrifugazione (per eliminare i nuclei, mitocondri e lisosomi, oltre le cellule ancora integre e frammenti grossolani di membrana) viene a sua volta centrifugato e il materiale che precipita (pellet) è fortemente arricchito in microsomi, mentre il surnatante contiene enzimi solubili e prende il nome di citosol (Snell *et al.* 1987).

L'efficacia dell'utilizzo di sistemi *in vitro* per lo studio della biotrasformazione degli steroidi al fine di identificare dei metaboliti marker da ricercare negli escreti e nei tessuti per monitorare il loro utilizzo è dimostrato dai risultati di molte ricerche. Ho *et al.* (2007) hanno identificato nell'urina di cavalli trattati con turibanolo (steroide androgeno di sintesi) due metaboliti idrossilati precedentemente identificati *in vitro* tramite incubazione con microsomi epatici. Van Puymbroeck *et al.*(1998 a) hanno dimostrato che anche nel bovino i sistemi *in vitro* possono dare informazioni utili per lo screening *in vivo*. Nello studio citato, per verificare la capacità "predittiva" di microsomi ed epatociti nell'identificazione di metaboliti marker applicabili in vivo, è stata studiata in primo luogo la biotrasformazione *in vitro* del clostebolo, uno steroide il cui metabolismo *in vivo* era già noto, ed è stato verificato che i metaboliti prodotti *in vitro* coincidono con quelli usati come marker *in vivo*; successivamente è stato studiato la biotrasformazione *in vitro* di due steroidi, noretandrolone (NE) e etilestrenolo (EES), il cui metabolismo nel bovino era ancora sconosciuto. L'utilizzo di microsomi ed epatociti ha permesso di identificare la conversione del EES ad NE e la produzione di un metabolita ridotto (17α -etil- 5β -estran- $3\alpha,17\beta$ -diolo; EED) comune ad entrambi gli steroidi. Successivamente, una somministrazione ad alcuni bovini di EES e NE

ha confermato la presenza nell'urina degli animali trattati del metabolita EED mentre non è stata rilevata la presenza di EES e il NE è stato riscontrato solo per un breve periodo di tempo dopo la sospensione del trattamento. Le prove in vivo hanno confermato che l'EED può essere utilizzato come marker di trattamento con EES e NE e in seguito la sua presenza è stata segnalata in alcuni casi di abuso di NE individuati nei programmi di sorveglianza dell'uso dei promotori di crescita (Van Puymbroeck *et al.*, 1999).

L'efficacia dell'utilizzo dei metodi *in vitro* nel bovino per studiare il metabolismo degli steroidi è confermato da numerosi altri studi (Clouet *et al.*, 1998; Coldham *et al.*, 1998). Gli esempi elencati confermano che l'utilizzo di sistemi *in vitro* quali gli epatociti e le frazioni subcellulari riduce la necessità di esperimenti in vivo e fornisce dei metodi rapidi e relativamente semplici per l'identificazione di metaboliti marker per l'identificazione dell'uso illegale degli steroidi nell'allevamento del bovino (Hooijerink *et al.* 1998).

Il 17 β -boldenone è uno steroide androgeno con spiccate proprietà anabolizzanti su cui è in corso un dibattito scientifico che riguarda la sua origine nel bovino. I numerosi studi di deplezione residuale *in vivo* del boldenone e dei suoi metaboliti effettuati nel bovino dimostrano che, dopo una somministrazione esogena di 17 β -boldenone (17 β -bol) o suoi esteri, il principale metabolita riscontrato nell'urina è il 17 α -bol. Poiché il 17 α -bol non può essere utilizzato come marker di trattamento perché nel bovino può essere anche di origine endogena attualmente il residuo marker della somministrazione esogena è la forma coniugata del 17 β -bol. Ulteriori studi sono in corso per identificare altri metaboliti significativi che permettano di distinguere la somministrazione esogena da una produzione endogena/contaminazione fecale e che permettano di identificare il trattamento per periodi più prolungati dopo la sua sospensione (Le Bizec *et al.*, 2006). In questo capitolo sono presentati i risultati dello studio *in vitro* del metabolismo del 17 β -boldenone e del suo precursore/metabolita ADD con frazioni subcellulari epatiche e renali di bovino. Lo scopo di questo lavoro è di approfondire le conoscenze sulla biotrasformazione del boldenone nel bovino e identificare dei possibili metaboliti marker di trattamento.

Materiali e metodi

Reagenti e composti chimici

Tutti i solventi che sono stati utilizzati erano di tipo “HPLC grade” o “analytical grade” e sono stati acquistati presso la Riedel-de Haen (Seelze, Germany). L’acqua è stata purificata da un sistema MILLI-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Tutti i sali utilizzati (analytical grade) sono stati acquistati presso la Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA) o presso la Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

Il glucosio-6-fosfato, l’enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi e i cofattori (NADP, NAD, NADH) sono stati acquisiti dalla Sigma–Aldrich. Lo standard analitico di 17 α -bol è stato acquistato presso il RIVM (Bilthoven, The Netherlands); 17 β -bol, l’ADD, 17 β -testosterone e 17 α -testosterone (standard interno) dalla Steraloids (Newport, RI, USA); 6 β -, 16 α - e 16 β -idrossi-17 β -bol e 6 β - e 16 α - idrossi-17 α -bol dalla Alltech (State College, PA, USA).

Preparazione delle frazioni subcellulari

Le frazioni subcellulari sono state ottenute dai fegati di tre vitelli a carne bianca di razza Frisona di età di 32 settimane (peso medio 220 \pm 15 kg) e dai reni di tre vitelloni di circa 20 mesi di età (peso medio 550 \pm 18 kg). Questi animali provenivano da allevamenti autorizzati ed erano stati allevati in condizioni sperimentali controllate per garantire l’assenza di trattamenti sia terapeutici che illeciti prima della macellazione.

Il lobo quadrato del fegato e una porzione di rene sono stati prelevati al momento del sacrificio degli animali e posti immediatamente in una soluzione di KCl 1.15% mantenuta in ghiaccio.

Tutti i passaggi svolti nella preparazione delle frazioni subcellulari sono stati eseguiti in ghiaccio utilizzando tamponi preventivamente portati alla temperatura di 4°C.

La frazione dell’omogenato (H) è stata preparata partendo da 10 grammi di tessuto che sono stati omogenizzati per mezzo di uno strumento Potter fornito di un pestello in Teflon in un tampone Tris-HCl 10 mM pH 7.6 contenente saccarosio 0.25 M e EDTA 0.1 mM e successivamente centrifugati a 600 x g per 10 minuti a 4°C. Il surnatante ottenuto, che corrisponde all’omogenato (H), è stato stoccato a -80°C.

La frazione post-mitocondriale (S9), i microsomi (MIC) e i citosols (C) sono stati ottenuti direttamente dal tessuto omogeneizzato in una soluzione (1:1; v:v) di tampone fosfato 0.1 M pH 7.4 e KCl 1.15%. Il tessuto omogenizzato è stato centrifugato a 9000 x g per 20 minuti a

4°C e il surnatante ottenuto, che corrisponde alla frazione S9, è stato o aliquotato e stoccato a -80°C o centrifugato a 100000 x g per 60 minuti a 4°C per ottenere MIC e C. Il pellet microsomiale è stato risospeso in tampone fosfato 0.1 M pH 7.4 e conservato a -80°C.

La concentrazione proteica delle frazioni subcellulari è stata determinata con il metodo di Lowry *et al.* (1951) utilizzando l'albumina bovina come standard e una spettrofotometro UV/vis (Jasco, 7800).

Prove di metabolismo *in vitro*

Tutte le prove *in vitro* con le diverse frazioni subcellulari sono state effettuate utilizzando la stessa concentrazione proteica. Per misurare le reazioni di ossidazione e idrossilazione citocromo P450 dipendenti è stato impiegato un sistema NADPH rigenerante mentre per verificare le reazioni catalizzate delle ossidoriduttasi sono stati utilizzati i cofattori NAD e NADH.

Condizioni di incubazione con il sistema NADPH rigenerante

Le prove di metabolismo *in vitro* sono state eseguite in tre ripetizioni incubando le provette a 37°C per 45 min in un bagno termostato fornito di agitatore. Ciascuna provetta conteneva, in un volume di 0,4 ml di tampone fosfato 0.1 M pH 7.4, 1 mg/ml di proteina di H o S9 o MIC o C, NADP 1mM, glucosio 6-fosfato 10 mM, 1.5 UI di glucosio 6-fosfato deidrogenasi, MgCl₂ 30 µM e il substrato (17β-bol o ADD) alla concentrazione finale di 25 µM.

Utilizzando le stesse condizioni descritte sono state effettuate anche delle incubazioni con MIC epatici del 17α-bol. Ogni prova di incubazione prevedeva un bianco (in assenza del sistema NADPH rigenerante) per verificare le eventuali reazioni non enzimatiche. Il recupero è stato misurato preparando degli incubati in cui le reazioni enzimatiche sono state immediatamente bloccate dopo l'aggiunta del substrato.

Condizioni di incubazione con NAD e NADH

Le prove di metabolismo *in vitro* sono state eseguite in tre ripetizioni incubando le provette a 37°C per 30 min in un bagno termostato fornito di agitatore. Ciascuna provetta conteneva, in un volume di 0,4 ml di tampone fosfato 0.1 M pH 7.4, 1 mg/ml di proteina di H o S9 o MIC o C, NAD o NADH 1mM, MgCl₂ 30 µM e il substrato (17β-bol o ADD) alla concentrazione finale di 25 µM. Ogni prova di incubazione prevedeva un bianco (in assenza di NAD o NADH) per verificare le eventuali reazioni non enzimatiche. Il recupero è stato

misurato preparando degli incubati in cui le reazioni enzimatiche sono state immediatamente bloccate dopo l'aggiunta del substrato.

Estrazione

Le reazioni sono state bloccate ponendo le provette in ghiaccio e aggiungendo 3 ml di diclorometano preventivamente raffreddato a 4°C; prima dell'aggiunta del solvente è stato addizionato lo standard interno 17 α -testosterone alla concentrazione di 25 μ M. Dopo una agitazione di 10 minuti veniva recuperata la fase organica che veniva portata a secco per mezzo di un evaporatore StepBio EZ 2 PLUS.

Analisi in HPLC

Il sistema HPLC Jasco (Japan Spectroscopic) utilizzato è formato da una pompa PU-980, un miscelatore LG 980-02 Ternary Gradient Unit, un degasatore Gastorr GT-103, un autocampionatore AS 950 e un detector UV-975 UV/VIS.

La colonna utilizzata era una SYNERGI Fusion-RP 80 (150 x 4.6 mm, 4 μ m) e l'eluizione degli analiti è stata ottenuta in una corsa di 60 minuti usando acqua (A) e acetonitrile (B) utilizzando il seguente gradiente: il solvente B è stato mantenuto al 20% per 9 minuti per poi raggiungere il 40% in 42 min e successivamente ritornare al 20% in 5 min. Il detector è stato settato a 247 nm. E' stato utilizzato un volume di iniezione di 10 μ L.

Tabella 5.1. Standard analitici e condizioni MS-MS utilizzate nell'analisi LC/MS-MS.

Standard analitici	tempo di ritenzione (minuti)	ione precursore (m/z)	ioni prodotto (tranzizioni I e II) (m/z)	Cone (Volts)	Coll Energy (eV)
6 β ,17 β -OH-BOLD	4	303	121;133	35	25;20
6 β ,17 α -OH-BOLD	5.4	303	121;133	35	25;20
16 α ,17 β -OH-BOLD	6	303	121;133	35	25;20
16 β ,17 β -OH-BOLD	8	303	121;133	35	25;20
16 α ,17 α -OH-BOLD	10	303	121;133	35	25;20
17- β -BOLD	13	287	121; 135	35	26; 15
ADD	14	285	121;147	35	25;15
17- α -BOLD	15	287	121; 135	35	26; 15

Analisi in LC-MS/MS

Il sistema di analisi in cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS/MS) che è stato utilizzato è costituito da un gruppo LC modello Alliance 2695 della Waters (Milford, MA, USA) equipaggiato con uno spettrometro di massa a Triplo Quadrupolo (Micromass, Manchester, UK) fornito di un sistema di ionizzazione ad Electrospray (ESI) operante in modalità positiva.

Le analisi sono state eseguite in modalità Full Scan e utilizzando la modalità Multiple Reaction Monitoring (MRM). Nella modalità MRM per ciascun analita sono stati monitorati i due ioni prodotto (product ion o daughter ion) più abbondanti utilizzando le condizioni riportate nella tabella 5.1.

La colonna utilizzata era una X-Terra MS C₁₈ (3.5 µm, 2.1 x 100 mm) della Waters mantenuta alla temperatura di 30°C. La fase mobile era costituita da due soluzioni: una fase A costituita da acqua/acido formico (100:0.2) e una fase B costituita da acetonitrile/acido formico (100:0.2). Il flusso era regolato a 0.25 ml/min. La durata della corsa cromatografia era di 17 minuti. Dopo 3 minuti di flusso isocratico con il 20% di B iniziava un gradiente lineare che raggiungeva il 45% di B a 18.5 minuti.

Gli estratti portati a secco venivano ripresi in 500 µl di fase ricostituente ottenuta miscelando le fasi A e B nel rapporto 80 a 20. Dieci µl del campione ripreso sono stati iniettati nell'apparato LC-MS/MS per essere analizzati.

Risultati

Eluizione in HPLC delle incubazioni con il sistema NADPH rigenerante

Inizialmente per analizzare gli estratti delle incubazioni è stato sviluppato un metodo HPLC in fase inversa in grado di separare i metaboliti polari e non polari.

Nella fig. 5.1, il profilo cromatografico ottenuto dall'analisi di un estratto di H di fegato incubato con 17β -bol e il sistema NADPH rigenerante mostra come il gradiente di eluizione separa efficacemente tre metaboliti polari (che eluiscono rispettivamente a 14.06 ± 2.14 , 16.48 ± 2.57 e 18.90 ± 2.63 min) e l'ADD (41.91 ± 0.98 min). Gli stessi risultati (tre metaboliti polari e ADD) sono stati rilevati dalle analisi delle incubazioni del 17β -bol con S9 e MIC epatici.

Quando l'ADD e il sistema NADPH rigenerante sono stati incubati con H, S9 e MIC epatici sono stati registrati un metabolita polare principale (che eluisce a 19.97 ± 1.8 min) e il 17β -bol (34.92 ± 1.61 min) insieme ad altri numerosi picchi minori (fig. 5.2).

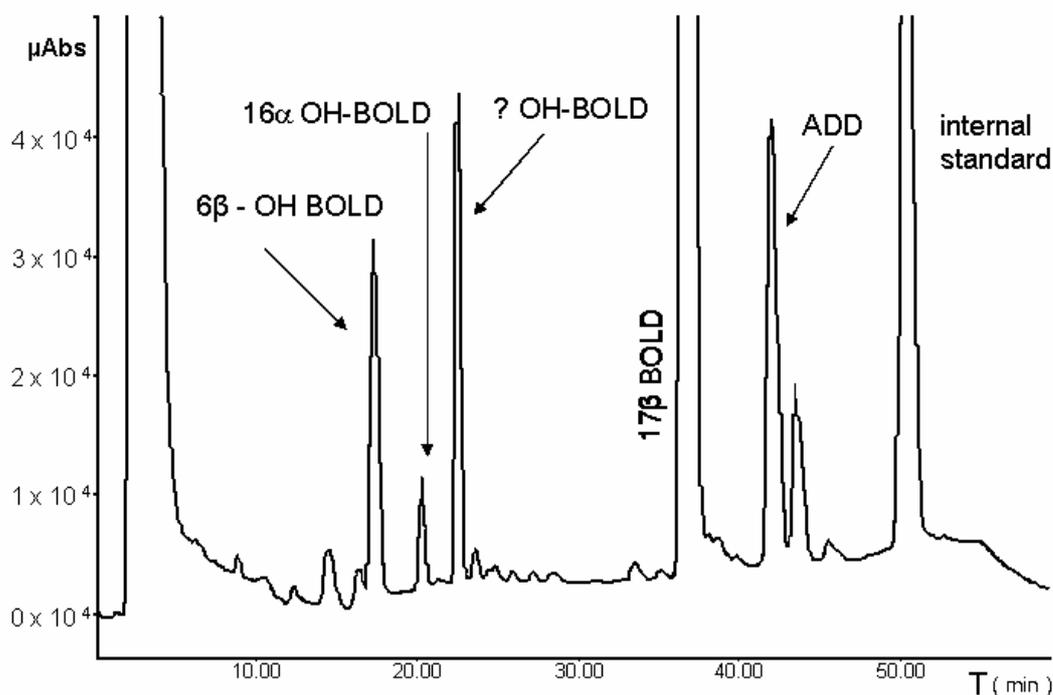


Figura 5.1. Cromatogramma di un'analisi in HPLC che mostra la separazione dei metaboliti del 17β -BOLD ($25\mu\text{M}$) in una incubazione con omogenato di fegato e sistema NADPH rigenerante a 37°C per 45 minuti. Le frecce indicano i metaboliti prodotti in quantità maggiore.

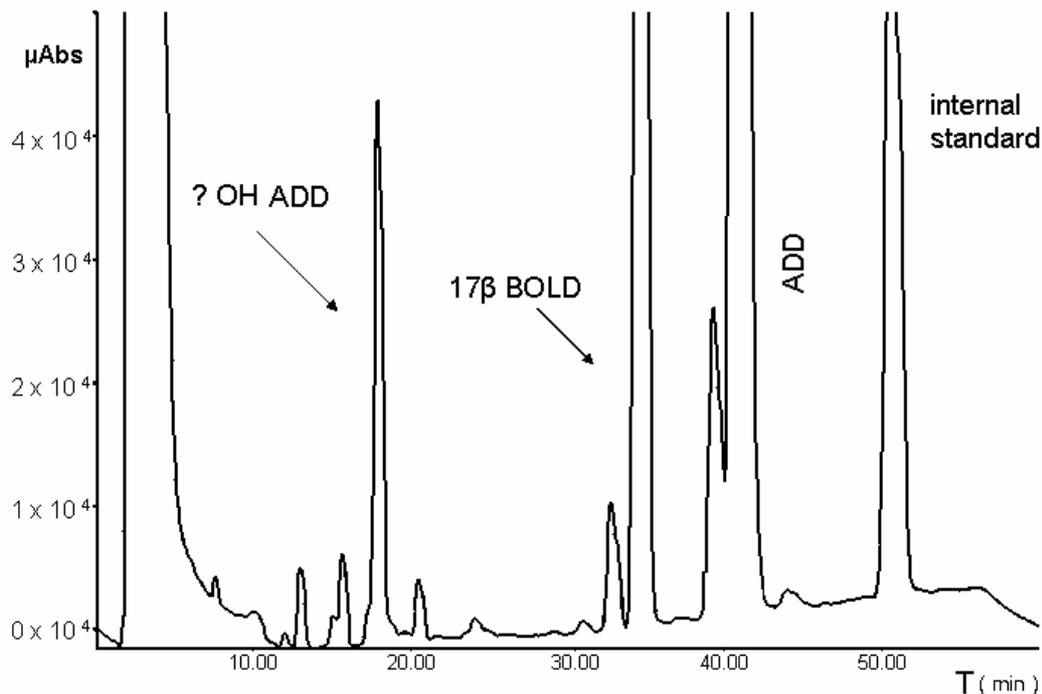


Figura 5.2. Cromatogramma di un'analisi in HPLC che mostra la separazione dei metaboliti del ADD (25 μ M) in una incubazione con omogenato di fegato e sistema NADPH rigenerante a 37°C per 45 minuti. Le frecce indicano i metaboliti prodotti in quantità maggiore.

Eluizione in HPLC delle incubazioni con NAD e NADH

Le analisi in HPLC degli estratti delle incubazioni con i C epatici utilizzando come cofattori NAD e NADH hanno evidenziato la trasformazione del 17 β -bol in ADD e dell'ADD in 17 β -bol, rispettivamente.

Identificazione in LC-MS/MS

L'identificazione dei composti prodotti nelle diverse prove di metabolismo *in vitro* è stata ottenuta mediante l'analisi degli estratti in LC-MS/MS. Inizialmente tramite delle acquisizioni in modalità Full Scan sono stati identificati i pesi molecolari (m/z) delle forme protonate $[M+H]^+$ dei principali metaboliti presenti negli estratti e successivamente sono state acquisite informazioni sulla loro struttura molecolare attraverso delle indagini MS/MS.

La conferma dell'identità dei composti principali è stata ottenuta per mezzo di un confronto con i corrispettivi standard analitici (se questi erano disponibili). La tabella 5.1 riporta i tempi

di ritenzione, i precursori e gli ioni prodotto degli standard analitici e le condizioni MS/MS utilizzate per la loro analisi.

La tabella 5.2 riporta i precursori e gli ioni prodotto più abbondanti dei metaboliti recuperati dalle prove di incubazione. Le Tabelle 3 e 4 riassumono la formazione dei metaboliti polari e non polari prodotti a partire da 17 β -bol o ADD e le diverse frazioni subcellulari e i diversi cofattori utilizzati nelle prove effettuate con il fegato e il rene.

Tabella 5.2. Ioni parentali e ioni prodotto più abbondanti monitorati in LC/MS-MS per l'identificazione dei metaboliti prodotti a partire da 17 β -bol ,ADD e 17 α -bol.

	tempo di ritenzione (minuti)	ione precursore (m/z)	ioni prodotto (tranzizioni I e II) (m/z)	\pm peso molecolare
Metaboliti del 17β-BOLD				
6 β ,17 β -OH-BOLD	4	303	121;133	+16
16 α ,17 β -OH-BOLD	6	303	121;133	+16
?OH-BOLD	7	303	121;133	+16
ADD	14	285	121;147	-2
Metaboliti del ADD				
6 β ,17 β -OH-BOLD	4	303	121;133	+16
?OH-ADD	6.7	301	-	+16
17 β -BOLD	13	287	121;135	+2
17 α -BOLD	15	287	121;135	+2
Metaboliti del 17α-BOLD				
6 β ,17 α -OH-BOLD	5.4	303	121;133	+16
16 α ,17 α -OH-BOLD	6	303	121;133	+16
17 β -BOLD	13	287	121;135	+2
ADD	14	285	121;147	-2

Le analisi in LC-MS/MS hanno confermato la presenza di ADD e di tre derivati polari e idrossilati (m/z 303) del 17β -bol negli estratti delle incubazioni del 17β -bol con H, S9 e MIC e il sistema NADPH rigenerante; in questi estratti non è stata rilevata la produzione di 17α -bol. Due dei tre metaboliti che eluiscono a 4.07 ± 0.07 e 6.23 ± 0.37 min, rispettivamente sono stati pienamente identificati come 6β -idrossi- 17β -bol e come 16α -idrossi- 17β -bol (Fig. 5.3). Il terzo metabolita polare non è stato ancora completamente identificato perché i rapporti tra gli ioni prodotto (rapporto isotopico) e il tempo di ritenzione non corrispondevano a nessuno degli standard disponibili. L'ipotesi più probabile in base alle frammentazioni ottenute in MS-MS è che questo metabolita sia un idrossilato in posizione 16 del 17α -bol.

Quando il 17β -bol è stato incubato con C epatico e il NAD utilizzato come cofattore, l'unico metabolita identificato è stato l'ADD e non sono stati prodotti né 17α -bol ma neppure altri metaboliti polari. La quantità di ADD prodotta in queste prove è stata molto maggiore rispetto alla quantità riscontrata nelle incubazioni con S9 e MIC.

Nei C e nei MIC ottenuti dai reni di bovino è stata rilevata la produzione di una piccola quantità di ADD; la presenza di 6β -idrossi- 17β -bol, in quantità trascurabili, è stata registrata solo nelle incubazioni con MIC; la produzione di 17α -bol, come nelle frazioni subcellulari epatiche, non è mai stata identificata (tabella 5.3).

Quando l'ADD è stato incubato con il sistema NADPH rigenerante e H, S9 e MIC epatici, (Tabella 5.4 e figura 5.4 a) le analisi in LC-MS/MS hanno identificato come metabolita maggiormente prodotto il 17β -bol (m/z 287; tempo di ritenzione 12.84 ± 0.04 min) e hanno rilevato un altro composto caratterizzato da m/z 301 che eluisce a 6.7 ± 0.05 min che è stato ipoteticamente identificato attraverso delle prove di frammentazione in MS/MS e delle acquisizioni in full scan come un derivato idrossilato dell'ADD (figura 5.4 b).

Il 6β -idrossi- 17β -bol (m/z 303, tempo di ritenzione 4.08 ± 0.07 min) è stato prodotto negli H, S9 e MIC epatici ma non nei C. Quando l'ADD e NADH sono stati incubati con C, è stata registrata la produzione di 17β -bol insieme ad un altro composto con m/z 287 che eluisce a 15.11 ± 0.03 min in seguito identificato come 17α -bol.

La riduzione dell'ADD a 17β -bol è stata riscontrata anche nei MIC, C e S9 renali ma in quantità molto ridotte rispetto al fegato. Nei MIC renali è stata identificata la presenza di 6β -idrossi- 17β -bol.

Quando il 17α -bol è stato incubato con il sistema NADPH rigenerante e MIC epatici oltre alla produzione di ADD è stata riscontrata la presenza di due metaboliti idrossilati del 17α -bol che successivamente sono stati identificati come 6β -idrossi- 17α -bol e 16α -idrossi- 17α -bol.

Tabella 5.3. Metaboliti prodotti dall'incubazione del 17 β -bol (nmoli/min/mg proteina).

Tessuto					
Frazione subcellulare	17α-BOLD	ADD	6β,17β-OH-BOLD	16α,17β-OH-BOLD	? ,17?-OH-BOLD
Cofattore					
F-H-NADPH	/	0.068 \pm 0.009	0.049 \pm 0.0060	0.020 \pm 0.002	0.026 \pm 0.003
F-S9-NADPH	/	0.0146 \pm 0.0002	0.034 \pm 0.0003	0.004 \pm 0.0001	0.038 \pm 0.002
F-MIC-NADPH	/	0.010 \pm 0.002	0.0109 \pm 0.004	0.0026 \pm 0.0003	0.0179 \pm 0.002
F-C-NAD	/	0.061 \pm 0.005	/	/	/
R-S9-NADPH	/	/	/	/	/
R-MIC-NADPH	/	0.001 \pm 0.000	0.0003 \pm 0.0001	/	/
R-C-NAD	/	0.0002 \pm 0.0008	/	/	/

Principali metaboliti prodotti dopo l'incubazione in vitro del 17 β -bol (25 μ M). Le prove di incubazione sono state eseguite in triplicato con omogenato (H), frazione post-mitocondriale (S9) e citosol epatici (F) e renali (R) con l'utilizzo come cofattori per l'incubazione di un sistema NADPH rigenerante, NAD o NADH. I risultati (media \pm deviazione standard) sono stati espressi come nmoli/min/mg proteina.

Tabella 5.4. Metaboliti prodotti dall'incubazione del ADD (nmoli/min/mg proteina).

Tessuto			
Frazione subcellulare	17β-BOLD	17α-BOLD	6β,17β-OH-BOLD
Cofattore			
F-H-NADPH	0.285 \pm 0.021	0.043 \pm 0.001	0.010 \pm 0.0002
F-S9-NADPH	0.097 \pm 0.014	0.011 \pm 0.002	0.013 \pm 0.002
F-MIC-NADPH	0.041 \pm 0.001	0.0003 \pm 0.0001	0.0010 \pm 0.0002
F-C-NADH	0.044 \pm 0.003	0.011 \pm 0.002	/
R-S9-NADPH	0.007 \pm 0.001	0.0003 \pm 0.0001	/
R-MIC-NADPH	0.012 \pm 0.0001	0.0002 \pm 0.0001	0.0012 \pm 0.0002
R-C-NADH	0.0014 \pm 0.0003	/	/

Principali metaboliti prodotti dopo l'incubazione in vitro del ADD (25 μ M). Le prove di incubazione sono state eseguite in triplicato con omogenato (H), frazione post-mitocondriale (S9) e citosol epatici (F) e renali (R) con l'utilizzo come cofattori per l'incubazione di un sistema NADPH rigenerante, NAD o NADH. I risultati (media \pm deviazione standard) sono stati espressi come nmoli/min/mg proteina.

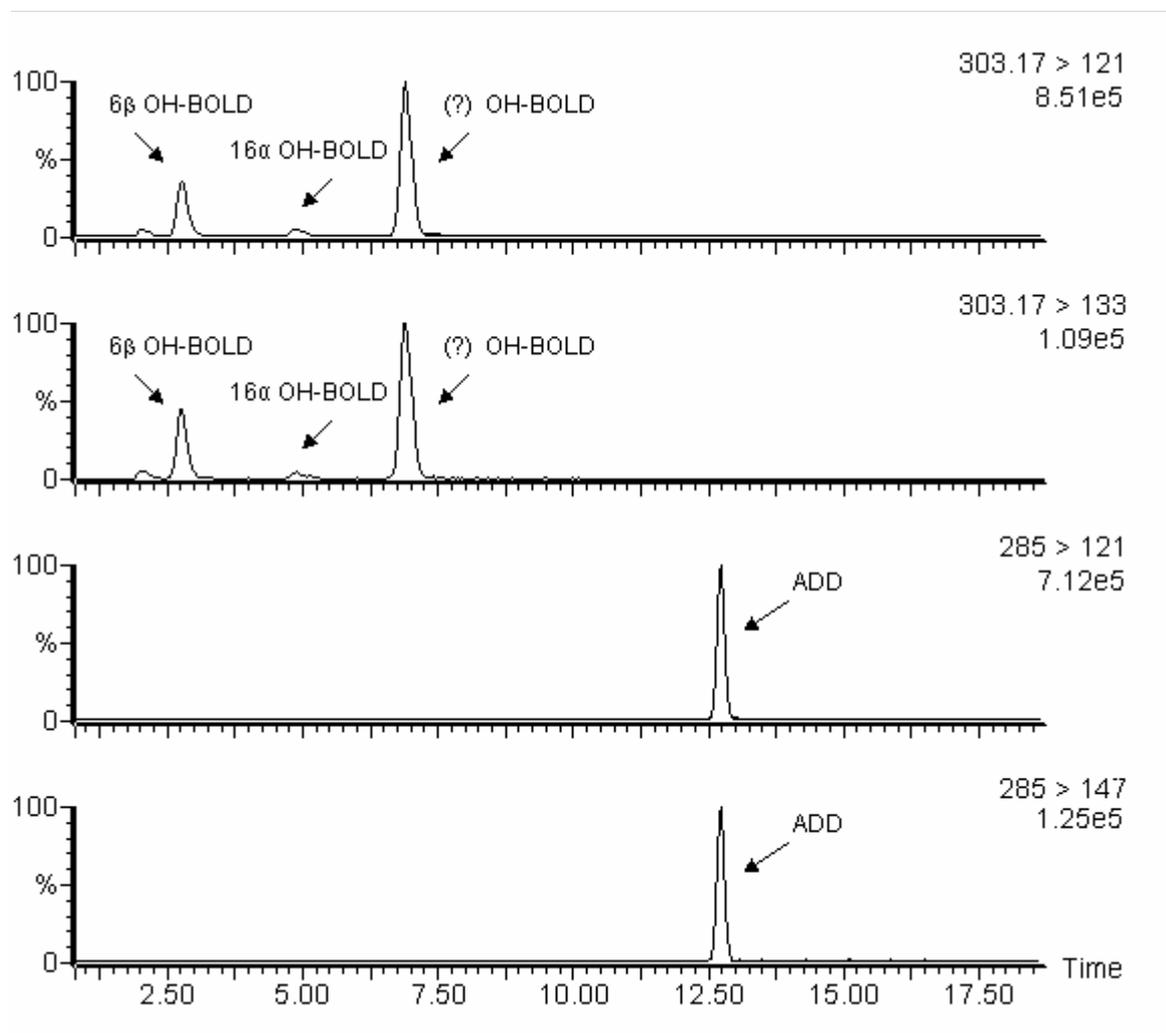


Figura 5.3. Cromatogramma di un'analisi in LC-MS/MS in modalità MRM dei metaboliti del 17β -bol ($25\mu\text{M}$) prodotti in una incubazione con S9 di fegato e sistema NADPH rigenerante. Il cromatogramma riporta le transizioni più intense monitorate per l'identificazione degli idrossilati del boldenone ($303\rightarrow 121$; $303\rightarrow 133$) e dell'ADD ($285\rightarrow 121$; $285\rightarrow 147$).

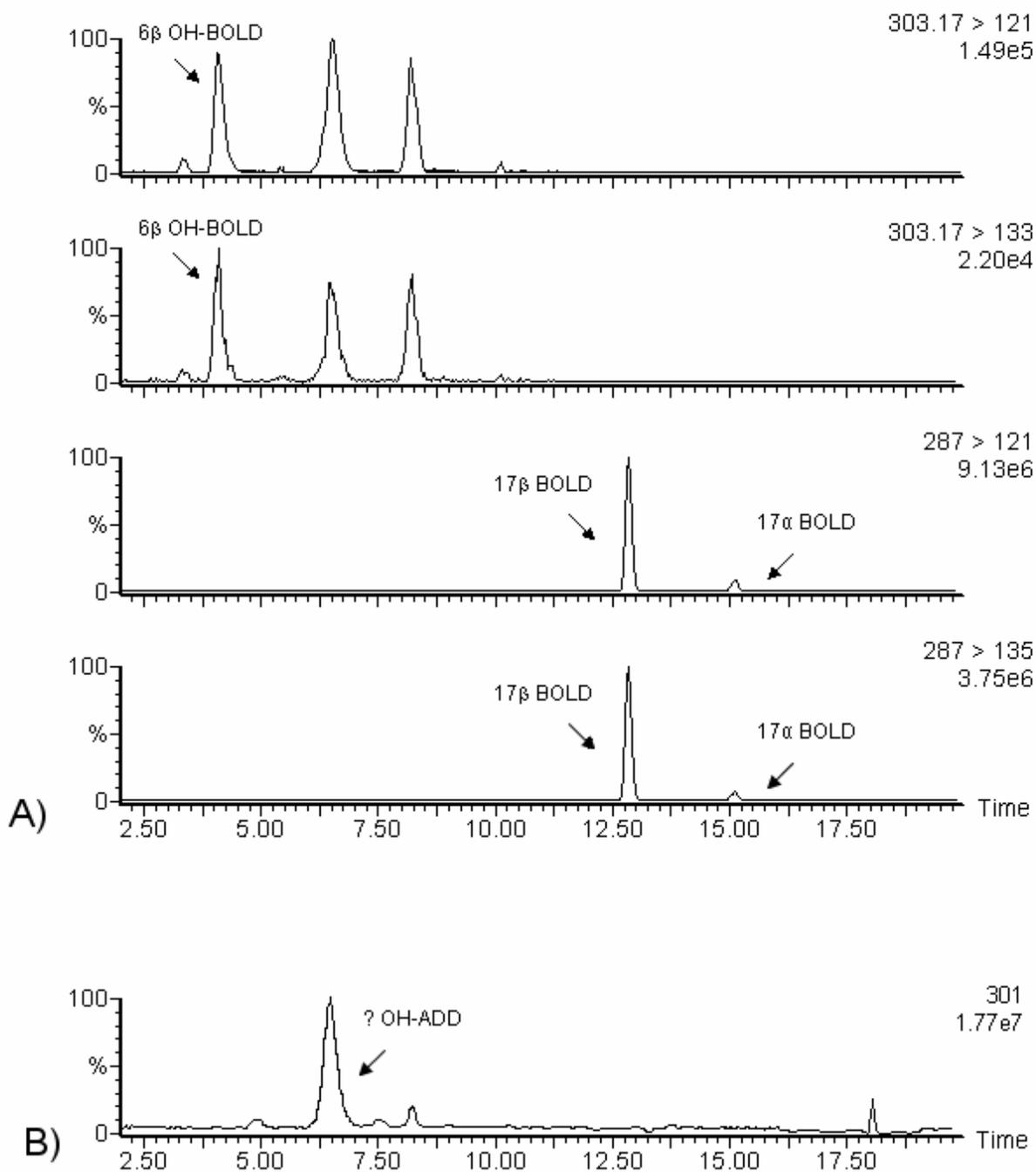


Figura 5.4. Cromatogramma di un'analisi in LC-MS/MS dei metaboliti dell'ADD (25 μ M) prodotti in una incubazione con S9 di fegato e sistema NADPH rigenerante.

(A) Il cromatogramma in modalità MRM riporta le transizioni più intense monitorate per l'identificazione degli idrossilati del boldenone (303 \rightarrow 121; 303 \rightarrow 133) e di 17 β -bol e 17 α -bol (287 \rightarrow 121; 285 \rightarrow 135).

(B) Cromatogramma in modalità Full Scan che riporta lo ione [M+H]⁺ corrispondente a m/z 301 ricercato per identificare il metabolita che si ipotizza essere un idrossilato dell'ADD.

Discussione

In tutte le prove *in vitro* condotte utilizzando un sistema NADPH rigenerante sono state evidenziate attività Citocromo P450-dipendenti mentre in presenza di NAD o NADH sono state confermate le attività delle ossidoriduttasi citosoliche. Nella figura 5.5 sono riportate le strutture del 17 β -bol e dell'ADD e l'insieme dei metaboliti ottenuti quando questi due composti sono stati incubati con i microsomi epatici e il NADPH. I tre metaboliti polari che si è supposto siano prodotti idrossilati del boldenone sono stati identificati negli estratti di quasi tutte le frazioni subcellulari epatiche incubate con il NADPH. Due di questi metaboliti sono stati identificati come 6 β -idrossi-17 β -bol e come 16 α -idrossi-17 β -bol ed è possibile ipotizzare in questa reazione siano coinvolti gli enzimi Citocromo P450-dipendenti (principalmente il CYP3A) presenti nei microsomi bovini dato che, come è noto, catalizzano la biotrasformazione del 17 β -Testosterone in 6 β -idrossi-17 β -Testosterone (Sivapathasundaram et al.,2001).

Il 6 β -idrossi-17 β -bol è stato identificato anche come prodotto del metabolismo dell'ADD in H, S9 e MIC epatici e nei MIC di rene. Sebbene non è noto se gli enzimi Citocromo P450-dipendenti agiscano immediatamente sull'ADD che poi viene ridotto a 17 β -bol, o direttamente sull'17 β -bol formato dalla riduzione dell'ADD il fatto di aver riscontrato un metabolita idrossilato dell'ADD (che si suppone dovrebbe essere il 6 β -idrossi-ADD - figura 5) rafforza l'ultima ipotesi.

L'analisi dei metaboliti del 17 β -bol e dell'ADD prodotti *in vitro* ha confermato che la conversione del 17 β -bol in ADD e viceversa avviene principalmente nel fegato. Questi risultati confermano inoltre il ruolo dell'ADD sia come precursore che come metabolita del 17 β -bol. Gli enzimi responsabili potrebbero essere gli stessi coinvolti nell'interconversione dei 17-chetosteroidi con i corrispondenti 17 β -idrossisteroidi come androstenedione (AED), estrone o appunto ADD in 17 β -testosterone, 17 β -estradiolo e 17 β -bol (Labrie et al., 1997). Questi enzimi catalizzano con maggiore efficacia l'ossidazione del 17 β -bol in ADD in presenza di NAD come cofattore e la riduzione dell'ADD in 17 β -bol con NADPH come cofattore.

Alle condizioni sperimentali adottate la produzione di 17 α -bol rilevata *in vitro* è molto limitata. La ridotta produzione di 17 α -bol può essere spiegata come una conseguenza del fatto che le metodiche *in vitro* utilizzate in questo lavoro costituiscono un "sistema chiuso" che non riproduce tutte le reazioni di biotrasformazione (in questo caso la reazione di coniugazione)

che si verificano *in vivo*. E' possibile ipotizzare infatti che in vivo il 17 α -bol sia il substrato preferito per le reazioni di coniugazione di fase II e che quindi sia rapidamente escreto nelle urine e che il tasso di escrezioni condizioni fortemente la metabolizzazione del 17 β -bol verso la forma alfa

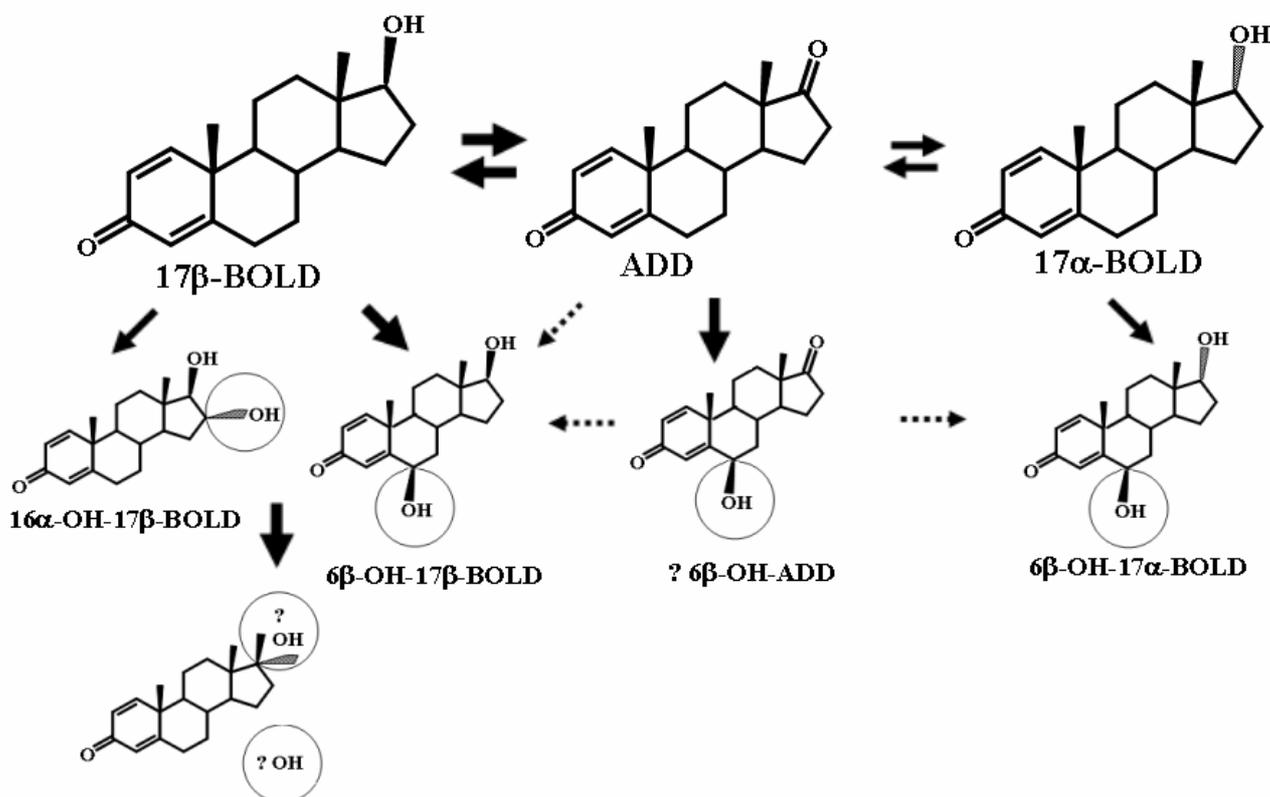


Figura 5.5 Schema delle vie di biotrasformazione ipotizzate per 17 β -bol, ADD e 17 α -bol per mezzo dei microsomi epatici e il sistema NADPH rigenerante.

Alla luce di queste considerazioni i metaboliti idrossilati del 17 α -bol identificati, si candidano come potenziali marker urinari della somministrazione esogena di 17 β -bol come indicato anche da Blokland *et al.* (2007).

I risultati ottenuti in questo studio contribuiscono a delucidare le principali biotrasformazioni del 17 β -bol e dell'ADD e la localizzazione subcellulare degli enzimi coinvolti in queste reazioni.

Fino ad ora pochi studi *in vitro* sul metabolismo del boldenone sono stati condotti usando le frazioni epatiche di bovino. Van Puymbroeck *et al.* (1998 b) avevano indicato come principale reazione nei microsomi di bovino l'ossidazione del 17 β -bol in ADD e rilevato la presenza di alcuni metaboliti idrossilati in posizione 6 con un 4% del 17 β -bol complessivamente trasformato; nel nostro studio la biotrasformazione del 17 β -bol raggiunge invece circa il 10% del 17 β -bol incubato. Nello stesso studio, le incubazioni con epatociti primari avevano prodotto notevoli quantità di metaboliti 6-idrossilati del 17 β -bol e dell'ADD; lo screening per la presenza di metaboliti del boldenone in campioni di urine, raccolte dopo la somministrazione *in vivo* di 17 β -bol undecanoato aveva confermato la presenza di 17 α -bol, di ridotte quantità di 6 β -idrossi-17 β -bol e di un prodotto ridotto non identificato. Cantiello *et al.* (2006), indagando sull'interconversione *in vitro* tra 17 β -bol e ADD nel bovino per mezzo di frazioni subcellulari epatiche hanno confermato il ruolo dell'ADD sia come precursore che come metabolita del 17 β -bol e hanno indicato la presenza di tre metaboliti idrossilati del 17 β -bol.

Conclusioni

Lo scopo del presente studio era di fornire un ulteriore contributo alle conoscenze sulla biotrasformazione sia del 17 β -bol che dell'ADD nel bovino utilizzando dei sistemi *in vitro*. I risultati ottenuti indicano che per identificare la somministrazione esogena di 17 β -bol e ADD nel bovino, accanto alla ricerca del 17 β -bol e del 17 α -bol, uno dei metodi possibili potrebbe essere di monitorare l'escrezione di alcuni metaboliti idrossilati quali il 6 β -idrossi-17 β -bol, 6 β -idrossi-17 α -bol e il 16 α -idrossi-17 β -bol come confermato anche da Blokland *et al.* (2007) che hanno recentemente adottato i due idrossilati in posizione 6 β come metaboliti di "screening" nei controlli di routine effettuati nell'urina bovina con un metodo LC-MS/MS.

Pubblicazioni su rivista:

- 1) Merlanti R, **Gallina G**, Capolongo F, Contiero L, Biancotto G, Dacasto M, Montesissa C. "An in vitro study on metabolism of 17beta-boldenone and boldione using cattle liver and kidney subcellular fractions". *Anal Chim Acta*. 2007 Mar 14; 586(1-2):177-83.

Comunicazioni a congresso:

- 4) Merlanti R., **Gallina G.**, Capolongo F., Contiero L., Biancotto G. Dacasto M, Montesissa C. (2006): "In vitro metabolism of 17β-boldenone and boldione". *Abstract from the 5th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis*, May 16-19 2006, Antwerp, Belgium; pag. 247.
- 5) Merlanti R., **Gallina G.**, Capolongo F., Dacasto M., Montesissa C. (2005): Metabolismo microsomiale epatico del boldenone nel vitello a carne bianca: risultati preliminari in cromatografia liquida (HPLC). *Atti del LIX Convegno Nazionale della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*, Viareggio, 21-24 settembre 2005

CAPITOLO 6

Identificazione di metaboliti idrossilati del boldenone in urine di vitelli trattati con boldenone e boldione: risultati preliminari

Gli studi *in vitro* sul metabolismo del boldenone e dell'ADD nel bovino condotti mediante frazioni subcellulari epatiche, i cui risultati sono stati presentati nel capitolo 6, hanno evidenziato la produzione nel bovino di metaboliti idrossilati del boldenone quali: il $6\beta,17\beta\text{OH}$ -boldenone, il $6\beta,17\alpha\text{OH}$ -boldenone ed il $16\alpha,17\alpha\text{OH}$ -boldenone che si candidano come potenziali marker urinari della somministrazione esogena di 17β -boldenone. I sistemi *in vitro* sono dei metodi alternativi utili per studiare il metabolismo degli xenobiotici nel bovino, ma per confermare i risultati ottenuti *in vitro* è necessario verificare che, a seguito di trattamento con 17β -boldenone *in vivo*, nell'urina siano effettivamente presenti i metaboliti idrossilati identificati. A questo scopo, al momento della stesura di questa tesi, sono in corso le analisi mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) per evidenziare la presenza dei metaboliti idrossilati identificati nelle prove *in vitro* le urine prelevate durante la prova sperimentale descritta nel capitolo 5, e cioè da due gruppi di vitelli alimentati uno con dieta latte e uno con dieta vegetale e trattati con una miscela di 17β -boldenone ed ADD in rapporto 9:1 (0.9 mg di Bold + 0.1mg di ADD), *per os* e per 38 giorni consecutivi.

In questo capitolo sono riportati i risultati preliminari riguardanti l'analisi dei campioni di urina raccolti nel corso di tutto il periodo di trattamento sperimentale di un vitello appartenente al gruppo di controllo e di un animale e di un vitello appartenente al gruppo degli animali trattati.

Materiali e metodi

I campioni di urina analizzati provengono dalla prova sperimentale descritta nel capitolo 5. L'animale controllo appartiene al gruppo FV: è stato alimentato con dieta sperimentale con un elevato contenuto in fitosteroli (vedi tabella 4.2) e non ha subito alcun trattamento. L'animale

trattato appartiene al gruppo TV: è stato alimentato con dieta sperimentale con un elevato contenuto in fitosteroli ed è stato trattato per 38 giorni consecutivi con un'associazione di 17 β -bol e ADD 1mg/capo per via orale (0,9 mg/capo 17 β -bol + 0,1 mg/capo ADD).

La preparazione dei campione di urina ha previsto un'estrazione liquido-liquido in ambiente basico utilizzando come solvente estraente il diclorometano. L'estrazione è stata eseguita in doppio su ciascun campione analizzato con o senza deconiugazione enzimatica.

Le analisi in LC/MS-MS sono state effettuate con il metodo utilizzato nel capitolo 4 per la ricerca nell'urina di 17 β -boldenone, 17 α -boldenone e ADD utilizzando come spettrometro di massa un triplo quadruplo (API 3000) con sorgente Turboionspray, operante in modalità ionizzazione positiva. In aggiunta sono stati caratterizzati i frammenti di 5 metaboliti idrossilati (6 β ,17 β OH-boldenone, 6 β ,17 α OH-boldenone, 16 α ,17 β OH-boldenone, 16 β ,17 β OH-boldenone e 16 α ,17 α OH-boldenone). Sono stati ottimizzati i parametri per ciascuna transizione monitorata (tabella 6.1); gli ioni prodotto caratteristici sono gli stessi per tutti e 5 i composti, tuttavia variano i rapporti ionici.

Tabella 6.1 Condizioni MS/MS per l'acquisizione in modalità MRM dei metaboliti idrossilati e di 17 β , 17 α -bol e ADD.

Analita	Precursore <i>m/z</i>	Prodotti <i>m/z</i>	CE (eV)	DP (V)	<i>t_R</i> (min)	LOQ (ng/mL)
6 β ,17 β OH-bol	303 (<i>M</i> + H) ⁺	121, 171, 147	6.0	30	6.0	0.6
16 α ,17 β OH- bol	303 (<i>M</i> + H) ⁺	121, 147, 171	7.0	30	6.5	0.3
6 β ,17 α OH- bol	303 (<i>M</i> + H) ⁺	121, 171, 147	7.8	30	7.0	0.6
16 β ,17 β OH- bol	303 (<i>M</i> + H) ⁺	121, 147, 171	9.1	30	7.8	0.6
16 α ,17 α OH- bol	303 (<i>M</i> + H) ⁺	121, 147, 171	9.1	30	9.1	0.6
17 β - bol	287 (<i>M</i> + H) ⁺	121, 135, 173	21	23	11.7	0.4
17 α - bol	287 (<i>M</i> + H) ⁺	121, 135, 173	21	23	13.3	0.4
ADD	285 (<i>M</i> + H) ⁺	121, 147, 151	21	26	13.1	0.5
17 β T- <i>d</i> ₂ ^a	291 (<i>M</i> + H) ⁺	99.1	27	35	13.4	-

^a 17 β T-*d*₂ standard interno

La separazione cromatografica degli analiti, compresi il 17 β -boldenone, 17 α -boldenone e l'ADD è stata ottenuta in condizioni di gradiente usando come fase organica CH₃CN e fase acquosa CH₃COOH 1% ed una colonna Betasyl C18, 250×2.1mm, 5 μ m.

Risultati e discussione

L'identificazione delle molecole nelle analisi LC-MS/MS è stata effettuata grazie alla buona risoluzione cromatografica ottenuta in LC e monitorando in modalità MRM tre transizioni per ogni analita (tabella 6.1). Le prove effettuate aggiungendo gli standard degli idrossilati del boldenone e 17β -Bol, 17α -Bol e ADD a campioni "bianchi" di urina dimostra che metodo utilizzato permette di identificare e quantificare le molecole ricercate nell'urina a concentrazioni inferiori a 1 ng/ml.

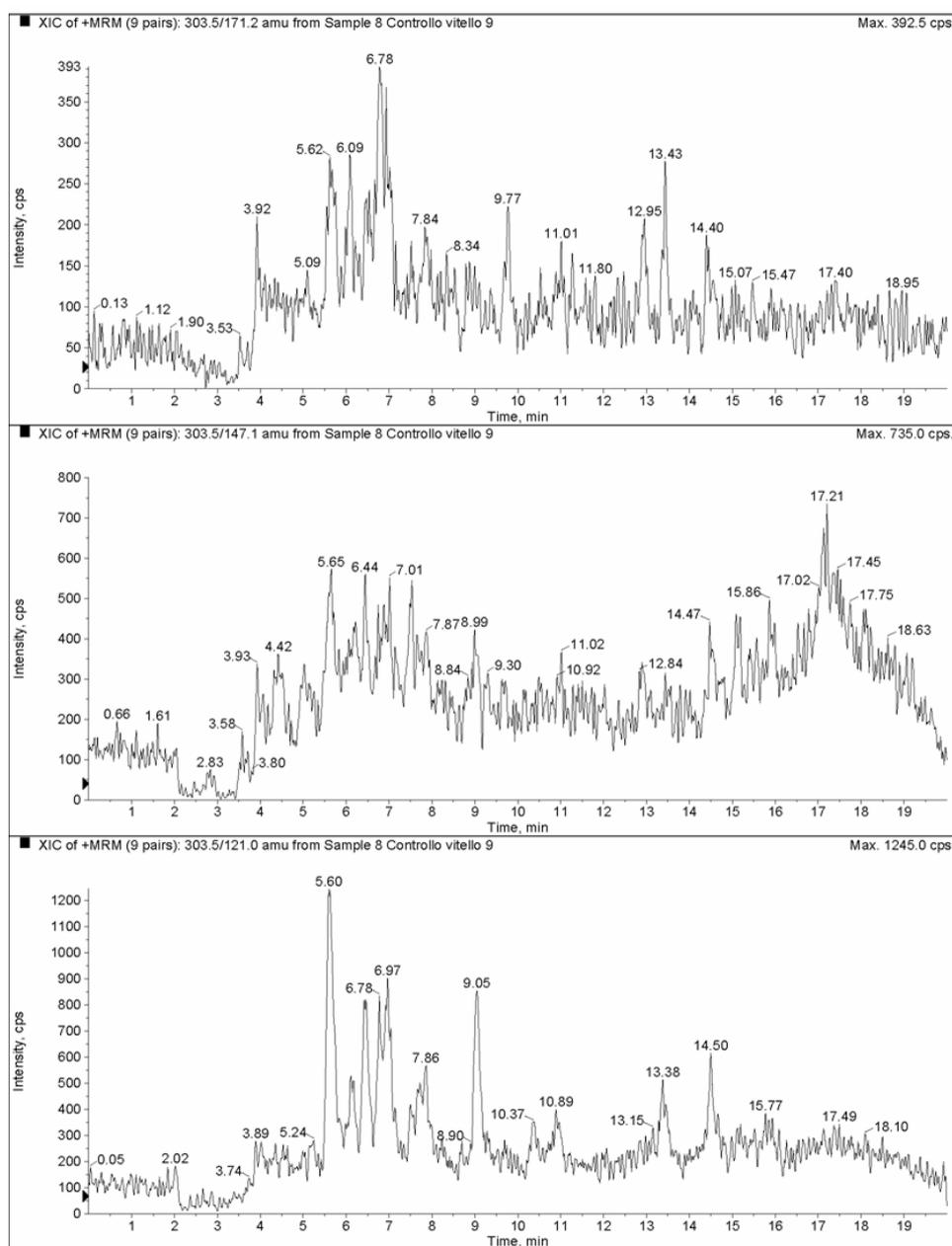


Figura 6.1 Analisi LC-MS/MS: extracted ion currents (XIC) in modalità MRM delle transizioni monitorate per l'identificazione degli idrossilati di $17\alpha/\beta$ -Bol (303→121; 303→171; →147) che ne dimostrano l'assenza nell'urina di un vitello controllo

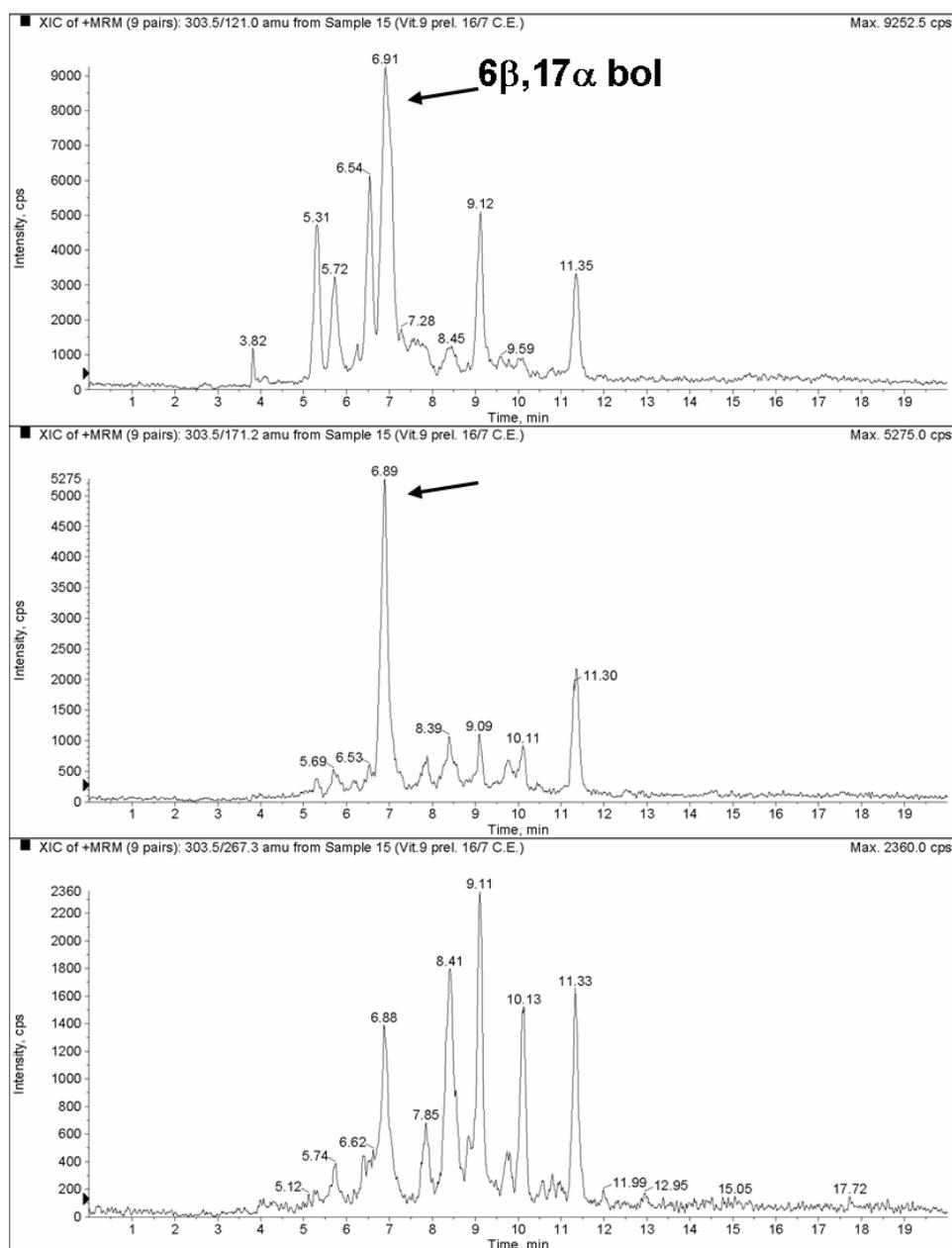


Figura 6.2 Analisi LC-MS/MS di urina di un vitello trattato: extracted ion currents (XIC) in modalità MRM delle transizioni monitorate per l'identificazione degli idrossilati di 17 α / β -Bol (303 \rightarrow 121; 303 \rightarrow 171; \rightarrow 147); il 6 β ,17 α OH-boldenone è stato rilevato ad una concentrazione pari a 6.7 ng/ml.

Nei campioni di urina provenienti dall'animale controllo non è stata rilevata la presenza di nessuno degli idrossilati ricercati. È stata riscontrata la presenza del solo 6 β ,17 α OH-boldenone esclusivamente nelle urine dei vitello trattato ed in concentrazione che varia tra 0.5-6.7 ng/ml (figura 6.3). Tale metabolita non è stato rilevato nel vitello prima dell'inizio del

trattamento. Nelle urine dell'unico vitello analizzato il profilo di eliminazione del 6 β ,17 α OH-boldenone è molto simile a quello del 17 α -boldenone, con una concentrazione massima al terzo giorno di trattamento per poi decrescere nei giorni successivi (figura 6.3).

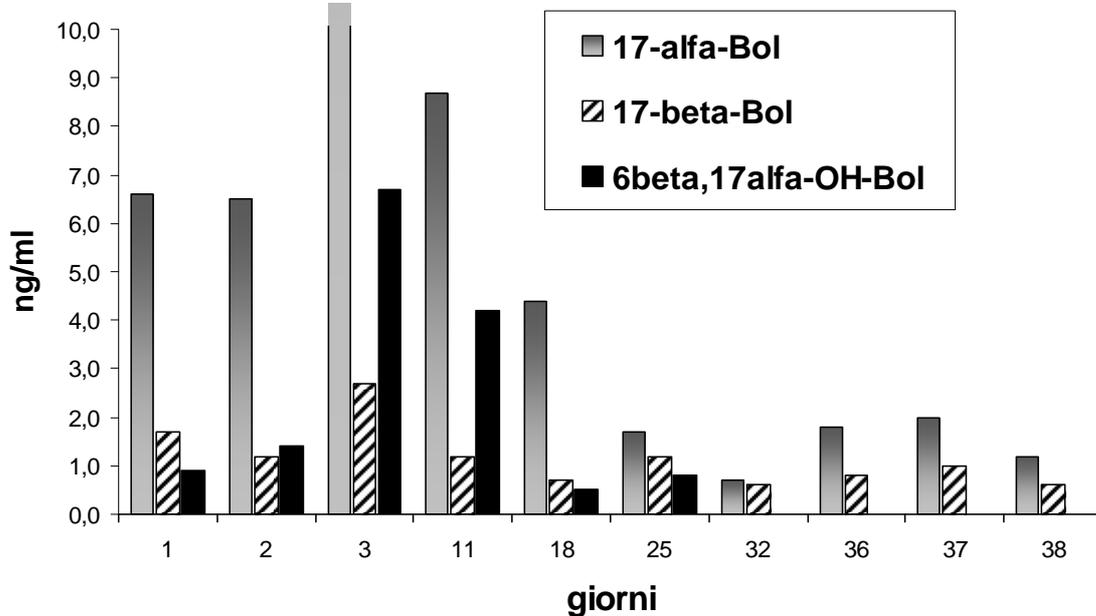


Figura 6.3 Eliminazione urinaria (ng/ml) di 17 α / β -bol e 6 β ,17 α OH-bol nei prelievi effettuati durante il periodo di trattamento.

Alla luce dei risultati ottenuti il 6 β ,17 α OH-bol è un potenziale marker di trattamento sia con 17 β -boldenone come indicato da Blokland *et al.* (2007), tuttavia la sua eliminazione discontinua rende necessaria procedere anche alla ricerca di 17 β -boldenone, 17 α -boldenone e ADD. Al momento sono in corso delle prove sia per migliorare la procedura di estrazione delle urine che degli studi per identificare la eventuale presenza di metaboliti diidrossilati del boldenone. L'ipotesi è che il 6 β ,17 β OH-bol che in vitro è uno dei principali metaboliti prodotti possa subire una seconda idrossilazione come segnalato nel caso del metabolismo del turibanolo nel cavallo (Ho *et al.*, 2007).

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
- Aguilera R., Hatton C.K., Catlin D.H. (2002) "Detection of epitestosterone doping by isotope ratio mass spectrometry" *Clin. Chem.*, 48, 629-636
- Angeletti R., Contiero L., Gallina G, Montesissa C. "The urinary ratio of testosterone to epitestosterone: a good marker of illegal treatment also in cattle?". *Veterinary Research Communications 2006; 30 Suppl 1:127-31*
- Arts C.J.M., Van Baak M.J., Den Hartog J.M.P. (1991) "Control system of the illegal use of naturally occurring steroids in calves" *Journal of Chromatography*, 546, 429-444
- Arts C.J.M., Schilt R., Van Ginkel L.A. (1996) "Boldenone is a naturally occurring anabolic steroid in cattle" In *Proceedings of the EuroResidue III*, Haagsma, N., Ruiter, A.,Eds., Veldhoven, The Netherlands, 212-216
- Baisch H., Otto U., Fack H. "Growth of human prostate carcinomas with and without hormone alpha-dehydrotestosterone in nude mice" *Eur. Urol.*, 34, 505-512
- Barthakur S., Roy M.K., Bera S.K., Ghosh A.C. (1996) "Steroid transformation by mutants of *Mycobacterium* sp. With altered response to antibiotics" *J. Basic Microbiology*, 36, 383-387
- Batjoens P., De Brabander H.F., Smets F., Pottie G. (1994) *Analyst*, 119, 2607
- Blokland M.H.; Van Rossum H.J.; Sterk S.S.; Van Ginkel L.A.; Stephany R.W. (2007) Development of a method which discriminates between endogenous and exogenous β -boldenone *Anal. Chim. Acta*, 586, 147-153
- Botsoglou A.N., Fletouris D.J. (2001) "Drug residues in foods: pharmacology, food safety and analysis" Ed. Marcel Dekker Inc.

- Cantiello M, Nachtmann C., Mastrone A., Carletti M., Virkel G., Nebbia C. (2006) "Biotransformation pattern of 17 β -boldenone and of its precursor/metabolite androsta-1,4-diene-3,17-dione in bovine hepatic subfractions" *J. vet. Pharmacol. Therap.*, 29 (suppl. 1), 168
- Calvarese S., Rubini P., Urbani G., Ferri N. (1994) "Experimental administration of 19-nortestosterone and dexamethasone in cattle: elimination of the two drugs in different biological matrices." *Analyst*, 119, 2611-2615.
- Catlin D.H., Hatton C.K., Starcevic S.H. (1997). "Issue in detection abuse of xenobiotic anabolic steroids and testosterone by analysis of athletes' urine". *Clin. Chem.*, 43, 1280-1288
- Clouet A.S., Le Bizec B., Boerlen F., Monteau F., André F. (1998) "Calf primary hepatocyte culture as a tool for anabolic steroid metabolism studies" *Analyst*, 123, 2489-2492
- Coldham N.G., Biancotto G., Montesissa C., Howells L.C., Sauer M.J. "Utility of isolated hepatocytes and radio-HPLC-MSn for the analysis of the metabolic fate of 19-nortestosterone laurate in cattle" *Analyst*, 123, 2589-2594
- Conneely G., Aherne M., Lu H. e Guilbault G.G. (2007). "Development of an immunosensor for the detection of Testosterone in bovine urine" *Anal. Chim. Acta*, 583, 153-160
- Contiero, B. Neri, L. Giannetti, R. Bagnati, G. Pozza, R. Angeletti, Proceedings of the Fifth International Symposium On Hormones and Veterinary Drug Residue Analysis, Antwerp, Belgium, May 16-19 2006, 71..
- 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" *Anal. Chim. Acta*, 473, 71-82.
- Danhaive P.A., Rousseau G.G. (1986) "Binding of glucocorticoid antagonists to androgen and glucocorticoid hormone receptors in rat skeletal muscle" *Journal of steroid biochemistry*, 24, 482-487.
- De Brabander H.F., van Hande J. (1994) "Endogenic nortestosterone in cattle?" *Analyst*, 119, 2581-2582.
- De Brabander H.F., Poelmans S., Schilt R., Stephany R.W., Le Bizec B., Draisci R., Sterk S.S., Van Ginkel L.A., Courtheyn D., Van Hoof N., Macri A., De Wasch K. (2004) "Presence and metabolism of the anabolic steroid boldenone in various animal species: a review" *Food Addit Contam*, 21, 515-525.

- Daeseleire, E., De Guesquiere, A., Van Peteghem, C. (1993) Metabolism of 17 β ,19-nortestosterone in urine of calves after oral intake and intramuscular administration. *Anal. Chim. Acta* 275, 95-103.
- Dehenin L., Matsumoto A.M. (1993) "Long-term administration of testosterone enanthate to normal men: alternation of the urinary profile of androgen metabolites potentially useful for detection of testosterone misuse in sports" *Journal of Steroid biochemistry and molecular biology*, 44, 179-189.
- Donike M., Barwald K.R., Klostermann K., Schanzer W., Zimmermann J. (1983). "Detencion of exogenous testosterone" In: Heck H, Hollmann W, Liesen H, et al., eds. Sport: Leistung und Gesundheit, Kongressbd. Dtsch Sportarzte-kongress. Koln: Deutscher Arzte-Verlag, 293-8.
- Draisci R., Palleschi L., Ferretti E., Lucentini L., Cammarata P. (2000) "Quantitation of anabolic Hormones and their metabolites in bovine serum and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry" *Journal of chromatography A*, 870, 511-522.
- Draisci R., Palleschi L., Ferretti E., Lucentini L., delli Quadri F. (2003) "Confirmatory analysis of 17 β -boldenone, 17 α -boldenone and androsta-1,4-diene-3,17-dione in bovine urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry" *Journal of chromatography B*, 789, 219-226.
- Draisci, R.; Merlanti, R.; Ferretti, G.; Fantozzi, L.; Ferranti, C.; Capolongo, F.; Segato, S.; Montesissa, C. (2007) "Excretion profile of boldenone in urine of veal calves fed two different milk replacers" *Anal. Chim. Acta* , 586, 171-176.
- El-Bahr S.M., Mostl E. And Palme R. (2003). "Glucocorticoid metabolites inhibit the metabolism of androstenedione in red blood cells of ruminants". *J. Vet. Med. A*, 50, 98-102.
- El Desoky E.S., H.O. Mohamed, W.M.A. Farghaly, S.A. Hamed, M.A. Hedaya, J.P. Siest (2005) *Pharmacol. Res.* 51 575
- Ferchaud V., Le Bizec B., Monteau F., André F. (1998) "Determination of the exogenous character of testosterone in bovine urine by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry" *Analyst*, 123, 2617-2620
- Ferchaud V., Le Bizec B., Monteau F., Andre F. (2000) "Characterization of exogenous testosterone in livestock by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry: influence of feeding and age" *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, 14, 652-656

- Gaignage P., Lognay G., Bosson D., Vertongen D., Dreze P., Marlier M., Severin M. (1991) "Dexamethasone bovine pharmacokinetics" *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 16, 219-221
- Galteau M.M., Shamsa F. (2003) "Urinary 6beta-hydroxycortisol: a validated test for evaluating drug induction or drug inhibition mediated through CYP3A in humans and in animals" *Eur J Clin Pharmacol.*, 59, 713-733
- Ged C., Rouillon J.M., Pichard L., Combalbert J., Bressot N., Bories P., Michel H., Beaune P., Maurel P. (1989) "The increase in urinary excretion of 6 β -hydroxycortisol as a marker of human hepatic cytochrome P450III α induction" *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 28, 373
- Groot M.J., Schilt R., Ossenkoppelf J.S., Berende P.L.M., Haasnoot W. (1998). "Combinations of growth promoters in veal calves: consequences for screening and confirmation methods" *Journal of Veterinary Medicine* 45, 425-440.
- Hagedorn H.W., Zankl H., Grund C., Schulz R. (1997) "Excretion of the anabolic steroid boldenone by racing pigeons" *Am. J. Vet. Res.*, 58, 224-227.
- Hebestreit M., Flenker U., Buisson C., Andre F., Le Bizec B., Fry H., Lang M., Weigert A.P., Heinrich K., Hird S., Schanzer W. (2006). "Application of stable carbon isotope analysis to the detection of testosterone administration to cattle". *J Agric Food Chem.*, 54,2850-2858.
- Henricks D.M., Brandt R.T., Titgemeyer E.C. and Milton C.T. (1997) "Serum concentration of trenbolone-17 β and estradiol-17 β and performance of heifers treated with trenbolone acetate, melengestrol acetate, or estradiol-17 β " *J. Anim. Sci.*, 75, 2627-2633.
- Ho E.N., Kwok W.H., Leung D.K., Wan T.S., Wong A.S. (2007) "Metabolic studies of turinabol in horses" *Anal. Chim. Acta*, 586, 208-216
- Hooijerink D., Schilt R., Hoogenboom R., Huveneers-Oorsprong M. (1998) "Identification of metabolites of the anabolic steroid methandienone formed by bovine hepatocytes in vitro" *Analyst*; 123, 2637-2641
- Illera J.C., Peña L., Martínez-Mateos M.M., Camacho L., Blass A., Garcia-Partida P., Illera M.J., Silván G. (2007) "The effect of long-term exposure to combinations of growth promoters in Long Evans rats: part 2. Adrenal morphology (histopathology and immunochemical studies)" *Anal. Chim. Acta*, 586, 252-258

- Impens S., Van Loco J., Degroodt J.M., De Brabander H. (2007) "A downscaled multi-residue strategy for detection of anabolic steroids in bovine urine using gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS3)" *Anal Chim Acta*, 586, 43-48
- Johnson B.J., Chung K.Y.(2007) "Alterations in the physiology of growth of cattle with growth-enhancing compounds" *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, 23, 321-332
- König T., Schuberth H.J., Leibold W., Zerbe H. (2006) "Dexamethasone depresses the expression of I-selectin but not the in vivo migration of bovine neutrophils into the uterus" *Theriogenology*, 65, 1227-1241
- Labrie F., Luu-The V., Lin S.X., Labrie C., Simard J., Breton R., Bélanger A. (1997) "The key role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology" *Steroids*, 62, 148-58
- Lake B.G. (1987) "Preparation and characterisation of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism" *Biochemical Toxicology: A practical approach*, Snel K. & Mullock B. IRL, Oxford University Press, Oxford, England.
- Le Bizec B., Montrade M.P., Monteau F., Andre F. (1993) "Detection and identification of anabolic steroids in bovine urine by gas chromatography-mass spectrometry" *Analitica Chimica Acta*, 275, 123-133.
- Le Bizec, B.; Courant, F.; Gaudin, I.; Bichon, E.; Destrez, B.; Schilt, R.; Draisci, R.; Monteau, F.; Andre, F. "Criteria to distinguish between natural situations and illegal use of boldenone, boldenone esters and boldione in cattle 1. Metabolite profiles of boldenone, boldenone esters and boldione in cattle urine" *Steroids*, 71, 1078-1087
- Lowry O.H., Rosebrough N.Y., Farr A.L., Randall R.Y. (1951) "Protein measurement with the Folin phenol reagent" *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Lu H., Kreuzer M. P., Takkinen K., Guilbault G.G. (2006). "A recombinant Fab fragment-based electrochemical immunosensor for the determination of testosterone in bovine urine" *Biosensor and Bioelectronics*. doi:10.1016/j.bios.2006.08.002.
- Lubet R.A., Mayer T.R., Cameron J.W., Burke M.D., Nims R.W., Wolff T., Guengerich F.P. (1985) "Dealkylation of pentoxresorufine: a rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome P450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rats" *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 283, 43-48.

- Luo G., Guenther T., Gan L.S., Humphreys W.G. (2004) "CYP3A4 induction by xenobiotics: biochemistry, experimental methods and impact on drug discovery and development" *Curr Drug Metab.*, 5, 483–505
- Meyer H.H. (2001) "Biochemistry and physiology of anabolic hormones used for improvement of meat production" *APMIS*, 109, 1-8.
- Merlanti R., Ferranti C., Ferretti G., De Liquoro M., Civitareale C., Gallina G., Draisci R. & Montesissa C. (2006). "Oral administration of boldenone and boldione to veal calves: disposition and elimination rate of boldenone metabolites". *J. vet. Pharmacol. Therap.*, 29 (suppl. 1), 167.
- Merlanti, R.; Gallina, G.; Capolongo, F.; Contiero, L.; Biancotto, G.; Dacasto M.; Montesissa, C. (2007) An in vitro study on metabolism of 17 β -boldenone and boldione using cattle liver and kidney subcellular fractions. *Anal. Chim. Acta* , 586, 177-183.
- Nebbia C., Dacasto M., Rossetto Giaccherino A., Giuliano Albo A. et 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. (2006) "Measuring biological effects in the target species using proteomics: detection of the illegal treatment of cattle with performance enhancing agents" *J. vet. Pharmacol. Therap.*, 29 (suppl. 1), 37-39
- Nebert D.W., Nelson D.R., Coon M.J., Estabrook R.W., Feyereisen R., Fujii-Kuriyama Y., Gonzalez F.J., Guengerich F.P., Gunsalus I.C., Johnson EF., Loper J.C., Sato R., Waterman M.R., Waxman D. (1991) "The P450 superfamily: Update on new sequences, genes mapping, and recommended nomenclature" *DNA and Cell Biology*, 10, 1-14
- Nielen M.W.F., Rutgers P., van Bennekom E.O., Lasaroms J.J.P., van Rhijn J.A.H. (2004) "Confirmatory analysis of 17 β -boldenone, 17 α -boldenone and androsta-1,4-diene-3,17-dione in bovine urine, faeces, feed and skin swab samples by liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry" *Journal of chromatography B*, 801, 273-283
- Nielen, M.W.F.; Lasaroms, J.P.; Essers, M.L.; Sanders, M.B.; Heskamp, H.H.; Bovee, T.F.H.; Van Rhijn, J.; Groot, M.J. (2007) The ultimate veal calf reference experiment: hormone residue analysis data obtained by gas and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 586, 30-34

- Ohno M., Yamaguchi I., Ito T., Saiki K., Yamamoto I., Azuma J. (2000) "Circadian variation of the urinary 6beta-hydroxycortisol to cortisol ratio that would reflect hepatic CYP3A activity" *Eur J Clin Pharmacol.*, 55, 861-865
- Okey A.B., Roberts E.A., Harper P.A. et Denison M.S. (1986) "Induction of drug-metabolizing enzymes: mechanisms and consequences" *Clin Biochem.*, 19, 132-41
- Paine A. J. (1991) "The cytochrome P450 gene superfamily (current status review)" *International Journal of Experimental Pathology*, 72, 349-363
- Pascussi J.M., Gerbal-Chaloin S., Drocourt L., Maurel P., Vilarem M.J. (2003) " The expression og CYP2B6, CYP2C9 dand CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors" *Biochimica and Biophysica Acta*, 1619, 243-253
- Pierrat B., Heery D.M., Lemoine Y., Losson R. (1992) "Functional analysis of the human estrogen receptor using a phenotypic transactivation assay in yeast" *Gene*, 119,(2), 237-45
- Poelmans, S.; De Wasch, K.; Martelé, Y.; Schilt, R.; Van Hoof, N.; Noppe, H.; Verslycke, T.; Janssen, C.R.; Courtheyn D.; De Brabander, H.F. (2003 a) The possible transformation of phytosterols to boldenone. In *Proceedings of the Euro Food Chem XII* Brugge, Belgium, 74-78
- Poelmans S., Schilt R., Stephany R.W., Le Bizec B., Draisci R., Sterk S., Van Ginkel L. A., Courtheyn D., Van Hoof N., Lucentini L., De Wasch K., De Brabander H. F. (2003 b) Outcome of the experts meeting on the control of Boldenone in veal calves. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate General, Brussels, 2003, 1-3
- Poelmans S., De Wasch K., Noppe H., Van Hoof N., Van Cruchten S., Le Bizec B., Deceuninck Y., Sterk S., Van Rossum H.J., Hoffman M.K., De Brabander H.F. (2005 a) "Endogenous occurrence of some anabolic steroids in swine matrices" *Food Addit Contam.*, 22, 808-815
- Poelmans S., De Wasch K., Noppe H., Van Hoof N., Van de Wiele M., Courtheyn D., Gillis W., Vanthemsche P., Janssen C.R., De Brabander H.F. (2005 b). "Androstadienetrione, a boldenone-like component, detected in cattle faeces with GC-MS(n) and LC-MS(n)". *Food Addit Contam.* 22(9):798-807
- Poli G. (2005) "Diagnostica sierologia le reazioni antigene-anticorpo *in vitro*" in *Microbiologia e immunologia veterinaria - 2° Ed.* UTET Medica, Torino, 662-664

- Pompa G., Arioli F., Fracchiolla M.L., Rossi C.A., Bassini A.L., Stella S., Biondi P.A. (2006). "Neoformation of boldenone and related steroids in faeces of veal calves". *Food Addit Contam.* 23(2):126-32.
- Porter T.D., Coon M.J. (1991) "Cytochrome P450: multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms" *Journal of Biological Chemistry*, 266, 13469–13472.
- Preston R.L. (1999). "Hormone containing growth promoting implants in farmed livestock". *Advanced Drug Delivery Reviews* 38, 123-138
- Prévost S., Nicol T., Monteau F., André F., Le Bizec B. (2001) "Gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry to control the misuse of androgens in breeding animals: new derivatisation method applied to testosterone metabolites and precursors in urine samples" *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, 15, 2509-2514
- Purdon M.P. and Lehman-McKeeman L.D. (1997) "Improved high-performance liquid chromatographic procedure for separation and quantification of hydroxytestosterone metabolites" *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 37, 67-73.
- Reinerink E.J., Doorn L., Jansen E.H.J., Van Tersel A.A.J. (1991) "Measurement of enzyme activities of cytochrome P-450 isoenzymes by high-performance liquid chromatographic analysis of products", *Journal of Chromatography*, 553, 233-241
- Rico A.G. (1983) "Metabolism of endogenous and exogenous anabolic agents in cattle" *J. Anim. Sci.*, 57, (1), 226-32
- Rutten A.J.J.L., Falke H.E., Catsburg J.F., Top R., Blaauboer B.J., Van Holstein I., Doorn L., Van Leeuwen F.X.R. (1987) "Interlaboratory comparison of total cytochrome P450 and protein determinations in rat liver microsomes" *Archives of Toxicology*, 61, 27-33.
- Samuels T.P., Nedderman A., Seymour M.A. et E. Houghton (1998) "Study of the metabolism of testosterone, nandrolone and estradiol in cattle" *Analyst*, 123, 2401-2404.
- Sangiorgi, E.; Polignano, V.; Gardini, S. (2005) Boldenone and related hormones quantification by liquid chromatography–mass spectrometry in urine and faeces after calf administration of boldenone undecanoate. *Anal. Chim. Acta*, 529, 239-248
- Saudan C., Baume N., Robinson N., Avois L., Mangin P., Saugy M. (2006) « Testosterone and doping control" *Br J Sports Med.*, 40 (Suppl 1), 21-24

- Sauer M.J., Samuels T.P., Howells L.G., Seymour M.A., Nedderman A., Houghton E., Bellworthy S.J., Anderson S., Coldham N.G. (1998) "Residues and metabolism of 19-nortestosterone laurate in steers" *Analyst*, 123, 2653-2660
- Schanzer, W., Donike, M. (1992) "Metabolism of boldenone in man: gas chromatographic/mass spectrometric identification of urinary excreted metabolites and determination of excretion rates" *Biol. Mass. Spectrom.*, 21, 3-16.
- Schänzer W. (1996) "Metabolism of anabolic androgenic steroids" *Clin. Chem.*, 42, 1001-1020
- 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." (editori: Brunton L., Lazo J., Parker K.L.) McGraw Hill, New York
- Scippo M., Gaspar P., Degand G., Maghuin-Rogister G. (1993) "Control of the illegal administration of natural steroid hormones in urine and tissues of veal calves and in plasma of bulls" *Analytica Chimica Acta*, 275; 57-74.
- Scippo M., Degand G., Duyckaerts A. et G. Maghuin-Rogister (1994) "Control of the illegal administration of natural steroid hormones in the plasma of bulls and heifers" *Analyst*, 119, 2639-2644.
- Scippo M.L., van de Weerd, C., Willemsen, P., Francois J. M., Rentier-Delrue F., Muller M., Martial J. A., Maghuin Rogister G. (2002). "Detection of illegal growth promoters in biological samples using receptor binding assays" *Analytica-Chimica-Acta*. 473(1/2): 135-141.
- Serratos J., Blass A., Rigau B., Mongrell B., Rigau T., Tortadès M., Tolosa E., Aguilar C., Ribó O., Balagué J. (2006) "Residues from veterinary medicinal products, growth promoters and performance enhancers in food-producing animals: a European Union perspective" *Rev. Sci. Tech.*, 25, 637-53
- Sevaljević L., Isenović E., Vulović M., Macvanin M., Zakula Z., Kanazir D., Ribarac-Stepić N. (2001) "The responses of rat liver glucocorticoid receptors and genes for tyrosine aminotransferase, alpha-2-macroglobulin and gamma-fibrinogen to adrenalectomy-, dexamethasone- and inflammation-induced changes in the levels of glucocorticoids and proinflammatory cytokines" *Biol. Signals Recept.*, 10, 299-309

- Sgoifo Rossi C.A., Arioli F., Bassini A., Chiesa L.M., Dell'Orto V., Montana M., Pompa G. (2004) "Evidence for false-positive results for boldenone testing of veal calves due to faecal cross-contamination during sampling" *Food Addit Contam*, 21 (8), 756-762 (7).
- Silvan G., Martínez-Mateos M.M., Blass A., Camacho L., Gonzalez-Gil A., Garcia-Partida P., Illera J.C. (2007) "The effect of long-term exposure to combinations of growth promoters in Long Evans rats: part 1: Endocrine adrenal function" *Anal Chim Acta*, 586, 246-251
- Simontacchi C., Bono G., Bongioni G., Gabai G., Ferasin L., Borghese A. (1997) "Manuale di pratiche di laboratorio per la validazione di kit commerciali per il dosaggio degli ormoni steroidei in campo animale" *Zoot. Nutr. Anim.*, 23, 281-288
- Simontacchi C., Marinelli L., Gabai G., Bono G. et R. Angeletti (1999) "Accuracy in naturally occurring anabolic steroid assays in cattle and first approach to quality control in Italy" *Analyst*, 124, 307-312.
- Simontacchi C, Perez de Altamirano T, Marinelli L, Angeletti R, Gabai G. (2004). "Plasma steroid variations in bull calves repeatedly treated with testosterone, nortestosterone and oestradiol administered alone or in combination". *Vet Res Commun*. 28(6):467-77.
- Sivapathasundaram S., Magnisali P., Coldham N.G., Howells L.C., Sauer M. J. et Ioannides C. (2001) "A study of the expression of the xenobiotic metabolising cytochrome P450 proteins and of testosterone metabolism in bovine liver" *Biochemical Pharmacology*, 62, 635-45.
- Snell K., Mullock B. (1987) "Biochemical Toxicology: A practical approach" IRL, Oxford University Press, Oxford, England.
- Song Y.S., Jin C., Park E.H. (2000) "Identification of metabolites of phytosterols in rat feces using GC/MS." *Arch. Phar. Res.*, 23, (6), 599-604.
- Starka L. (2003) "Epitestosterone" *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 87, 27-34.
- Sterk, S.S.; Blokland, M.H.; Van Ginkel, L.A.; R. Schilt, Van der Vlis, E.; Boshuis, P.; Van Baak, M.J.; Nielen, M.W.F.; Van Rhijn, J.A.; Samson, D. ; Keukens, H.J.; Stephany, R.W. (2004) "Boldenone: an overview of Dutch research carried out in the veterinary field" In *Proceedings of the EuroResidue V*; Van Ginkel, L.A., Bergwerff A.A., Eds.; Nordwijkerhout The Netherlands, 900-906.

- Szotáková B., Baliharová V., Lamka J., Nožinová E., Wsól V., Velík J., Machala M., Neča J., Souček P., Šusová S., Skálová L. (2004) "Comparison of in vitro activities of biotransformation enzyme in pig, cattle, goat and sheep" *Research of Veterinary Science*, 76, 43-51
- Touber M.E., van Engelen M.C., Georgakopoulos C., van Rhijn J.A., Nielen M.W. (2007) "Multi-detection of corticosteroids in sports doping and veterinary control using high-resolution liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry" *Anal Chim Acta*, 586, 137-146
- Totsuka S., Watanabe T., Koyanagi F., Tanaka K., Yasuda M., Manabe S. (1999) "Increase in urinary excretion of 6beta-hydroxycortisol in common marmosets as a marker of hepatic CYP3A induction" *Arch Toxicol.*, 73, 203-207
- Van den Hauwe O., Campbell K., Crooks S.R., Schilt R., Van Peteghem C.H. (2005 a) "Confirmation of synthetic glucocorticoids with liquid chromatography/mass spectrometry: organization and results of an international interlaboratory comparison test" *J AOAC Int.*, 88, 87-94
- Van den Hauwe O., Dumoulin F., Elliott C., Van Peteghem C. (2005 b) "Detection of synthetic glucocorticoid residues in cattle tissue and hair samples after a single dose administration using LC-MS/MS" *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 817, 215-223
- Van de Kerkhof D.H., de Boer D., Thijssen J.H., Maes R.A. (2000) "Evaluation of testosterone/epitestosterone ratio influential factors as determined in doping analysis" *J. Anal. Toxicol.* 24, 102-115
- Van Peteghem C., Van Poucke C. (2006) "Analytical Methods: what is feasible nowadays? The state of the art" *J. vet. Pharmacol. Therap.*, 29 (suppl. 1), 33-34
- Van Puymbroeck M., Kuilman M.E.M., Maas R.F.M., Witkamp R.F., Leyssens L., Vanderzande D., Gelan J., Raus J. (1998 a) "In vitro models are important tools to monitor the abuse of anabolic steroids in cattle" *Analyst*, 123, 2453-2456.
- Van Puymbroeck M., Kuilman M.E.M., Maas R.F.M., Witkamp R.F., Leyssens L., Vanderzande D., Gelan J., Raus J. (1998 b) "Identification of some important metabolites of boldenone in urine and feces of cattle by gas chromatography-mass spectrometry" *Analyst*, 123, 2681-2686.
- Van Puymbroeck M., Kuilman M.E., Maas R.F., Witkamp R.F., Leyssens L., Van Miert A.S., Hendriks L., Vanderzande D., Adriaensens P., Jacobs M.P., Raus J. (1999) "17alpha-ethyl-5beta-estrane-3alpha, 17beta-diol, a biological marker for the abuse of norethandrolone and ethylestrenol in slaughter cattle" *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.*, 728, 217-232

Van't Klooster G.A.E. (1992 a) "Drug metabolism in ruminants an in vitro approach" (Tesi di dottorato), Wageningen.

Van't Klooster G.A.E., Blaauboer B.J., Noordhoek J., Van Miert A.S.J.P.A.M. (1992 b) "Cytochrome P450 induction and metabolism of alkoxyresorufins, ethylmorphine and testosterone in isolated hepatocytes from goats, sheep and cattle" *Biochemical Pharmacology*, 46, 1781-90.

Wolfe R., Ferrando A., Sheffield-Moore M. et R. Urban (2000) "Testosterone and muscle protein metabolism" *Mayo. Clin. Proc.*, 75, 55-59.

Wu F.C. (1997) "Endocrine aspects of anabolic steroid" *Clin. Chem.*, 43, 1289-1292.