

THESE DE DOCTORAT DE

ONIRIS

ÉCOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : « *SANTE PUBLIQUE* »

Par

Dante Emanuel ROJAS

Study of some aryl-propionamide SARMs metabolism in food producing animals. Highlighting biomarkers of exposure and effects for control purposes.

Thèse présentée et soutenue à la faculté des Sciences Vétérinaires, Université de Buenos Aires, Argentine, le 25 juin 2020
Unité de recherche : UMR 1329 LABERCA

Rapporteurs avant soutenance :

Luis AMBROS, Professeur, Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad de Buenos Aires, Argentine

Nora MESTORINO, Professeur, Facultad de Ciencias Veterinarias- Universidad Nacional de La Plata, Argentine

Ricardo Luis SAGER, Professeur Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias - Universidad Nacional de San Luis, Argentine

Composition du Jury :

Président : Luis AMBROS, Professeur, Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad de Buenos Aires, Argentine

Examineurs :

Luis AMBROS, Professeur, Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad de Buenos Aires, Argentine

Nora MESTORINO, Professeur, Facultad de Ciencias Veterinarias- Universidad Nacional de La Plata, Argentine

Ricardo Luis SAGER, Professeur Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias - Universidad Nacional de San Luis, Argentine

Directeur de Thèse : Andrea CALZETTA, Professeur, SEANASA, Buenos Aires, Argentine

Co-directeur de Thèse : Gaud DERVILLY, Ingénieur de Recherche HDR, Oniris, Nantes, France

Titre : Etude du métabolisme des SARMs de type Aryl-propionamide chez les animaux de production. Application à la recherche de biomarqueurs d'exposition et d'effets à des fins de contrôle.

Mots clés : SARMs ; métabolisme ; métabolites conjugués ; biomarqueurs ; LC-(HR)MS

Résumé : Les modulateurs spécifiques des récepteurs androgènes (SARMs), exercent leurs effets anabolisants exclusivement sur les muscles squelettiques et ne présentent pas d'activité androgénique. Sur la base de leurs mécanismes d'action et des résultats cliniques préliminaires, ces produits pourraient potentiellement être utilisés comme des substances anabolisantes. Dans ce contexte, l'objectif de la thèse, réalisée en co-tutelle internationale, est de développer des stratégies analytiques spécifiques et sensibles permettant de mettre en évidence leur utilisation frauduleuse chez l'animal de production (bovins et porcins). En s'appuyant sur des stratégies analytiques de couplage de chromatographie en phase liquide avec la spectrométrie de masse

basse et haute résolution (LC-QqQ et HRMS), le métabolisme de quatre SARMs (Enobosarm, Andarine, Bicalutamide et Hydroxyflutamide) ainsi que leurs cinétiques d'élimination ont été étudiés chez deux espèces animales, après administration des composés par voie orale. Des métabolites biomarqueurs ont pu être identifiés dans les matrices urine, fécès et sérum de bovins et porcins et des fenêtres de détection proposées. Ce travail de recherche contribuera à garantir au consommateur une sécurité chimique des denrées d'origine animale en assurant le suivi d'une nouvelle classe de composés anabolisants.

Title: Study of some aryl-propionamide SARMs metabolism in food producing animals. Highlighting biomarkers of exposure and effects for control purposes.

Keywords: SARMs, metabolism, phase II metabolites, biomarkers, LC-(HR)MS

Abstract: Compounds with anabolic properties have recently emerged: specific androgen receptor modulators (SARMs), currently being developed for the treatment of muscle-loss diseases. For example, commercially available Ostarine (MK-2866 / GTX-024 Enobosarm) exerts its anabolic effects exclusively on skeletal muscles and has no androgenic activity. Based on their mechanisms of action and preliminary clinical results, these products could potentially be used as anabolic substances. In this context, the aim of this international thesis is to develop analytical strategies to highlight their fraudulent use in production animal (cattle and pigs). Based on liquid-phase chromatography coupling techniques with low- and high-resolution mass

spectrometry (LC-QqQ and HRMS), the study of the metabolism of SARMs (Enobosarm, Andarine, Bicalutamide and Hydroxyflutamide) after administration and identification of selective metabolites that can be used as biomarkers in animal serums, faeces and serums. This research will help to ensure the consumer's chemical safety of animal products by monitoring a new class of anabolic compounds.

Thèse de Doctorat

Dante Emanuel ROJAS

Mémoire présenté en vue de l'obtention du

**Grade de Docteur de la Faculté de l'Université de Buenos Aires
& du**

**Grade de Docteur d'Oniris - École Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de
l'Alimentation**

sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

École doctorale : *BIOLOGIE-SANTÉ*

Discipline : *SANTÉ PUBLIQUE*

Spécialité : *Epidémiologie, Analyse de Risque, Recherche Clinique*

Unité de recherche : *UMR-LABERCA*

Soutenue le *30 mars 2020*

Thèse N° : *(10)*

STUDY OF SOME ARYL-PROPIONAMIDE SARMS METABOLISM IN FOOD PRODUCING ANIMALS. HIGHLIGHTING BIOMARKERS OF EXPOSURE AND EFFECTS FOR CONTROL PURPOSES.

ETUDE DU METABOLISME DES SARMS DE TYPE ARYL- PROPIONAMIDE CHEZ LES ANIMAUX DE PRODUCTION. APPLICATION A LA RECHERCHE DE BIOMARQUEURS D'EXPOSITION ET D'EFFETS A DES FINS DE CONTROLE.

JURY

Rapporteurs : **Luis AMBROS**, Professeur, Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad de Buenos Aires, Argentine
Nora MESTORINO, Professeur, Facultad de Ciencias Veterinarias- Universidad Nacional de La Plata, Argentine
Ricardo Luis SAGER, Professeur Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias - Universidad Nacional de San Luis

Directeur de Thèse : **Andrea CALZETTA**, Professeur, SEANASA, Buenos Aires, Argentine

Co-directeur de Thèse : **Gaud DERVILLY**, Ingénieur de Recherche, Oniris, Nantes, France

Thèse de Doctorat

Dante Emmanuel ROJAS

STUDY OF SOME ARYL-PROPIONAMIDE SARMS METABOLISM IN FOOD PRODUCING ANIMALS. HIGHLIGHTING BIOMARKERS OF EXPOSURE AND EFFECTS FOR CONTROL PURPOSES.

ETUDE DU METABOLISME DES SARMS DE TYPE ARYL-PROPIONAMIDE CHEZ LES ANIMAUX DE PRODUCTION. APPLICATION A LA RECHERCHE DE BIOMARQUEURS D'EXPOSITION ET D'EFFETS A DES FINS DE CONTROLE.

Résumé

Les modulateurs spécifiques des récepteurs androgènes (SARMS), exercent leurs effets anabolisants exclusivement sur les muscles squelettiques et ne présentent pas d'activité androgénique. Sur la base de leurs mécanismes d'action et des résultats cliniques préliminaires, ces produits pourraient potentiellement être utilisés comme des substances anabolisantes. Dans ce contexte, l'objectif de la thèse, réalisée en co-tutelle internationale, est de développer des stratégies analytiques spécifiques et sensibles permettant de mettre en évidence leur utilisation frauduleuse chez l'animal de production (bovins et porcins). En s'appuyant sur des stratégies analytiques de couplage de chromatographie en phase liquide avec la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS), le métabolisme de quatre SARMS (Enobosarm, Andarine, Bicalutamide et Hydroxyflutamide) ainsi que leurs cinétiques d'élimination ont été étudiés chez deux espèces animales, après administration des composés par voie orale. Des métabolites biomarqueurs ont pu être identifiés dans les matrices urine, fécès et sérum des bovins et porcins impliqués. Ce travail de recherche contribuera à garantir au consommateur une sécurité chimique des denrées d'origine animale en assurant le suivi d'une nouvelle classe de composés anabolisants.

Mots clés

SARMS; métabolisme; LC-MS/MS; métabolites conjugués

Abstract

Compounds with anabolic properties have recently emerged: specific androgen receptor modulators (SARMS), currently being developed for the treatment of muscle-loss diseases. For example, commercially available Ostarine (MK-2866 / GTX-024 Enobosarm) exerts its anabolic effects exclusively on skeletal muscles and has no androgenic activity. Based on their mechanisms of action and preliminary clinical results, these products could potentially be used as anabolic substances. In this context, the aim of this international thesis is to develop analytical strategies to highlight their fraudulent use in production animal (cattle and pigs). Based on liquid-phase chromatography coupling techniques with high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS), the study of the metabolism of SARMS (Enobosarm, Andarine, Bicalutamide and Hydroxyflutamide) after administration and identification of selective metabolites that can be used as biomarkers in animal serums, faeces and serums. This research will help to ensure the consumer's chemical safety of animal products by monitoring a new class of anabolic compounds.

Key Words

SARMS, Metabolism, LC-MS/MS, phase II metabolites

Remerciements

Sincères remerciements à Andrea Calzetta, Gaud Dervilly, Bruno LeBizec, Ariel Miranda et Stephanie Prevost pour son soutien technique et scientifique de ce travail.

À Mariana Galicio, Maria Juana Ruiz, Alba Castro, Susana Rojas, Diego Cristos, Diego Fernandez, Gaston Pelissier, Martin Paladino, Alexis Sosa, Alexander Sydor, Zied Kaabia, Gerome Laparre, Tao Peng, Berenger Marais, Kristine Hennig, Margarida Cardoso, Natalia Pesquero, Gabriela Denoya, Juan Manuel Rojas, Geronimo Ortigosa, Fernanda Martinez, Juan Carlos Fernandez, Claudia Gonzalez y Sergio Vaudagna pour toute votre aide.

À ma famille et à mes collègues (de l'INTA, de la Ecole Vétérinaires de l'UBA et de LabERCA).

Table des matières

Résumé.....	2
Remerciements	3
Table des matières	4
Introduction	7
Sécurité Chimique des Aliments.....	7
Législation Argentine	8
Législation de l'Union Européenne.....	8
Autres pays	10
Récepteurs d'Androgène.....	11
Modulateurs Sélectifs des Récepteurs d'Androgène (SARMs)	13
Hypothèses et objectifs.....	17
Hypothèses	17
Objectifs généraux.....	17
Objectifs particuliers	17
Activités réalisées.....	18
Étape 1 :Analyse pour le contrôle du SARMs dans l'élevage.....	19
Matériaux et méthodes.....	19
Instrumentation (LabERCA, ONIRIS)	19
Préparation des échantillons	19
Évaluation de la méthode	19
Résultats	21
Conclusions partielles :	25
Étape 2 : Étude du premier essai animal	26

Matériaux : Essai animal (Bicalutamide)	26
Échantillonnage	26
Métabolites de Phase II	27
Métabolites de la Phase I.....	27
Résultats	27
Étude des métabolites	29
Conclusions partielles :.....	33
Étape 3 : Deuxième test sur les animaux.	34
Administration de la dose et prélèvement d'échantillons.	34
Administration des doses	35
Échantillonnage	35
Étape 4 : Détermination des concentrations de SARMS.....	37
Ajustement de la méthode d'analyse du laboratoire	37
Matériaux et méthodes	37
Chromatographie.....	37
Évaluation de la méthode	37
Résultats	38
Évaluation des méthodes	38
Analyse d'échantillons provenant d'animaux traités	41
Conclusions partielles :.....	44
Étape 5 : Étude des métabolites du SARM.....	45
Matériaux et méthodes.....	45
Instrumentation.....	45
Résultats	45

Métabolites de Bicalutamide.....	45
Métabolites d'Andarine chez le porc.....	49
Conclusions partielles :.....	53
Évaluation des métabolites candidats pour le contrôle des pratiques d'élevage	55
Conclusions partielles.....	58
Conclusions générales.....	59
Bibliographie	61

Introduction

Sécurité Chimique des Aliments

L'utilisation de produits chimiques au cours de la production animale pour traiter les symptômes d'une maladie ou simplement à des fins zootechniques, peut générer des résidus chimiques dans les aliments dérivés. La toxicité des résidus pour la santé du consommateur de produits dérivés d'animaux traités signifie que les médicaments vétérinaires utilisés sont réglementés par une législation volontaire ou obligatoire.

Le commerce des denrées alimentaires peut également être affecté de manière significative par les différences de réglementation entre les pays, par exemple, les résidus de médicaments vétérinaires.

L'Accord sur l'Application des Mesures Sanitaires et Phytosanitaires (Accord SPS) a été signé dans le cadre de l'Accord général sur les tarifs douaniers et le commerce du Round d'Uruguay (1986-1994). Cela a conduit à la création de l'Organisation Mondiale du Commerce (OMC) pour réglementer le commerce international. L'Accord SPS a été signé par 132 gouvernements membres en 1994 et est entré en vigueur avec la création de l'OMC le 1er janvier 1995. L'Accord porte sur la mise en œuvre des normes de sécurité alimentaire et de santé animale et végétale.

L'Accord SPS permet aux pays de fixer leurs propres normes de biosécurité, mais encourage les gouvernements à les "harmoniser", c'est-à-dire à fonder leurs mesures nationales sur les normes, directives et recommandations internationales élaborées par :

- la Commission du Codex Alimentarius pour la sécurité sanitaire des aliments de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) / Organisation Mondiale de la Santé (OMS)
- l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE)
- la Convention Internationale pour la Protection des Végétaux de la FAO.

L'Accord SPS encourage l'adoption de normes fondées sur des mesures scientifiques pour réduire l'incertitude dans le commerce. Par conséquent, cet accord vise à faciliter le commerce en permettant à chaque pays d'adopter les mesures nécessaires pour sauvegarder la santé humaine, animale et végétale, à condition que cela ne constitue pas une mesure arbitraire,

injustifiable et discriminatoire entre les pays ou ne représente pas une restriction déguisée au commerce international.

Le présent accord s'applique aux denrées alimentaires, aux aliments pour animaux et à toute denrée alimentaire dérivée d'animaux et de plantes. L'objectif est de faire en sorte qu'un pays justifie par des informations scientifiques l'introduction, la modification ou le maintien de règles ou de procédures liées au commerce entre pays. L'Accord SPS est une obligation internationale, qui oblige les gouvernements à respecter les règles qui régissent leur commerce d'une manière " ouverte, non discriminatoire et fondée sur la science ".

Législation Argentine

La législation argentine propose de garantir la fourniture de denrées alimentaires sûres et de qualité aux consommateurs nationaux et aux acheteurs internationaux. En outre, en tant que membre de l'OMC, elle doit se conformer à l'Accord SPS et fonder sa législation sur des preuves scientifiques.

En Argentine, depuis 1961, les substances ayant des effets anabolisants sont réglementées. Le décret national 4224/61, compte tenu de l'interdiction en vigueur en Italie (consommateurs de produits argentins), interdit "...l'utilisation de substances à activité oestrogénique sous l'une quelconque de ses formes (naturelles ou synthétiques) à des fins zootechniques". Cependant, il permet l'utilisation thérapeutique des œstrogènes.

Depuis lors, les restrictions et les interdictions relatives à la production, à l'importation (traçabilité) et à l'utilisation de substances anabolisantes dans les pratiques d'élevage n'ont cessé d'augmenter. Actuellement, l'utilisation du diéthylstilbestrol (DES), de ses sels et de ses esters, de l'hexestrol et du dinestrol, de leurs sels et de leurs esters, des agonistes, des substances anabolisantes hormonales à des fins de stimulation de la croissance et/ou ayant une activité thyroïdienne chez les animaux producteurs d'aliments est interdite. Des exigences technico-administratives supplémentaires sont également établies pour les établissements exportateurs, par exemple en mettant en œuvre le Plan National de Contrôle Hygiénique, Sanitaire et des Déchets Chimiques, qui assure la surveillance des déchets chimiques afin de garantir l'absence de substances anabolisantes dans les exportations.

Législation de l'Union Européenne

La législation de l'Union européenne vise à garantir la sécurité des aliments pour les consommateurs de l'UE, qu'ils aient été produits dans l'UE ou dans un pays tiers.

En ce qui concerne l'utilisation des facteurs de croissance dans la production animale destinée à l'alimentation, la législation européenne est fondée sur le principe de précaution

établi dans l'accord SPS (contre une substance dont l'effet toxique complet n'est pas connu) et sur des informations scientifiques montrant que, dans certaines circonstances et à certaines doses, ces substances ont des effets toxiques sur l'animal et sur le consommateur de denrées alimentaires provenant d'animaux traités. De plus, on a constaté des effets cancérigènes, neurotoxiques, des perturbations endocriniennes, des altérations immunologiques, etc. [1, 2].

En Europe, en tant que communauté économique, le contrôle et la restriction de l'utilisation des agents anabolisants dans l'élevage ont été initiés depuis 1981. Cette année-là, sa réglementation (directive 81/602/CEE) interdisait certaines substances (diéthylstilbestrol, autres stilbènes et thyrostatiques). Toutefois, à cette époque, chaque État membre restait libre d'interdire ou d'autoriser l'utilisation d'hormones. En 1988, la Communauté européenne (CE) a interdit l'utilisation de six hormones pour stimuler la croissance des animaux (17--Estradiol ; Testostérone ; Progestérone ; Zéranol ; Acétate de Thrembolone et Acétate de Melengestrol).

Cette interdiction a été appliquée à l'intérieur du pays et aux importations en provenance de pays tiers à partir de 1989. Les pays tiers qui veulent exporter de la viande bovine et des produits à base de viande vers l'UE doivent avoir une législation équivalente ou utiliser un programme d'élevage sans hormones.

En 1996, deux directives ont été publiées, la directive 96/22/CE et la directive 96/23/CE, qui constituent le cadre juridique actuel pour le contrôle des résidus dans les denrées alimentaires d'origine animale. La directive 96/22/CE interdit l'utilisation d' -agonistes et de certaines substances à effet hormonal ou thyrostatique dans l'élevage des animaux. Toutefois, la directive 96/22/CE autorise l'utilisation de certains médicaments vétérinaires contenant des hormones (par exemple, le 17-œstradiol, la testostérone, la progestérone et ses dérivés) à des fins thérapeutiques et de reproduction. La directive 96/23/CE définit les mesures que les États membres de l'UE doivent prendre pour contrôler les substances et leurs résidus dans les animaux vivants et les produits animaux. Ensemble, ces directives décrivent comment étudier et détecter les substances dans les animaux, les aliments pour animaux et les produits d'origine animale.

La décision 97/747/CE définit les caractéristiques de l'échantillonnage à effectuer pour le contrôle de ces substances et de leurs résidus dans certains produits d'origine animale (par exemple, la volaille, la viande de lapin et le gibier, les œufs, le lait, le miel et le poisson).

Autres pays

Des études réalisées par des experts de la FAO indiquent que les résidus d'hormones naturelles dans les animaux traités ne sont pas nécessairement dangereux pour la santé humaine. Ils indiquent que le consommateur produit quotidiennement des quantités bien supérieures aux résidus de ces hormones et qu'il est également exposé à des doses plus élevées, présentes dans la viande et le lait d'animaux non traités. C'est pourquoi de nombreux pays (États-Unis, Canada, Australie, Nouvelle-Zélande et certains pays d'Amérique, d'Asie et d'Afrique) approuvent l'utilisation de certains agents anabolisants pour la production animale.

Comme mentionné, les gouvernements mettent en œuvre un ensemble de mesures pour protéger la santé publique, telles que la formation des secteurs de production impliqués dans l'utilisation de produits chimiques, l'information des consommateurs et l'application de contrôles de la sécurité sanitaire des aliments. Les différents critères juridiques et règlements adoptés par les gouvernements des pays pour la transformation des aliments et les niveaux de résidus peuvent rendre le commerce des produits difficile. Le cas des substances anabolisantes dans la production animale est contesté depuis des années entre les États-Unis et l'Union européenne.

Récepteurs d'Androgène

Le Récepteur d'Androgène (RA) est un membre de la superfamille des récepteurs de stéroïdes nucléaires. C'est une protéine soluble, qui fonctionne comme un facteur de transcription intracellulaire. Comme on peut le voir sur la Figure 1, structurellement, il est constitué de trois régions ayant des fonctions différentes, le domaine de liaison à l'ADN (DBD), le domaine de liaison aux ligands (LBD) et le domaine N-terminal (NTD). Un ligand agoniste déclenche des changements de conformation dans le récepteur [3].

Les RA sont exprimées dans les organes cibles tels que les muscles squelettiques, le foie, le Système Nerveux Central (SNC) et principalement dans la prostate, les glandes surrénales et l'épididyme.

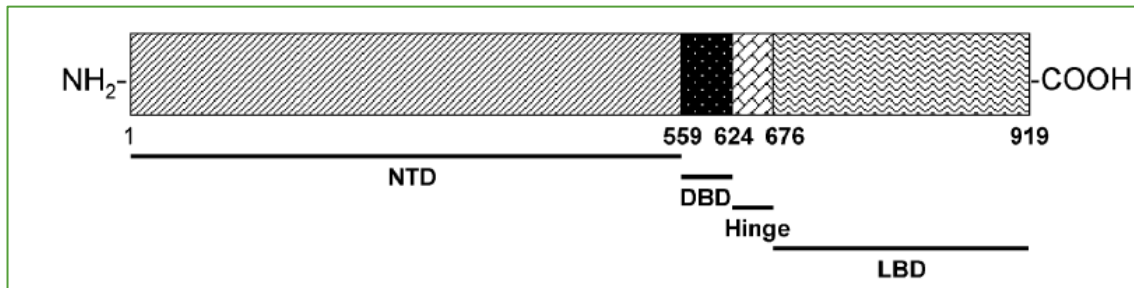


Figure 1 : Structure du récepteur des androgènes humains [3].

En l'absence de ligature, la RA reste dans le cytoplasme liée aux chaperons ou aux Protéines de Choc Thermique HSP 70 et HSP 90 (Heat Shock Protein, HSP). Cependant, en présence d'un ligand agoniste (y compris (T) ou DHT), interagit avec la région LBD produisant un changement conformationnel qui élimine les protéines HSPs, la dimérisation de la RA, la phosphorylation, la translocation vers le noyau et la liaison avec les éléments de réponse androgène (ERA) se produit. Pour cette raison, les cofacteurs et la machinerie transcriptionnelle sont appelés à activer les gènes dépendant de la RA sous le stimulus des ligands agonistes (Figure 2).

Les effets produits sur les tissus reproducteurs (prostate, testicules, vésicules séminales et structures accessoires) sont connus sous le nom d'effets androgènes tandis que les effets sur les muscles et les os sont appelés effets anaboliques [3].

Au cours de la dernière décennie, des progrès ont été réalisés dans le mécanisme d'action de la (T) dans différents tissus. Il existe trois types d'actions : premièrement, (T) peut activer

directement la RA lorsque la 5 α -réductase n'est pas exprimée ; deuxièmement, (T) se transforme en DHT avant d'activer la RA (5 à 10 %) ; et troisièmement, environ 0,2 % de (T) est attaqué par une aromatasase qui transforme (T) en œstrogène en activant les récepteurs d'œstrogène [3, 4].

La formation de la DHT est importante car elle a une plus grande affinité pour la RA que la T, ce qui donne une réponse plus puissante dans les tissus " dépendants de la DHT " comme la prostate, les testicules, les vésicules séminales et les structures accessoires (effets androgènes). Les œstrogènes générés par la transformation en (T) seraient de puissants régulateurs des processus métaboliques liés au comportement et à la cognition, à l'activité cardiovasculaire, à la fonction sexuelle, y compris la libido, et aux processus de renouvellement des os chez l'homme. Cependant, la plus grande proportion de (T) agirait sans modification des tissus " indépendants de la DHT " ou lorsque la 5 α -reductase est mal exprimée, en agissant directement sur la croissance des muscles squelettiques, la formation des tissus osseux, la distribution des tissus adipeux et la fonction sexuelle [3, 5].

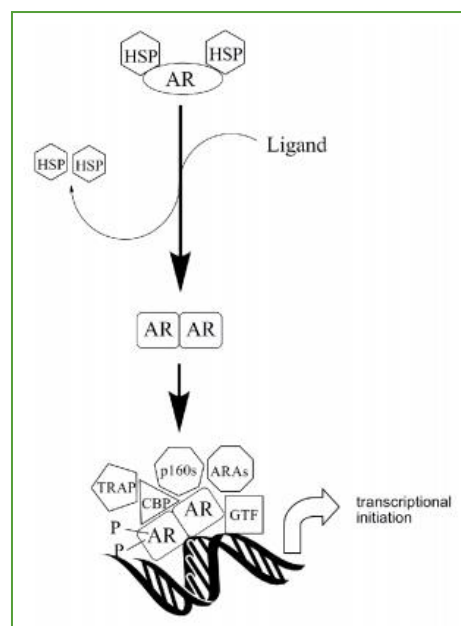


Figure 2 : Mécanisme d'action du récepteur d'androgène [6].

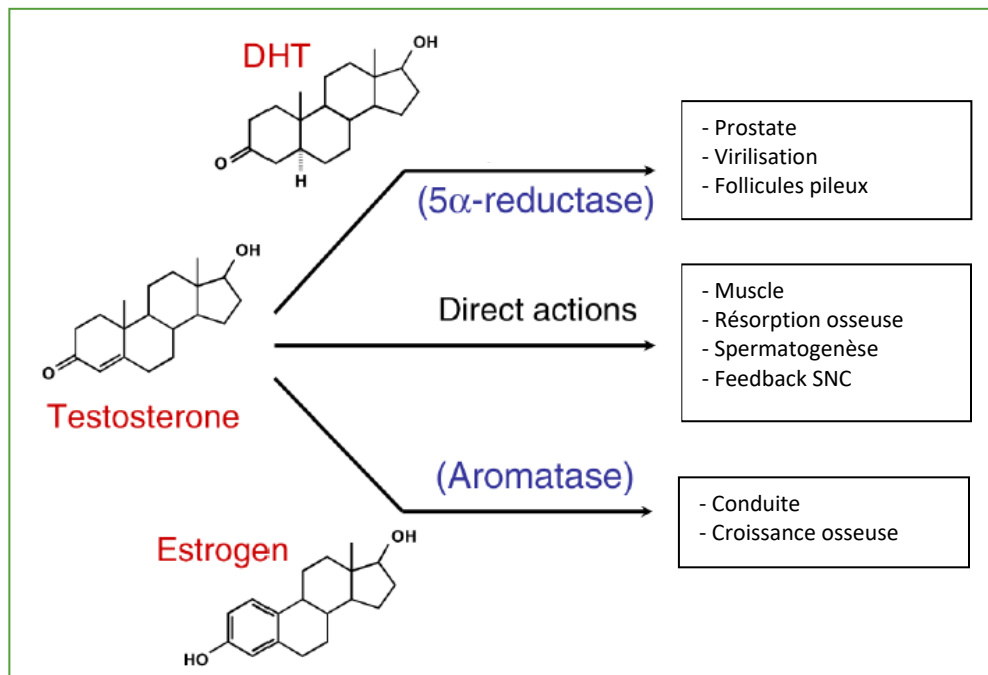


Figure 3 : Effets de la testostérone sur les tissus [4, 5].

La testostérone (T) peut se lier directement aux Récepteurs Androgènes (AR). Dans certains cas, selon les enzymes présentes dans le tissu, (T) peut être transformée par la 5 α-réductase pour se lier à la RA avec une plus grande affinité que T. Dans d'autres tissus, une aromatase est présente, capable de transformer (T) et de lui permettre de se lier aux récepteurs d'œstrogènes (RE).

Modulateurs Sélectifs des Récepteurs d'Androgène (SARMs)

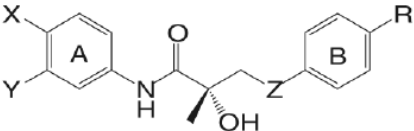
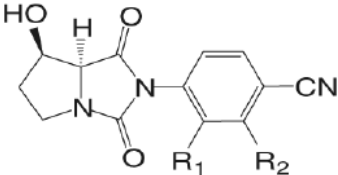
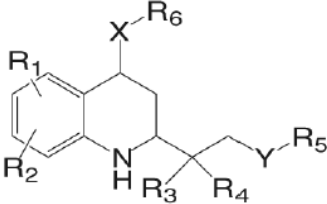
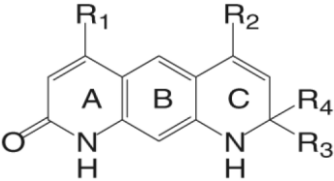
Les stéroïdes androgènes anabolisants sont isolés, identifiés et synthétisés depuis les années 1930 [7]. Comme nous l'avons mentionné, ils possèdent une activité anabolique en raison de leur capacité agonistique des RA [7-10]. Depuis des décennies, ils sont utilisés cliniquement dans le traitement des maladies androgènes [8]. Cependant, elles ont l'inconvénient de produire simultanément des effets anabolisants et androgènes. De plus, leur utilisation thérapeutique est limitée en raison de la faible biodisponibilité orale, de la réactivité croisée avec d'autres récepteurs stéroïdiens, de la toxicité hépatique et d'autres effets secondaires indésirables sur la prostate et le système cardiovasculaire [7-9].

Le SARM est une nouvelle famille de substances chimiques non stéroïdiennes qui ont la capacité de se lier aux RA [11, 12]. Les termes Modulateurs Sélectifs des Récepteurs d'Androgènes et sélectivité tissulaire a été utilisé pour la première fois en 1998 [11]. Les premiers SARMS non stéroïdiens ont été dérivés de l'arylpropionamide (Tableau 1), en particulier des dérivés du flutamide. Actuellement, ils en sont à un stade relativement précoce pour être utilisés dans les essais cliniques sur les humains.

Idéalement, ils sont sélectifs dans leur effet en fonction des tissus et ont une faible toxicité (hépatique, cardiovasculaire, etc.). De plus, ils ont des propriétés pharmacologiques favorables telles qu'une absorption digestive élevée, facilitant l'administration orale, et ils ont une longue demi-vie avant d'être éliminés de l'organisme [3, 6, 13, 14].

Compte tenu de leurs structures chimiques (Tableau 1), les SARMs peuvent être classés en au moins quatre classes : 1) Analogues de la Arylpropionamide (APA), 2) Analogues de la Hydantoïne Bicyclique, 3) Analogues de la Quinoléine et 4) Analogues de la tétrahydroquinoléine.

Tableau 1. Familles de SARMs non stéroïdiens [15].

Famille chimique	Structure
Analogues de la Arylpropionamide	
Analogues de la Hydantoïne Bicyclique	
Analogues de la Quinoléine	
Analogues de la tétrahydroquinoléine	

Le premier développement réussi des SARMS est le Bicalutamide (Figure 5), qui appartient aux dérivés de l'arylpropionamide (APA) [16, 17]. Bien qu'il soit utilisé comme anti-androgène pour bloquer la RA, il augmente chez l'homme les taux de testostérone, d'œstradiol, d'hormone lutéinisante et, dans une moindre mesure, d'hormone folliculo-stimulante [18-24].

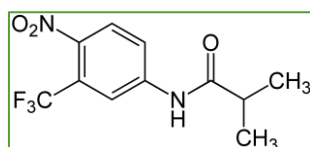


Figure 4 : Flutamide : structure chimique

Les études sur le métabolisme du Bicalutamide menées sur des animaux de laboratoire et chez l'humain (essais cliniques) reflètent la présence de métabolites résultant des réactions de phase I (hydroxylation) et de phase II (conjugaison glucuronide-sulfate) [16, 17]. De plus, les profils d'excrétion fécale et urinaire des métabolites et du Bicalutamide libre ont fait ressortir l'importance de ces matrices comme voie d'excrétion quantitativement importante [25, 26].

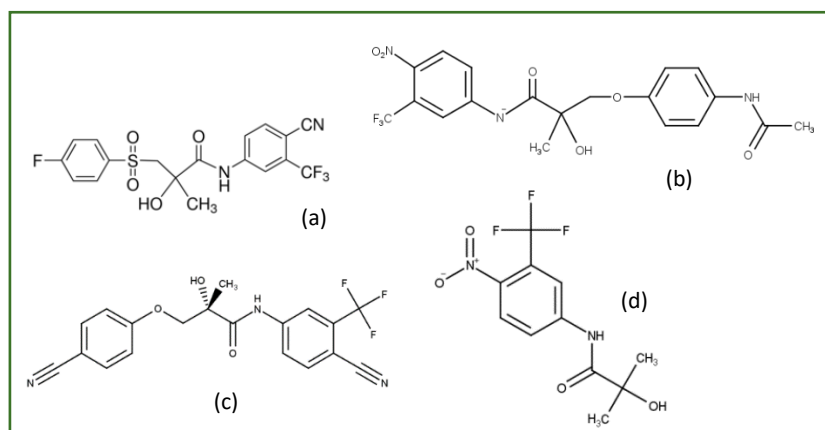


Figure 5 : Structure chimique du Bicalutamide (a), d'Andarine (b), d'Ostarine (c) et de l'Hydroxyflutamide (d).

D'autres composés des SARMS en sont à différentes étapes de l'étude clinique [3, 27, 28]. Cependant, d'autres dérivés de l'APA ont démontré une capacité agoniste de la RA chez les animaux [29] et il existe même des brevets en vigueur pour l'utilisation de ces substances dans la production animale [30].

Au cours des dernières années, un nombre croissant d'études ont été publiées sur les caractéristiques analytiques et métaboliques des SARMS dérivées de l'APA. La plupart des

méthodes utilisées sont des approches modernes de la chromatographie liquide couplées à des détecteurs de Spectrométrie de Masse à Haute Résolution [31-33]. Les réactions de phase I (hydroxylation, défénylation, nitro-réduction, etc.) et de phase II (conjugaison glucuronide-sulfate) ont été confirmées dans des études in vitro et in vivo (urine et sang) [34-37].

Certains des Modulateurs Sélectifs des Récepteurs Androgènes (SARMs) ayant une capacité agoniste de la RA constituent un risque d'abus dans le sport et la production animale. C'est pourquoi, depuis 2008, l'utilisation des SARMs dans le sport est interdite par l'Agence mondiale antidopage [38, 39]. De plus, bien que les essais cliniques/toxicologiques ne soient pas terminés, des cas de ventes illégales sur Internet ont été signalés et leur utilisation dans la production porcine a été signalée [40, 41]. Des cas d'abus de SARMs dans les sports ont été signalés [42], avec 13 détections signalées pour la seule année 2013 [43]. Ainsi, les SARMs commencent à passer du dopage sportif à la production animale, comme cela s'est produit avec d'autres agents anabolisants dans le passé [36].

Hypothèses et objectifs

Hypothèses

- L'étude du métabolisme des SARMS d'arylpropionamide (APA-SARMS) est nécessaire pour le développement de méthodes analytiques de contrôle des pratiques d'élevage.

- Les APA-SARMS et leurs métabolites dans les échantillons d'urine et de fèces peuvent être utilisés pour surveiller les abus dans les pratiques d'élevage.

Objectifs généraux

- Étudier les niveaux d'APA-SARM dans l'urine, les fèces et le sang des animaux de production.

- Développer des outils de chimie analytique pour la surveillance des résidus afin de mettre en œuvre le contrôle des APA-SARM chez les animaux de production.

Objectifs particuliers

- Développer une méthode de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem pour l'étude des APA-SARM.

- Identifier les métabolites utiles pour le contrôle des APA-SARM dans les pratiques d'élevage.

- Étudier les APA-SARM et l'excrétion de leurs métabolites dans l'urine et les fèces des porcs et des bovins.

Activités réalisées

Étape 1 : Développement de la méthode d'analyse pour le contrôle du SARMS dans la production animale.

1) Développement d'une méthode d'analyse de laboratoire : pour Enobosarm, Bicalutamide, Andarine et Hydroxyflutamide dans des matrices faciles à obtenir basées sur la chromatographie liquide et le détecteur de spectrométrie de masse (LC-MS).

2) Étude des performances de la méthode développée (sélectivité, linéarité, exactitude, précision et sensibilité).

Étape 2 : Premier essai sur les animaux (LabERCA-ONIRIS)

1) Analyse d'échantillons provenant d'un veau traité avec CASODEX (Bicalutamide). Étude des métabolites de la PHASE II.

2) Étude des métabolites de PHASE I obtenus avec la méthode développée dans des échantillons de l'animal traité avec CASODEX.

Étape 3 : Deuxième essai sur animaux (Estación Experimental Agropecuaria-INTA, Station Expérimentale Agricole d'Anguil).

1) Administration de la dose et prélèvement d'échantillons.

Étape 4 : Élimination du SARMS (Laboratoire des Contaminants Chimiques - Institut de Technologie Alimentaire, INTA-Castelar)

1) Ajustement de la méthode d'analyse en laboratoire.

2) Évaluation de la méthode

3) Analyse des échantillons

Étape 5 : Étude des métabolites du SARMS (Estación Experimental Agropecuaria-INTA, Station Expérimentale Agricole de Concordia)

Étape 1 :Analyse pour le contrôle du SARMS dans l'élevage.

Travaux réalisés au Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA).

Matériaux et méthodes

La préparation des échantillons (Figure 6 et Figure 7) s'est appuyée sur des travaux antérieurs réalisés au Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments [4, 12] et sur d'autres bibliographies [1, 2, 11, 26, 32, 34-37, 39, 41, 43-47].

Le Tableau 2 présente les temps de rétention, les transitions utilisées pour l'identification et la quantification de chaque analyte, y compris l'étalon interne (ISTD).

Instrumentation (LabERCA, ONIRIS)

Le système chromatographique utilisé était l'Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) avec une colonne Acquity UPLC® BEH (2,1 x 100 mm ; 1,7 µm) et une phase mobile (0,6 mL/min) constituée d'un gradient de solution A (eau avec 0,1 % d'acide formique) et de solution B (acétonitrile avec 0,1 % d'acide formique). Un détecteur équipé d'une ionisation par électrospray et d'un analyseur quadripolaire triple (XEVO TQ-S, Waters, Milford, MA, USA) a été utilisé pour l'analyse par spectrométrie de masse. Le logiciel MassLynx 4.0 (Waters, Milford, MA, USA) a été utilisé pour l'acquisition et la manipulation des données chromatographiques et spectrométriques.

Préparation des échantillons

La base du protocole pour l'urine est une extraction en phase solide (SPE) et pour les matières fécales, une combinaison d'extraction liquide-liquide (LLE) suivie d'une SPE est appliquée.

Afin d'étudier les médicaments qui pourraient être conjugués (glucuronides ou sulfates), une étape d'hydrolyse enzymatique a également été ajoutée.

Évaluation de la méthode

La méthodologie appliquée a été évaluée par des paramètres, obtenus à partir du cadre juridique européen concernant les performances des méthodes d'analyse applicables au contrôle des denrées alimentaires (Décision 2002/657/CE). Les tests effectués visaient à déterminer la sélectivité, la linéarité, l'exactitude, la précision et la sensibilité.

Les courbes d'étalonnage ont été construites pour chaque analyte en utilisant la relation signal (**S**) des aires de chaque analyte avec l'étalon interne ($S = \text{AreaAnalyte} / \text{AreaISTD}$) en

fonction de sa concentration. Différentes courbes d'étalonnage ont été établies pour couvrir les plages suivantes : 0,25 - 30 ng/mL pour l'urine et 0,5 - 1600 ng/g pour les fèces.

La concentration ($C_{Analito}$) a été calculée par interpolation selon:

$$C_{analito} = \frac{(S - b)}{a}$$

S : signal ; b : ordonnée à l'origine de l'équation correspondant à la régression linéaire de l'analyte et a : pente de l'équation correspondant à la régression linéaire de l'analyte

Linéarité : la linéarité a été évaluée en fonction du coefficient de détermination (r^2) obtenu à partir de courbes d'étalonnage construites.

Exactitude : comme aucun essai interlaboratoire n'est disponible pour ces substances, il a été évalué en pourcentage de récupération (R%). Le R% de la méthode a été calculé pour chaque analyte à différents niveaux de concentration. Les R% ont été calculés entre 0,25 - 30 ng/mL pour l'urine et pour les fèces : 0,5 - 1600ng/g. Pour ce faire, on a utilisé comme valeurs vraies (100 %) des courbes construites à partir d'extraits d'échantillons blancs avec l'ajout de quantités connues de solutions étalons (matrix-matched [48, 49]) et on a appliqué la formule suivante

$$R\% = \frac{C_{cal}}{C_{con}} \times 100$$

C_{cal} : concentration calculée ; C_{con} : concentration connue (obtenue en ajoutant l'analyte à l'extrait).

Précision : évaluée comme le coefficient de variation calculé (écart-type relatif percentuel, RSD%) de l'analyse en trois exemplaires des échantillons enrichis entre 0,25 - 30 ng/mL pour l'urine et pour les fèces : 0,5 - 1600ng/g.

$$RSD \% = (\text{Desvío Estándar}) / \text{Promedio} \times 100$$

Sensibilité : a été déterminée comme le niveau le plus bas de la courbe d'étalonnage montrant un rapport signal/bruit supérieur à 10 et une récupération entre 70 et 120 %.

Sélectivité : elle a été étudiée en suivant les critères de la législation européenne pour l'application de la chromatographie liquide avec détection par spectrométrie de masse (HPLC-MS/MS), qui sont basés sur le temps de rétention par rapport à un étalon interne (ISTD) et la tolérance de l'abondance relative des ions en mode de surveillance des réactions multiples (MRM).

La sélectivité a également été testée pour l'absence d'interférence en comparant les échantillons cibles et fortifiés.

Résultats

Les figures 6 et 7 présentent les grandes lignes de la méthodologie appliquée pour les échantillons d'urine et de fèces (respectivement).

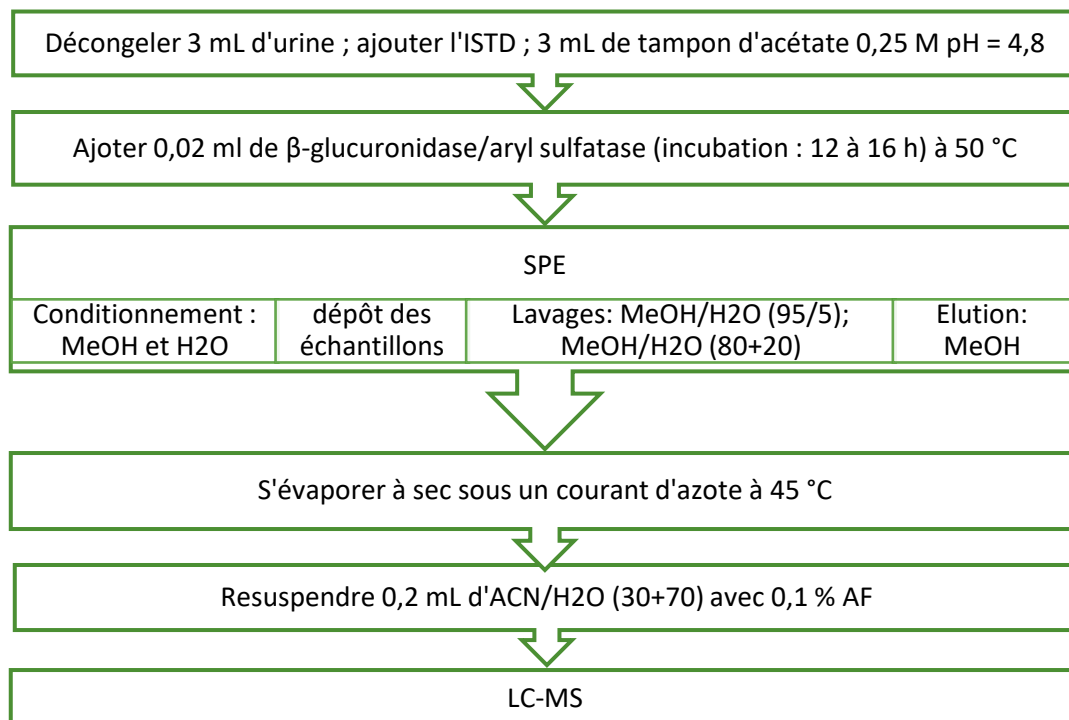


Figure 6 : Méthode développée pour l'urine.

L'ajout de l'enzyme β-glucuronidase/arylsulfatase n'est fait que pour étudier les métabolites conjugués.

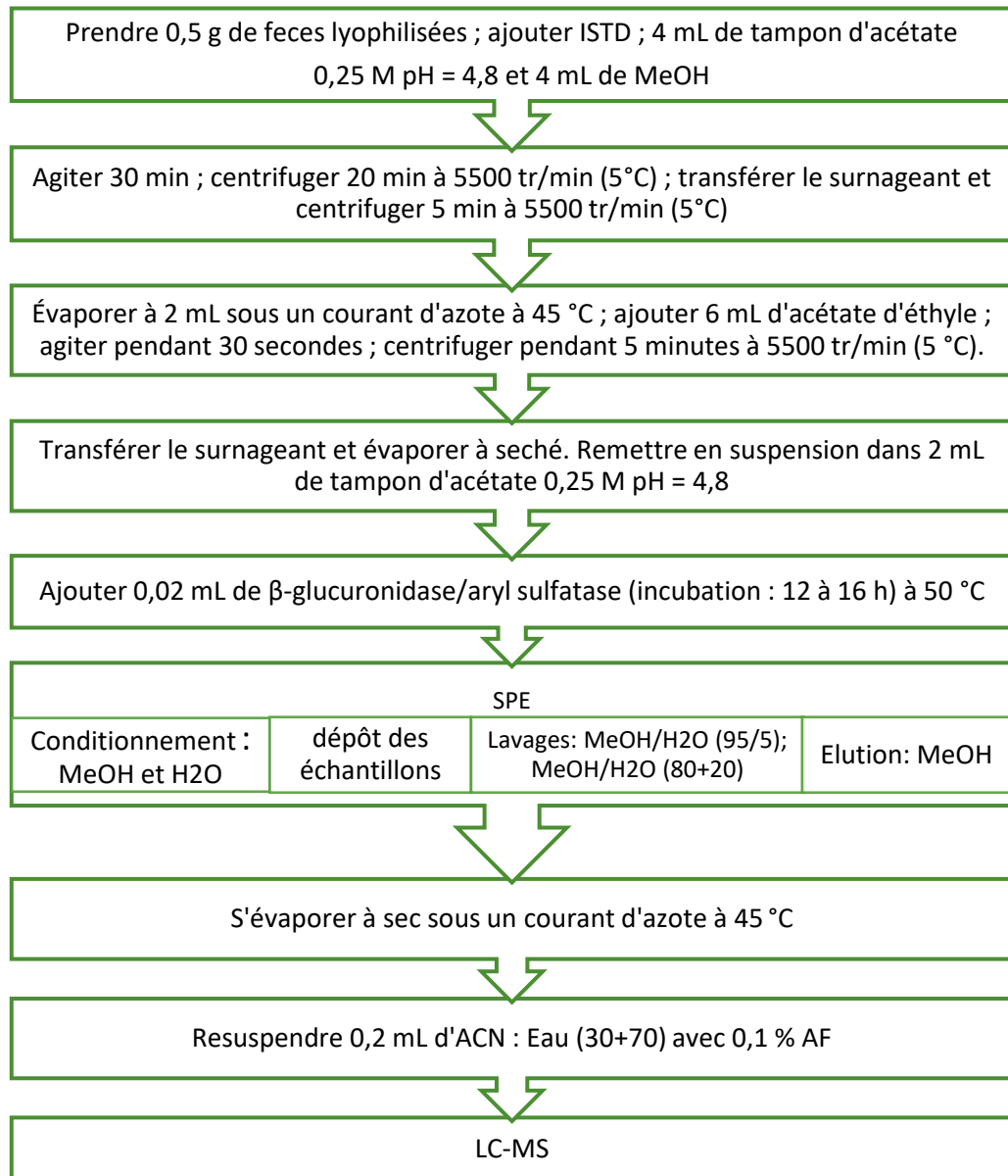


Figure 7 : Méthode développée pour les fèces.

L'ajout de l'enzyme β-glucuronidase/arylsulfatase n'est fait que pour étudier les métabolites conjugués.

Le Tableau 2 présente les Temps de Rétention (RT), les transitions utilisées pour l'identification et la quantification de chaque analyte, y compris l'étalon interne (ISTD).

Tableau 2 : Paramètres utilisés pour l'identification et la quantification du SARMS

Enobosarm, Andarine, Bicalutamide, Bicalutamide-D4 et Hydroxyflutamide, (Q) transitions de quantification, (q) transitions de qualification

RT (min)	Compound	Transiciones	Cone (V)	Collision (eV)
2,81	Hydroxyflutamide	291,1>205,0 (Q)	40	24
		291,1>175,0 (q)		32
		291,1>155,0 (q)		36
3,02	Andarine	440,1>150,0 (Q)	40	26
		440,1>261,0 (q)		18
		440,1>205,0 (q)		32
3,44	Bicalutamide- D4	433,1 > 255,0 (Q)	30	16
		433,1 > 185,0 (q)		44
		433,1 > 177,0 (q)		24
3,46	Bicalutamide	429,1 > 255,1 (Q)	30	16
		429,1 > 185,0 (q)		44
		429,1 > 173,0 (q)		24
3,96	Ostarine	388,1>118,0 (Q)	30	18
		388,1>269,0 (q)		18
		388,1>185,0 (q)		38

Le Tableau 3 présente les résultats obtenus à partir de l'évaluation des méthodologies appliquées aux urines et aux fèces.

Tableau 3 : Paramètres obtenus pour l'évaluation de la méthode

Urine				
	Hydroxyflutamide	Enobosarm	Bicalutamide	Andarine
A	1,4176	0,9815	0,9604	0,3593
B	0,1774	0,0859	0,1529	0,0471
r²	0,998 ± 0,002	0,998 ± 0,002	0,999 ± 0,007	0,999 ± 0,006
RSD (%)	0,6 - 11,6	2,4 - 7,1	1,8 - 6,6	4,4 - 17,9
R%	97 - 118	73 - 118	95 - 111	71 - 107

Fèces				
	Hydroxyflutamide	Enobosarm	Bicalutamide	Andarine
a	0,7532	0,5833	0,6086	0,2108
b	0,7926	0,3069	0,4191	0,1650
r²	0,996 ± 0,003	0,993 ± 0,005	0,996 ± 0,003	0,996 ± 0,002
RSD (%)	1,6 - 10,9	2,8 - 13,9	1,6 - 10,9	0,6 - 18
R%	88 - 115	85 - 117	83 - 109	74 - 108

La sensibilité exprimée sous forme de limite de quantification (LQ ou LOQ) était de 0,25 ng/mL pour l'urine et de 0,5 ng/g pour les fèces. Ces niveaux de concentration sont adéquats, compte tenu du fait que la recommandation européenne (CRL Guidance Paper 2007) pour les substances anabolisantes stéroïdiennes dans l'urine est de 0,5 ng/mL [36]. Dans le cas des matières fécales, il n'y a pas de recommandations [36] pour les agents anabolisants stéroïdiens.

Conclusions partielles :

- Une méthode analytique a été mise au point pour l'étude de l'Enobosarm, de l'Hydroxyflutamide, du Bicalutamide et d'Andarine dans l'urine et les fèces de bovins. La limite de quantification était de 0,25 ng/mL pour l'urine et de 0,5 ng/g pour les fèces.

- La méthode de traitement proposée pour l'urine est plus simple que pour les fèces. Ceci était prévisible étant donné que la matière fécale est une matrice d'une plus grande complexité (teneur plus élevée en protéines, lipides et plus hétérogène). Par conséquent, il faut travailler davantage pour éliminer les interférences ou les substances qui pourraient salir ou détériorer l'équipement instrumental. Pour cette raison, le temps consacré à l'analyse des fèces est doublé, notamment en raison des étapes d'évaporation.

- Un analyste dans une journée de travail de 8 heures, en appliquant les protocoles proposés, pourrait traiter jusqu'à 12 échantillons de fèces ou jusqu'à 24 échantillons d'urine. Dans le cas de l'hydrolyse enzymatique, il faut envisager l'incubation (pendant la nuit).

- Les méthodes proposées ont démontré une performance satisfaisante pour les exigences réglementaires, en termes de linéarité, de sensibilité, de précision, d'exactitude, de sélectivité et de spécificité. Par conséquent, la méthodologie développée peut être appliquée dans la production bovine afin de contrôler l'utilisation du Bicalutamide, d'Ostarine, de l'Hydroxyflutamide et d'Andarine dans les urines et les fèces.

- Il convient de noter qu'il s'agit du premier travail qui utilise les matières fécales comme matrice pour le contrôle de routine de l'abus de SARMS (Hydroxyflutamide, Bicalutamide et Andarine) dans la production d'animaux destinés à la consommation humaine.

Étape 2 : Étude du premier essai animal

1) Analyse des échantillons obtenus d'un veau traité avec CASODEX (Bicalutamide). Étude des métabolites de la PHASE II.

2) Étude des métabolites de la PHASE I obtenus avec la méthode développée dans des échantillons de l'animal traité avec CASODEX.

Matériaux : Essai animal (Bicalutamide)

Échantillonnage

La présente étude d'élimination du Bicalutamide a été approuvée par le Comité d'éthique français (Protocole n° 02323.01). Des échantillons d'urine et de fèces ont été prélevés sur un veau sain (race : Montbéliard, poids : 190 kg, âge : 8,5 mois) avant et après l'administration orale de 100 mg de CASODEX (jour 0). L'échantillonnage a commencé 3 jours avant l'administration et consistait en un prélèvement quotidien d'urine et de fèces jusqu'au 7e jour. Des échantillons supplémentaires ont été prélevés le jour 0, 4 et 8 heures après la dose. Les échantillons ont été conservés à -20 °C jusqu'à leur traitement.



Figure 8 : Veau (race : Montbéliard, poids : 190 kg, âge : 8,5 mois) utilisé pour l'étude d'élimination du Bicalutamide. Administration orale de 100 mg de CASODEX et prélèvement d'échantillons d'urine et de fèces.

Métabolites de Phase II

L'étude des métabolites de phase II a consisté à déterminer la façon la plus pratique d'hydrolyser les conjugués. L'hydrolyse chimique et l'hydrolyse enzymatique ont été étudiées en même temps que les tests de stabilité de l'analyte aux conditions d'hydrolyse.

Métabolites de la Phase I

L'étude des métabolites de phase I a été réalisée en mélangeant des extraits de matrice (urine et fèces) des jours 1, 3, 5 et 7.

La stratégie de cet essai a consisté à combiner les informations obtenues à partir des différents modes de SCAN autorisés par l'analyseur triple quadripolaire (SCAN des ions précurseurs, SCAN des ions produits, SCAN des pertes neutres et SCAN complet). Après avoir postulé les métabolites candidats, on a effectué des tests en mode de surveillance de transition simple et multiple (surveillance des réactions multiples, MRM ; et surveillance des réactions simples, SRM) afin de fournir une plus grande certitude aux métabolites postulés.

Résultats

Les résultats obtenus pour le Bicalutamide dans l'urine et les fèces au cours de l'échantillonnage sur 7 jours sont présentés à la Figure 9. Comme prévu, on n'a pas trouvé de Bicalutamide avant l'administration, mais après 4 heures, on a constaté une augmentation rapide dans l'urine et les fèces. Dans les deux matrices, une augmentation rapide a été observée, atteignant un maximum au jour 1 (13,15 ng/mL dans l'urine et 1254,11 ng/g dans les fèces) et une lente diminution de la concentration jusqu'au jour 7 (0,72 ng/mL dans l'urine et 52,90 ng/g dans les fèces). Les études réalisées sur certains animaux de laboratoire décrivent une excrétion semblable à celle observée dans le cadre de ces travaux, avec une élimination plus élevée du Bicalutamide dans les premiers jours suivant l'administration [16, 50].

Les concentrations trouvées dans les fèces étaient beaucoup plus élevées que celles trouvées dans l'urine. Cependant, l'augmentation relative au jour 1 était plus importante dans les urines (4hs=19% ; 8hs=49%) que dans les fèces (4hs=1% ; 8hs=19%). L'augmentation urinaire précoce pourrait s'expliquer par le fait que le Bicalutamide possède 2 isomères (R et S) dont l'isomère S a une faible activité biologique et serait rapidement éliminé avec des changements métaboliques minimes. L'élimination commencerait alors rapidement par la présence de l'isomère S dans l'urine [17, 50]. En revanche, l'excrétion du R-Bicalutamide est lente en raison de son métabolisme, qui comprend la recirculation entéro-hépatique avec excrétion biliaire [25]. Ce comportement serait probablement applicable aux bovins étudiés puisque dans la

Figure 9 (a) et (b) on peut voir que pendant les 3 premiers jours nous avons les valeurs de concentration les plus élevées.

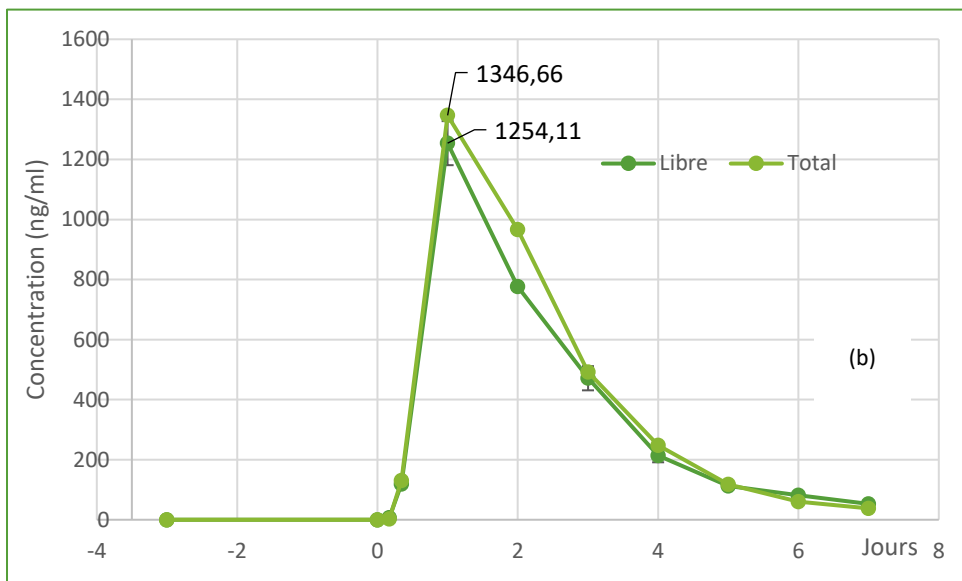
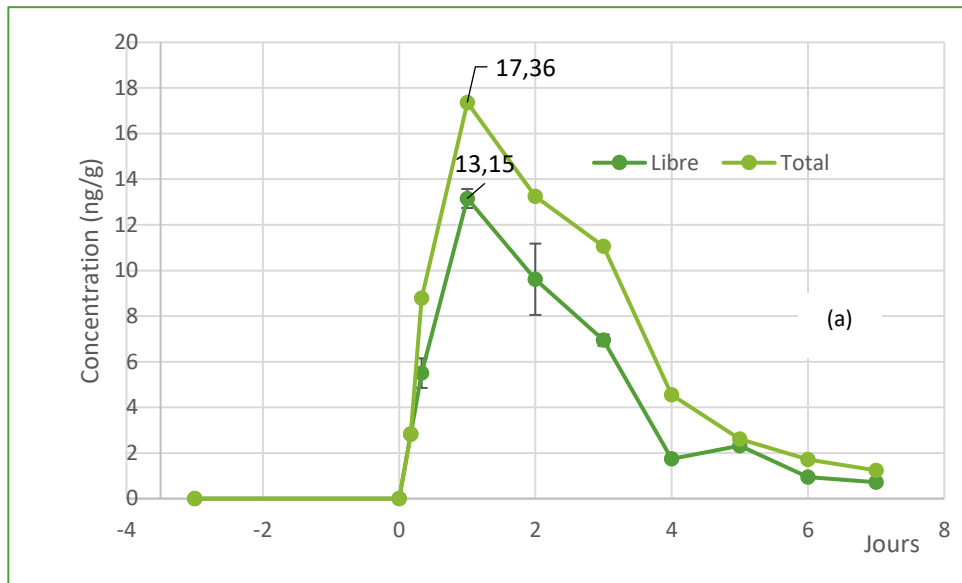


Figure 9 : Profil d'excrétion du Bicalutamide dans les fèces (a) et l'urine (b).
Chaque point représente la moyenne de 5 déterminations.

Étude des métabolites

Les métabolites de la phase II ont été déterminés après avoir établi une façon appropriée de travailler avec l'hydrolyse enzymatique. Les Figures 9 (a) et (b) présentent les résultats des concentrations de *Bicalutamide libre* et de *Bicalutamide total* (libre + libéré par action enzymatique). On peut voir que la courbe correspondant au Bicalutamide total est parallèle à celle du Bicalutamide libre et, tout au long de l'essai, elle est supérieure mais toujours très proche. Cela s'expliquerait par le fait que le libre (libéré sans modification) est éliminé en plus grande quantité que le conjugué (sous forme de glucuronide, sulfate, etc.) dans les deux matrices (urine et fèces). Il est également possible de déterminer la concentration de Bicalutamide conjugué (sous forme de glucuronide, de sulfate, etc.) dans l'urine et les fèces, en effectuant la soustraction du total moins libre. La présence de Bicalutamide libre sans modification dans les fèces peut aussi s'expliquer par le fait qu'une partie est excrétée dans la bile sous forme de glucuronide et que la flore digestive libérerait le Bicalutamide de sa conjugaison [25].

L'analyse d'autres métabolites, y compris les métabolites de la phase I, était plus complexe car, sans connaître les structures chimiques ou le nombre de métabolites à rechercher, il est impossible d'établir les conditions optimales dans le détecteur MS (spectrométrie de masse) pour les trouver.

Le Tableau 4 présente les résultats de cette étape des travaux. Les ions quasi-moléculaires [M-H⁻] avec les ions correspondants peuvent être observés et les transitions confirmées par SRM sont indiquées.

La Figure 10 présente un chromatogramme composite construit par la somme des SRM (Courant Ionique Total, TIC) obtenus lors de l'analyse du mélange d'extraits préparé comme décrit dans *Métabolites de la Phase I*, à la page 27.

Tableau 4 : Métabolites du Bicalutamide trouvés chez les bovins traités par Casodex®.
Résultats de l'étude sur la MS en mode SCAN et en mode SRM.

	M1	M2	M3	M4	M5
[M-H]	605	621	445	509	525
Ions (m/z)	587	603	427	491	507
	561	445*	409	411	445*
	543	427*	185*	173*	427*
	429*	365*	255*	185*	255*
	411*	185*	189*	255*	185*
	193*	255*		429*	175
	185	175			189
	255	189*			
	159*	271*			
	173	201*			
		173			
		159			

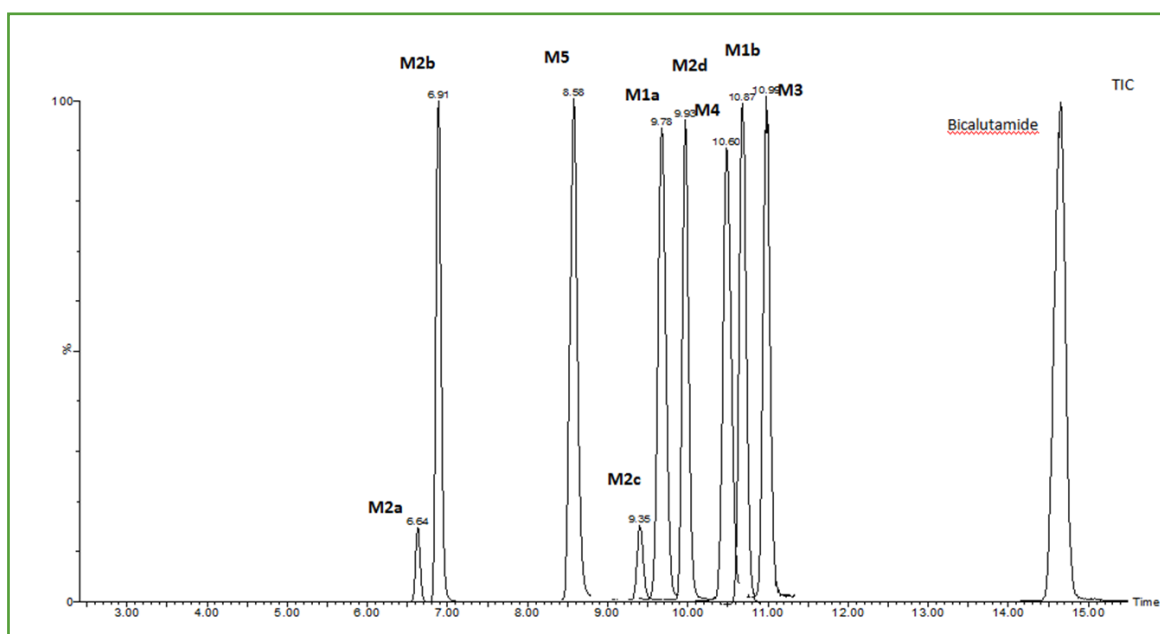


Figure 10 : Chromatogramme composite construit par les TIC pour le Bicalutamide (1er essai)
Résultat obtenu à partir des SRM utilisés pour les métabolites du Bicalutamide dans l'urine et les fèces.
 Les TIC correspondent à : M1a - M1b : 605>159 + 605>193 + 605>411 ; M2a - M2b : 621>185 + 621>255 + 621>445 ; M2c - M2d : 621>201 + 621>445 + 621>271 ; M3 445>185 + 445>189 + 445> 255 ; M4 : 509>173 + 509>185 + 509>255 ; M5 : 525>185 ; 525>255 ; 525>445 ; Bicalutamide : 429,1>173,02 + 429,1>185,04 + 429,1>255,1.

Après avoir analysé les informations de la spectrométrie de masse et les données bibliographiques, les métabolites trouvés étaient au nombre de 5 et ont été nommés en mettant la lettre " M " devant. Les structures suivantes ont été proposées :

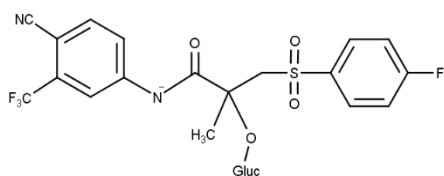


Figure 11. M1 (m/z = 605).

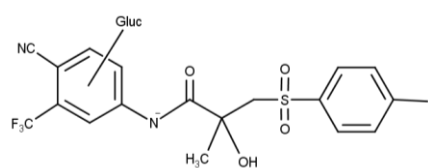


Figure 12_(a). M2 (m/z = 621).

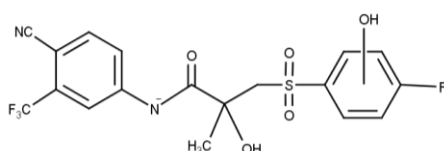


Figure 13. M3 (m/z = 445).

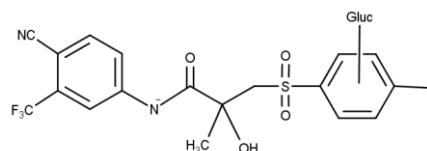


Figure 12_(b). M2 (m/z = 621).

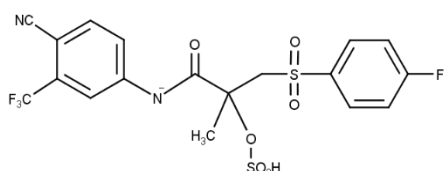


Figure 14. M4 (m/z = 509).

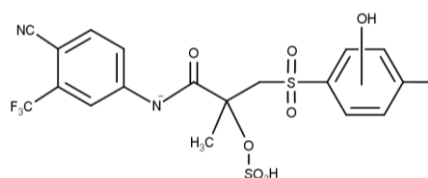


Figure 15. M5 (m/z = 525).

La Figure 11 présente une structure probable pour les métabolites M1, avec le travail effectué dans la présente étude il n'est pas possible de connaître la position réelle de l'acide glucuronide (Gluc).

La Figure 12 (a et b) montre 2 alternatives de localisation possibles pour l'acide glucuronique (Gluc). Cette Figure ne propose pas une structure exacte car les informations fournies par le détecteur de spectrométrie de masse ne sont pas suffisantes.

La Figure 13 montre la structure chimique probable M3, en accord avec les informations obtenues à partir des spectres de masse. L'hydroxyle est dans le "cycle monofluoré" mais la position exacte ne peut être connue et pour cette raison aucune liaison réelle n'est tracée.

La Figure 14 présente la structure chimique proposée pour M4, compte tenu des fragments trouvés dans les spectres de masse acquis. Toutefois, la structure suggérée ne peut être considérée comme correcte. Pour pouvoir le dire, des études complémentaires telles que l'analyse avec un spectromètre de masse à haute résolution ou la résonance magnétique nucléaire devraient être réalisées.

La Figure 15 montre la structure chimique proposée pour M5, on peut voir que le cycle trifluorométhyle substitué est non modifié, le cycle monofluoro substitué par un hydroxy.

Cependant, il n'est pas possible d'assurer une position précise ni pour le groupe sulfate ni pour l'hydroxyle.

Conclusions partielles :

- La variation de la concentration de Bicalutamide dans l'urine et les fèces a été déterminée après l'administration orale de 100 mg de Bicalutamide. Dans les deux matrices, on a observé une augmentation rapide, atteignant un maximum au jour 1 (13,15 ng/mL dans l'urine et 1 254,11 ng/g dans les fèces) et une lente diminution de la concentration jusqu'au jour 7 (0,72 ng/mL dans l'urine et 52,90 ng/g dans les fèces).

- Ces données appuient l'utilisation de l'urine et des matières fécales comme matrices utiles pour le contrôle de ce médicament et probablement pour d'autres SARMS dérivés de l'arylpropionamide dans les pratiques d'élevage.

- Les deux matrices étudiées présentaient des métabolites issus des réactions de phase I et de phase II. Les métabolites trouvés provenaient de réactions d'hydroxylation et de conjugaison. Certains métabolites trouvés ont déjà été décrits dans des essais in vivo chez les humains et les animaux de laboratoire (rat, chien, lapin et souris).

- Les métabolites trouvés peuvent s'expliquer par les réactions décrites pour d'autres SARMS dérivés de l'APA.

- La plus grande variété de métabolites a été trouvée dans l'urine, dont les pics ont été observés dans les 48 heures suivant l'administration du médicament. Seul le M4 (dérivé de sulfate) a atteint son maximum le troisième jour, tant pour l'urine que pour les matières fécales. Après le 4e jour, les métabolites sont proches de 10 % de l'intensité maximale, sauf le Bicalutamide, le M1b, le M2b et le M2c qui restent au-dessus (dans l'urine).

- D'après les résultats de la réponse du spectromètre de masse et la fenêtre de temps de 7 jours, le contrôle analytique du Bicalutamide devrait être effectué en suivant dans l'urine M2, M5 et M3 ; dans les fèces M3. Cependant, le Bicalutamide non modifié est le meilleur candidat puisqu'en plus de présenter un signal élevé dans le détecteur et de demeurer détectable jusqu'à la fin de l'essai, il est possible de le quantifier étant donné la disponibilité d'un modèle commercial accessible.

- Ce travail constitue la première étude sur l'élimination du Bicalutamide chez les bovins, la première à proposer les fèces comme matrice d'analyse et la première à décrire la présence de M4 et M5.

Étape 3 : Deuxième test sur les animaux.

Cette partie de l'étude a été menée à la Station Expérimentale Agricole Anguil (Estación Experimental Agrícola – INTA, Argentine).

Administration de la dose et prélèvement d'échantillons.

Dans cet essai, nous avons travaillé avec 3 porcs, de la race Chetapuy (femelles) et 6 Angus (Figure 16), comme le montre le Tableau 5. Les animaux étaient en bonne santé et l'ensemble de l'essai a été réalisé sous contrôle vétérinaire. Les procédures d'échantillonnage basées sur le Manuel de l'OIE [51] ont été réalisées par les vétérinaires de la Estación Experimental Agropecuaria Anguil (INTA Anguil).

Tableau 5 : Administration de doses orales chez les bovins et les porcs

CDX : Casodex[®] ; ET : Andarine ; CTR : Contrôle (Pas de dose).

N°	Poids (kg)	Traitement	Dose	Animal
379	320	CDX	50 mg pendant 5 jours	Bovin
421	340	CDX	200 mg	Bovin
404	336	CTR	-	Bovin
323	329	CTR	-	Bovin
326	306	CTR	-	Bovin
443	338	CDX	100 mg	Bovin
334	108	CDX	100	Porc
330	103	AND	100	Porc
329	95	CTR	-	Porc



Figure 16 : Bouvillons (Angus) traités avec des doses de Casodex[®].

Administration des doses

Une quantité suffisante de médicaments a été dissoute dans de l'éthanol, puis on a ajouté quatre fois le volume de jus de pomme commercial naturel (Tableau 6). La dose diluée avec du jus de pomme a été administrée à chaque animal à l'aide de seringues de 50 mL.

Pour le groupe témoin, 50 mL du mélange d'éthanol et de jus de pomme naturel ont été administrés pendant 5 jours dans le rapport 10 mL d'éthanol + 40 mL de jus de pomme.

Le Tableau 6 présente les détails des poids et des volumes utilisés dans la préparation des doses.

Tableau 6. Détails des poids et des volumes utilisés dans la préparation des doses.

CDX (mg)	AND (mg)	Ethanol (mL)	Jus de pomme (mL)
50	-	10	40
200	-	40	160
-	-	10	40
-	-	10	40
-	-	10	40
100	-	20	80
100	-	20	80
-	100	20	80

Échantillonnage

Des échantillons d'urine, de fèces et de sang ont été prélevés avant et après l'administration des doses (jour 0), comme le montre le Tableau 7.

L'échantillonnage a été amorcé 3 jours avant l'administration de la dose et consistait à prélever de l'urine, des fèces et du sérum, comme l'indique le Tableau 7. Des échantillons supplémentaires ont été prélevés le jour 0 (4 et 8 heures après l'administration de la dose).

L'urine et les fèces ont été conservées (-20°C) jusqu'à leur traitement. Le sang a été incubé à 25°C pendant 1 heure, puis centrifugé et enfin le sérum a été séparé et conservé à -20°C.

Tableau 7. Diagramme de l'échantillonnage effectué.

Jour	bovin			Porcs		
	Sang	Fèces	Urine	Sang	Fèces	Urine
-3	X	X	X	X	X	X
-2	X	X	X	X	X	X
-1	X	X	X	X	X	X
0	X	X	X	X	X	X
0,17	X	X	X	X	X	X
0,33	X	X	X	X	X	X
1	X	X	X	X	X	X
2	X	X	X	X	X	X
3	X	X	X	X	X	X
4	X	X	X	X	X	X
5	X	X	X	X	X	X
6	X	X	X	X	X	X
7	X	X	X	No	No	no
8	no	No	no	X	X	X
9	X	X	X	No	No	no
10	no	No	no	X	X	X
11	X	X	X	No	No	no

Étape 4 : Détermination des concentrations de SARMS

Ajustement de la méthode d'analyse du laboratoire

Dans le Laboratoire de Contaminants Chimiques (Institut de Technologie Alimentaire – INTA, Argentina).

Matériaux et méthodes

Chromatographie

Le système chromatographique utilisé était l'UPLC par Acquity (Waters, Milford, MA, USA) avec une colonne C18 XBridge (2,1 x 100 mm ; 3,5 µm) et une phase mobile (0,25 mL/min) constituée d'un gradient de solution A (eau avec 0,1 % d'acide formique) et de solution B (acétonitrile/méthanol, 50 % v/v, avec 0,1 % d'acide formique). Un détecteur équipé d'une ionisation par électrospray et d'un seul analyseur quadripolaire (SQD, Waters, Milford, MA, USA) a été utilisé pour l'analyse par spectrométrie de masse. Le logiciel MassLynx 4.0 (Waters, Milford, MA, USA) a été utilisé pour l'acquisition et la manipulation des données chromatographiques et spectrométriques.

Le gradient appliqué consistait en 90 % A (de 0 à 1 min), 90 à 65 % A (de 1 à 2 min), 65 à 45 % A (de 2 à 11 min), 45 à 0 % A (de 11 à 11,5 min) et en maintenant 0 % jusqu'à 12,5 min ; retour à la concentration initiale (de 12,5 à 13 min) et maintien de 90 % A entre 13 et 15 min. Le volume de l'injection était de 10 µL. La température des échantillons a été maintenue à 20 °C et celle de la colonne à 55 °C.

Évaluation de la méthode

A ce stade des travaux, une nouvelle validation est effectuée pour vérifier que la méthode développée en France est correctement appliquée et que l'équipement instrumental fonctionne correctement.

La méthodologie appliquée a été évaluée par des paramètres objectifs, obtenus à partir du cadre juridique européen pour le contrôle des denrées alimentaires (décision 2002/657/CE). Les essais réalisés visaient à déterminer la sélectivité, la linéarité, l'exactitude, la précision et la sensibilité.

Des courbes d'étalonnage ont été construites pour chaque analyte en utilisant le rapport signal (S) surface de chaque analyte par rapport à l'étalon interne (S= analyte/ISTD) en fonction de sa concentration.

Différentes courbes d'étalonnage ont été établies pour couvrir les plages suivantes : pour l'urine 0,5 - 200 ng/mL, pour les fèces 2 - 3500 ng/g et pour le sérum 2 - 3000 ng/mL.

Résultats

Évaluation des méthodes

Les courbes de calibrage et les échantillons ont été traités en même temps. La linéarité des courbes a été calculée pour chaque lot d'échantillons analysés. Le Tableau 8 présente les paramètres utilisés pour l'identification et la quantification du SARM.

Tableau 8 : Paramètres de spectrométrie de masse utilisés pour l'identification et la quantification du SARMs (2e essai).

Données chromatographiques (mode de surveillance d'un seul ion) utilisées pour l'identification d'Andarine, du Bicalutamide et de l'Hydroxyflutamide (Q) Ion de quantification, (q) Ion de qualification.

RT (min)	Compound	Ions	Cone (V)
8,01	Hydroxyflutamide	291,1 (Q)	40
		205,0 (q)	
8,6	Andarine	261,0 (q)	40
		440,1 (Q)	
9,2	Bicalutamide	429,1 (q)	60
		255,1 (Q)	

Le Tableau 9 présente les résultats obtenus à partir de l'évaluation des méthodologies appliquées à cette étape de l'étude.

Tableau 9. Paramètres analytiques obtenus par évaluer la fiabilité de la méthode appliquée

Urine		
	Bicalutamide	Andarine
a	0,0626	0,0099
b	-0,5630	-2,6763
r²	0,9987 ± 0,0018	0,9988 ± 0,0014
R %	84,3 – 112,1	80,4 – 108,8
RSD %	5 - 9,9	5,5 - 9,1
Fèces		
	Bicalutamide	Andarine
a	0,0548	0,0076
b	1,2819	0,1190
r²	0,9914 ± 0,0083	0,9993 ± 0,0008
R %	86,7 - 110,8	82,1 - 108,1
RSD %	5,6 – 12	5,2 - 13,2
Serum		
	Bicalutamide	Andarine
a	0,0022	0,0016
b	-0,0037	0,0278
r²	0,9994 ± 0,0023	0,9986 ± 0,0013
R %	82,7 - 110,5	86,5 - 109,4
RSD %	5,1 - 10,3	2,5 - 10,7

Les paramètres obtenus pour l'étude étaient satisfaisants dans tous les cas, dans une large gamme de concentrations testées (urine : 0,5 - 200 ng/mL ; fèces : 2 - 3500 ng/g ; sérum : 2 - 3000 ng/mL), pour le Bicalutamide et l'Andarine :

- *Coefficients de détermination (r^2) supérieurs à 0,98
- *Recouvrement entre 70 % et 120 %
- *Coefficients de variation inférieurs à 20 % (RSD %)
- *Aucune interférence n'a été observée dans les 3 matrices étudiées.

La Figure 17 présente des chromatogrammes SIM (Single Ion Monitoring) montrant la comparaison de solutions étalons (5 ng/mL), d'échantillons blancs et d'échantillons enrichis (urine : 0,5 ng/mL, fèces : 2 ng/g, sérum : 2 ng/mL).

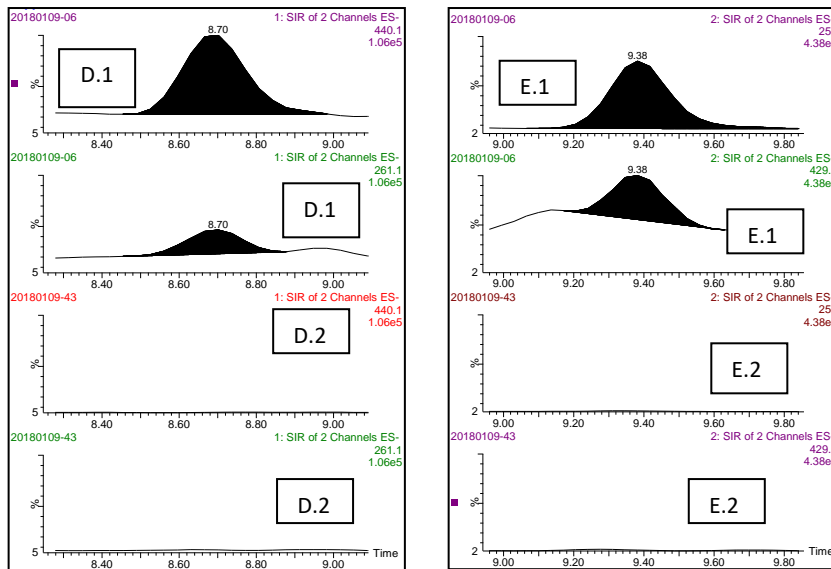
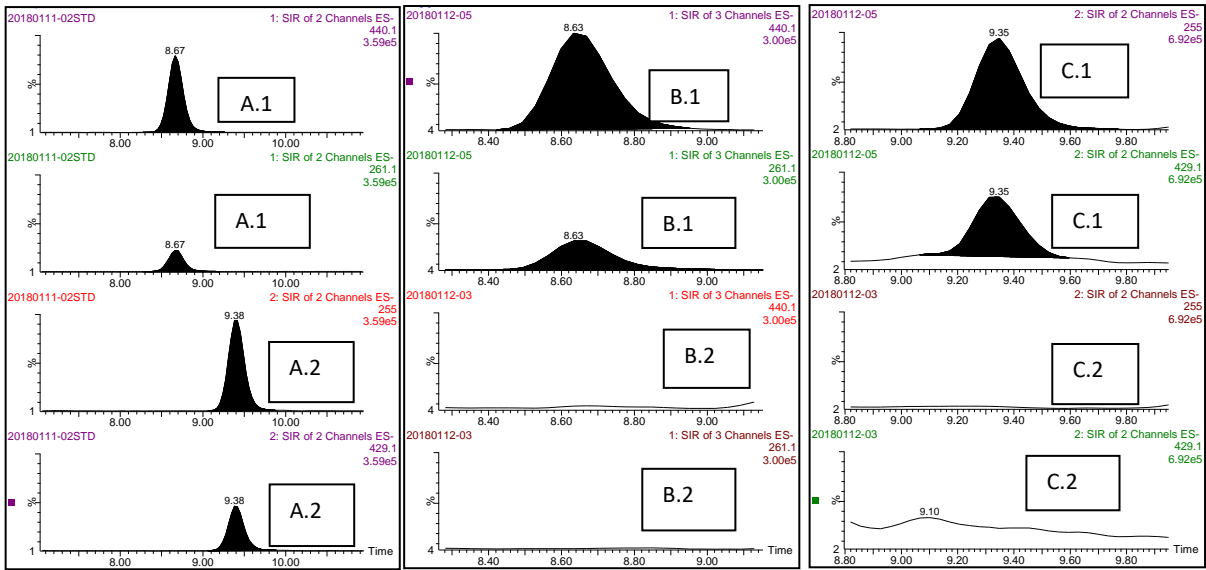
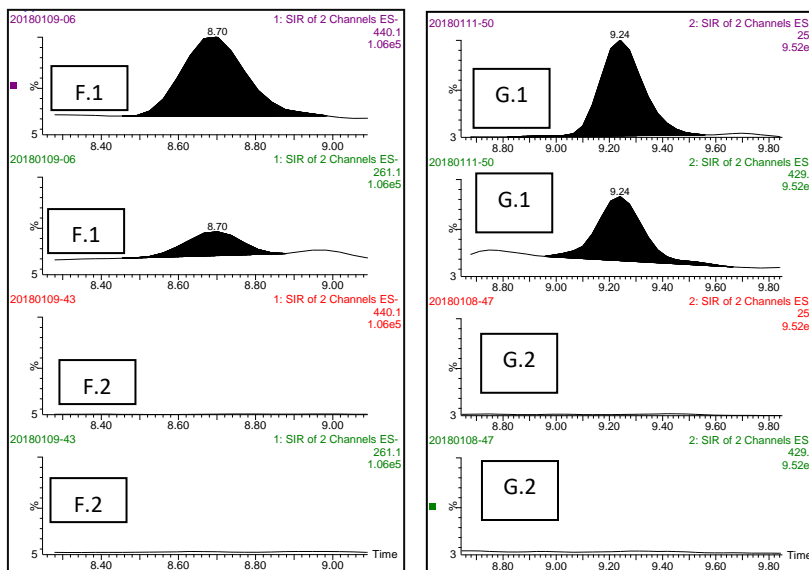


Figure 17. Chromatogrammes SIM : de la solution étalon, du blanc et des échantillons fortifiés.
 (A.1) Andarine, (A.2) Bicalutamide ; dans l'urine blanche (B.2) et l'urine enrichie en Andarine (B.1) ;
 l'urine blanche (C.2) et l'urine enrichie en Bicalutamide (C.1) ; les fèces blanches (D.2) et les fèces
 enrichies en andarine (D.1) ; les fèces blanches (E.2) et les fèces enrichies en Bicalutamide (E.1) ; le sérum
 blanc (F.2) et le sérum enrichi en andarine (F.1) ; le sérum blanc (G.2) et le sérum enrichi en Bicalutamide
 (G.1).

(Figure 17. Continué : Chromatogrammes SIM)



Analyse d'échantillons provenant d'animaux traités

Après l'identification et la quantification du SARM, les concentrations obtenues ont été tracées pour observer les variations dans le temps et déterminer les fenêtres temporelles. Les résultats pour le Bicalutamide urinaire sont présentés à les Figures 18 ; pour les fèces à les Figures 19 ; pour le sérum à les Figures 20 et les résultats pour Andarine chez le porc traité à la Figure 21. Dans ces Figures, on peut voir les concentrations résultant de la détermination directe du SARMS dans les échantillons (médicament libre) et les concentrations obtenues après hydrolyse enzymatique (médicament total, libre + libéré).

Figure 18. Concentrations de Bicalutamide dans l'urine.

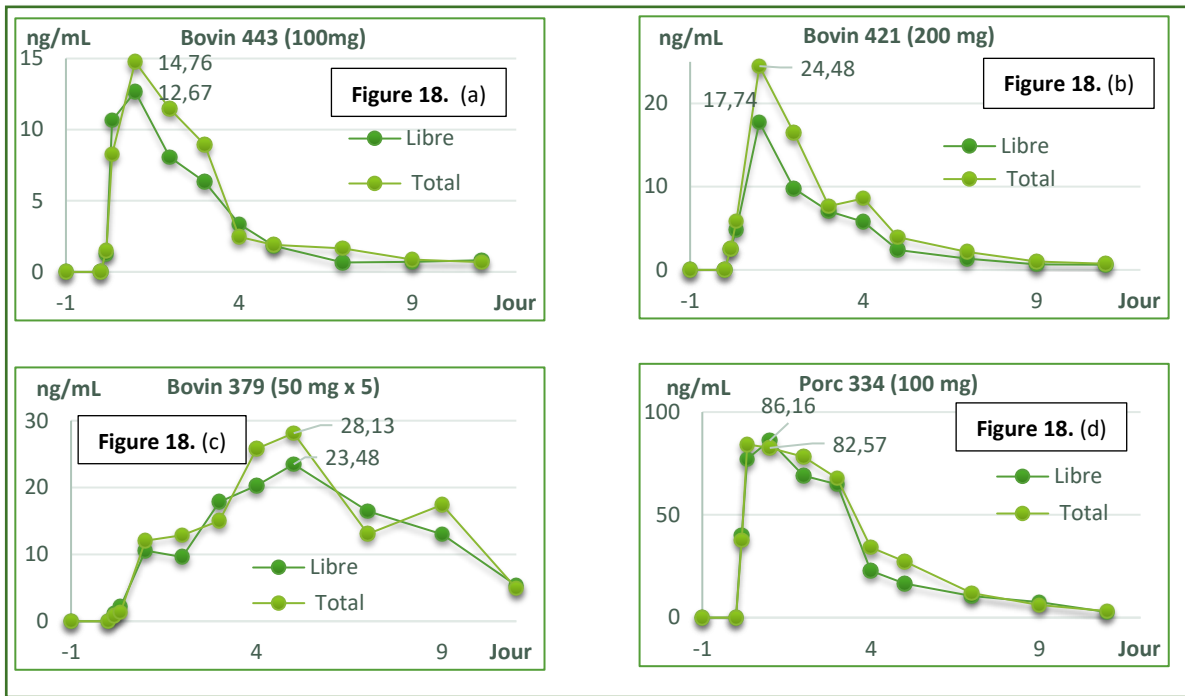


Figure 19. Concentrations de Bicalutamide dans les fèces.

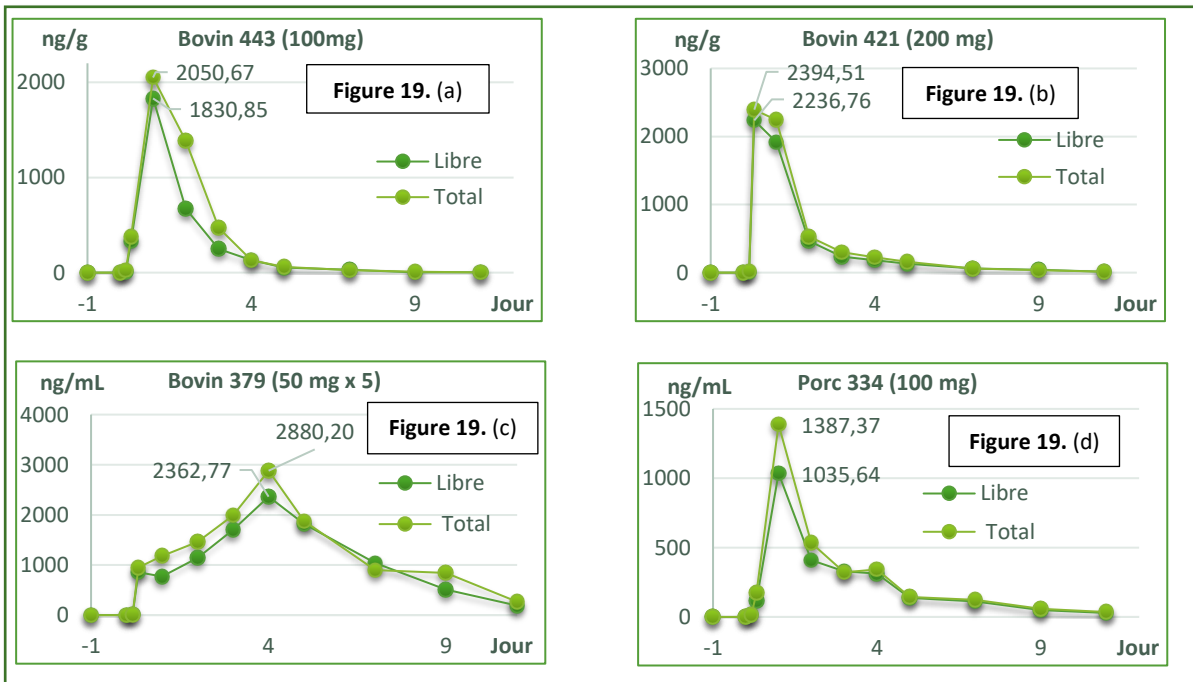


Figure 20. Concentrations sériques de Bicalutamide.

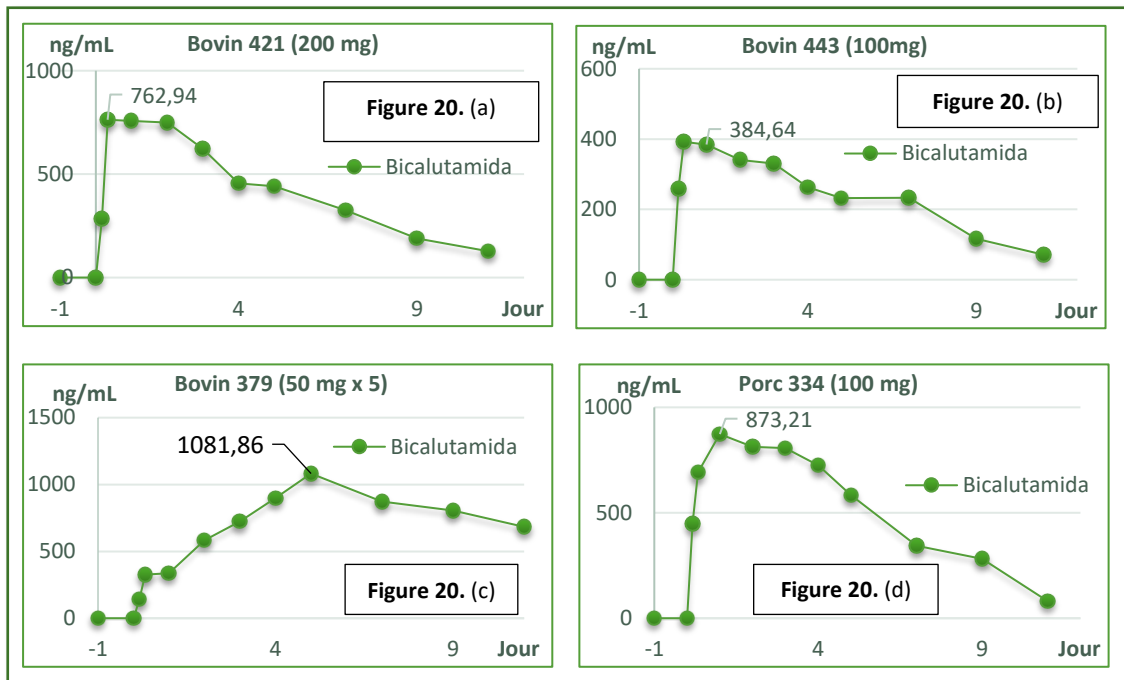
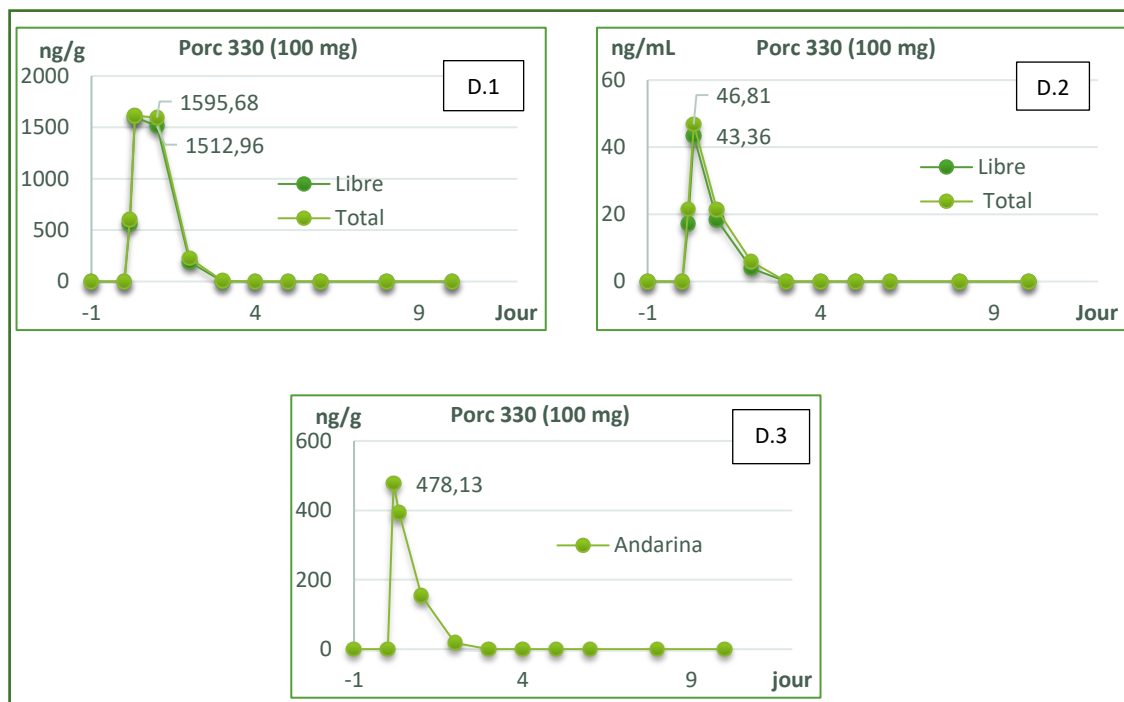


Figure 21. Concentrations d'Andarine dans l'urine (D.1), les fèces (D.2) et le sérum (D.3).



Conclusions partielles :

- Une méthode rapide a été développée pour le dosage du Bicalutamide et d'Andarine dans le sérum, montrant des résultats satisfaisants de précision, d'exactitude et de linéarité. La méthode permet un flux de travail élevé et est idéale pour les analyses de routine. Sa limite de quantification était de 2 ng/mL.

- La variation de la concentration sérique de Bicalutamide, après l'administration d'une dose orale, a été établie : elle présente un maximum à 24 heures suivi d'une lente diminution avec des concentrations détectables jusqu'au dernier jour de l'essai chez les porcs (jour 10) et les bovins (jour 11).

- Chez le porc, Andarine présente un maximum sérique (478,1 ng/mL) entre 4 et 8 h et une diminution rapide ne montrant aucun résultat détectable au jour 3.

Étape 5 : Étude des métabolites du SARM

Cette étape des travaux a été réalisée avec la collaboration du personnel et de l'équipement du Laboratoire INTA - Concordia (Entre Ríos, Argentine).

Matériaux et méthodes

Instrumentation

Le système chromatographique utilisé était l'Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) avec une colonne Acquity UPLC® BEH (2,1x100 mm ; 1,7 µm) et une phase mobile (0,45 mL/min) constituée d'un gradient de solution A (eau avec 0,1 % d'acide formique) et de solution B (acétonitrile avec 0,1 % d'acide formique). Un détecteur équipé d'une ionisation par électrospray et d'un analyseur quadripolaire triple (XEVO TQ-D, Waters, Milford, MA, USA) a été utilisé pour l'analyse par spectrométrie de masse. Le logiciel MassLynx 4.0 (Waters, Milford, MA, USA) a été utilisé pour l'acquisition et la manipulation des données chromatographiques et spectrométriques.

Dans le deuxième essai animal, la recherche de métabolites a également été effectuée selon la stratégie décrite dans le premier essai animal. Pour les animaux traités avec Casodex®, la recherche de métabolites a été simplifiée en ayant les fragments caractéristiques (m/z : 159 ; m/z : 255 ; m/z : 173 ; m/z : 185 et m/z : 411). Dans le cas des porcs traités par Andarine, les fragments caractéristiques ont d'abord été établis (m/z : 150 ; m/z : 205 ; m/z : 289 ; m/z : 259 ; m/z : 108 et m/z : 261), puis les analyses ont été effectuées en mode SCAN et SRM comme décrit.

L'application des méthodes développées dans la première étape de cette étude (Figure 6 et Figure 7, page 21).

Résultats

Métabolites de Bicalutamide

Après avoir administré Casodex® (CDX) à des bovins et à un porc (Tableau 5 ; page 34), on a analysé des échantillons d'urine et de fèces pour identifier les métabolites. Les résultats obtenus par hydrolyse enzymatique, qui révèlent la présence de métabolites conjugués, sont présentés aux Figures 18 et 19.

Le Tableau 10 indique les ions pertinents trouvés en mode SCAN et les réactions confirmées en mode SRM sont marquées d'un astérisque. L'information contenue dans ce tableau montre que les métabolites trouvés sont les mêmes que ceux trouvés précédemment, comme le décrit le Tableau 4 (*Étude des Métabolites* ; page 30). Pour cette raison, ils ont reçu la même notation : M1, M2, M3, M4 et M5.

Tableau 10 : Métabolites du Bicalutamide trouvés chez les bovins traités par Casodex®.
Résultats de l'étude MS en mode Scan et en mode SRM.

	M1	M2	M3	M4	M5
[M-H]	605	621	445	509	525
Ions (m/z)	587	603	427	411	507
	543	445	185*	173*	445*
	429	427	255*	185*	427
	411*	185*	189*	255*	255*
	193*	255*			185*
	185	175			175
	255	271			
	159*	173			
		159			

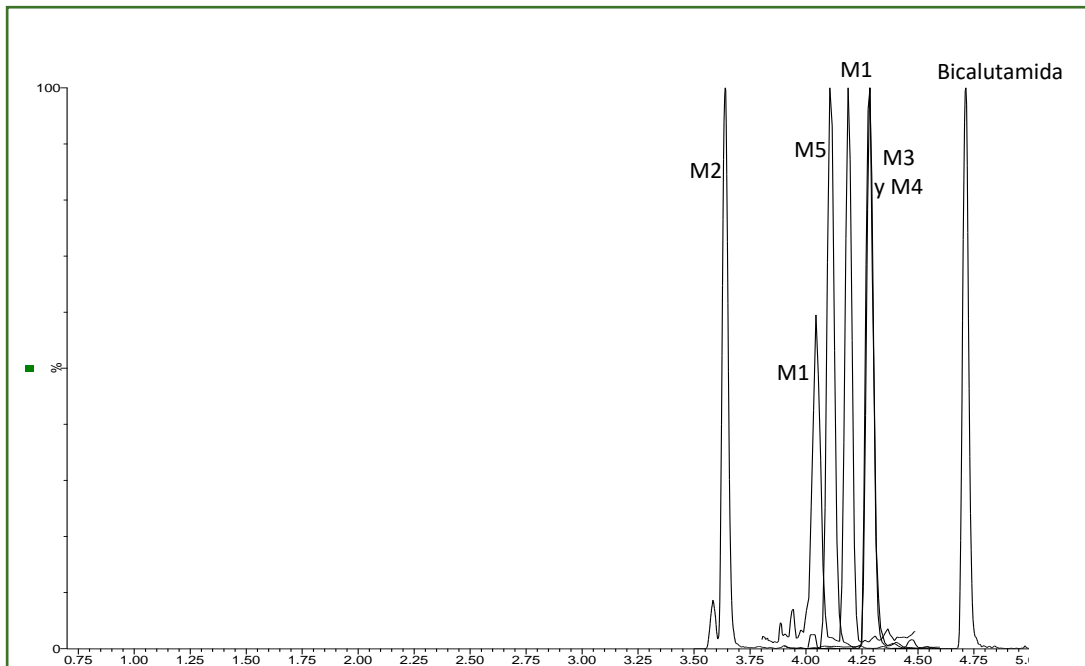


Figure 22. Chromatogramme composite de bovin avec une dose de Casodex de 200 mg.
Les signaux correspondent à SRM : M1 : 605>411 ; M2 : 621>255 ; M3 : 445> 255 ; M4 : 509>255 ; M5 : 525>255 Bicalutamida : 429,1>255,1

La Figure 22 présente un chromatogramme composite construit à partir des résultats obtenus chez des bovins traités par 200 mg de Casodex®. Dans l'ordre d'apparition on peut voir 2 pics correspondant à M2, le plus grand à 3,64 min ; un premier pic de M1 à 4,04 min ; puis un pic de M5 (4,11 min) ; un autre pic de M1 (4,19 min) ; les pics de M3 et M4 sortent ensemble à 4,29 min et enfin le Bicalutamide (4,71 min).

En comparant les chromatogrammes composites de la Figure 10 avec ceux de la Figure 22, on observe des différences dans tous les temps de rétention des pics, ce qui est dû au fait que le système chromatographique utilisé à l'INTA - Concordia était différent de celui utilisé à LabERCA (Nantes).

Tableau 11 : Métabolites du Bicalutamide chez les porcs traités par Casodex®.
Résultats de l'étude sur la MS en mode SCAN et en mode SRM.

	M1	M2	M3	M4
[M-H]	605	621	445	509
Ions (m/z)	587	603	427	411
	561	445	409	185*
	543	365	185*	255*
	429	185*	255*	
	411*	255*	189*	
	185	175		
	255	189		
		271		
		173		
		159		

Une autre différence est l'absence des métabolites M2c et M2d dans le chromatogramme de la Figure 22. Une explication pourrait être que ces animaux ne produisent pas les métabolites M2 absents, ce qui pourrait être dû aux différences entre les espèces en raison de l'existence d'isoformes différentes de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme du SARM [52]. Une autre explication pourrait être, comme mentionné ci-dessus, en changeant le système chromatographique nous pouvons supposer que notre méthode/instruments appliqués dans cet essai ne sont pas capables de les détecter à la faible concentration à laquelle ils ont été produits. Une autre explication serait que les substances administrées dans les deux cas (Casodex®) étaient des produits commerciaux et pouvaient présenter des différences minimales dans leur composition, car bien qu'elles aient été fabriquées par le même fabricant, elles ont été achetées dans des pays et des années différents. L'absence ou la production minimale de

M2c ou de M2d chez les animaux traités, pourrait être la cause la plus probable car les tests effectués étaient soumis à une grande variabilité biologique (race, état physiologique, âge, etc.). Enfin, la combinaison de toutes les causes susmentionnées ne peut pas non plus être exclue comme autre explication.

Le Tableau 11 présente les ions trouvés dans les échantillons de porcs après l'analyse des informations obtenues en mode SCAN et en mode SRM, avec un astérisque soulignant les ions (m/z) qui sont utilisés pour la confirmation des métabolites. Comparativement aux résultats précédents obtenus chez les bovins dans le cadre de cette étude (Tableau 4 et Tableau 10), l'absence de M5 et d'autres métabolites se démarque.

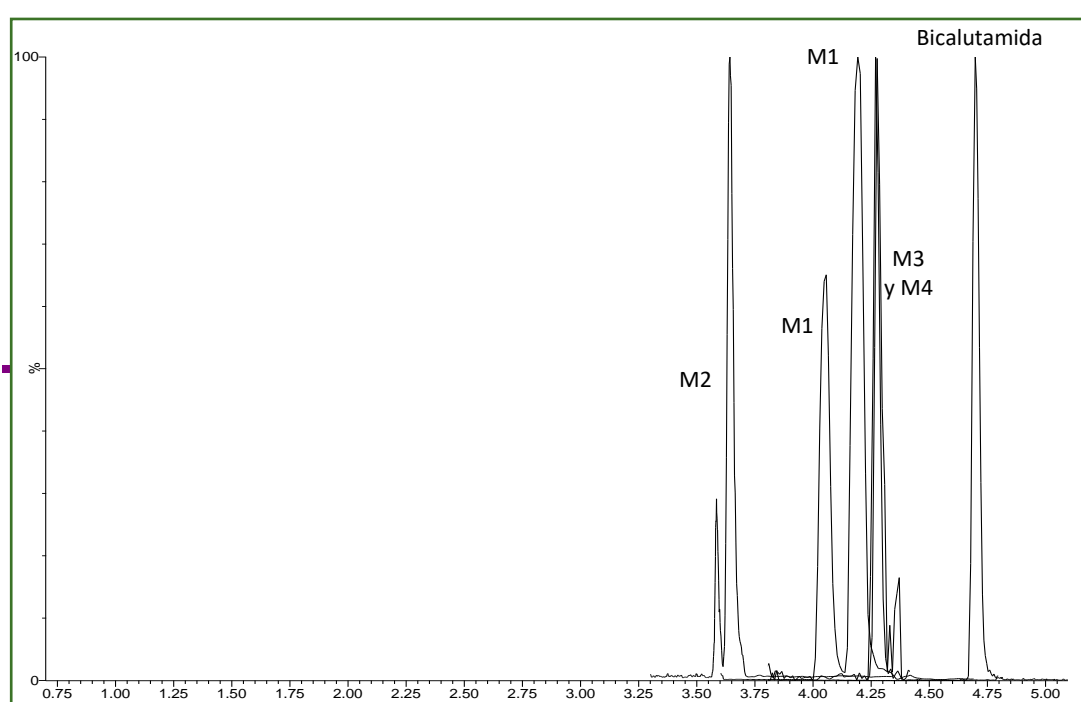


Figure 23. Chromatogramme composé d'échantillons d'urine et de fèces provenant de porcs traités avec Casodex®.

(M1 : 605>411 ; M2 : 621>255 ; M3 : 445> 255 ; M4 : 509>255 et Bicalutamida : 429>255).

La Figure 23 présente un chromatogramme composite correspondant aux échantillons d'urine et de fèces des porcs traités au Casodex®. Cette Figure a été construite avec des SRM qui confirment la présence des métabolites M1, M2, M3, M4 et du Bicalutamida. Comme prévu, ce chromatogramme montre des temps de rétention semblables à ceux des métabolites chez les bovins traités par Casodex®. Dans l'ordre d'apparition, on peut voir : M2 avec deux pics et le plus grand à 3,65 min ; deux pics correspondant à M1 (4,04 min et 4,19 min) ; là encore M3 et M4 ont une élution presque simultanée (4,3 min).

Métabolites d'Andarine chez le porc

Le Tableau 12 indique les ions mis en évidence pour l'identification de chacun des métabolites trouvés et les ions confirmés par SRM et MRM sont marqués d'un astérisque.

Tableau 12. Métabolites d'andarine trouvés chez les porcs.

	DM1	DM2	DM3	DM4	DM5	DM6	DM7	DM8	DM9	DM10	DM11	DM12
M-H	205	221	301	307	397	398	410	426	590	483	616	494
Iones (m/z)	175*	190*	221*	205*	221*	261*	150*	261*	572*	205*	465*	414*
	159*	175*	190*	234*	171*	205*	175	289*	261*	277*	205	289*
	155*	171*	171*	175*	205	175*	221	205	175	205	150*	261*
			155*	155		171		175	205	171	440*	205*
				277							261	175
											289	221

Au Tableau 12, on retrouve 12 métabolites d'Andarine, ce qui marque une grande différence avec le Bicalutamide qui ne présentait que 4 métabolites chez le porc (Tableau 11, page 47). Ce résultat indiquerait le métabolisme intense dont souffre le médicament chez le porc, tel que décrit dans les travaux antérieurs d'autres auteurs et mis en évidence dans le présent travail par la courte période de détection (48 h) [53] [54].

La Figure 24 montre un chromatogramme composite correspondant aux échantillons du porc traité. La Figure est construite avec les SRM des 12 métabolites identifiés comme " DM " (DM1 à DM12). Par ordre d'apparition, le pic de DM9 peut être vu à 2,42 minutes ; DM5 à 3,05 minutes ; à 3,37 minutes simultanément trois pics correspondant à DM7, DM3 et DM2 ; le pic de DM6 (3,56 minutes) et le pic de DM10 (3,58 minutes) sont très proches ; les pics de DM1 et DM4 sont ensemble à 3,84 min ; ensemble aussi les pics de DM12 et DM11 à 3,94 min ; le pic d'Andarine est à 4,50 min et très proche est le pic de DM8 (4,51 min). La présence des métabolites trouvés a déjà été décrite dans d'autres études in vitro et in vivo [34, 35, 39, 43, 55].

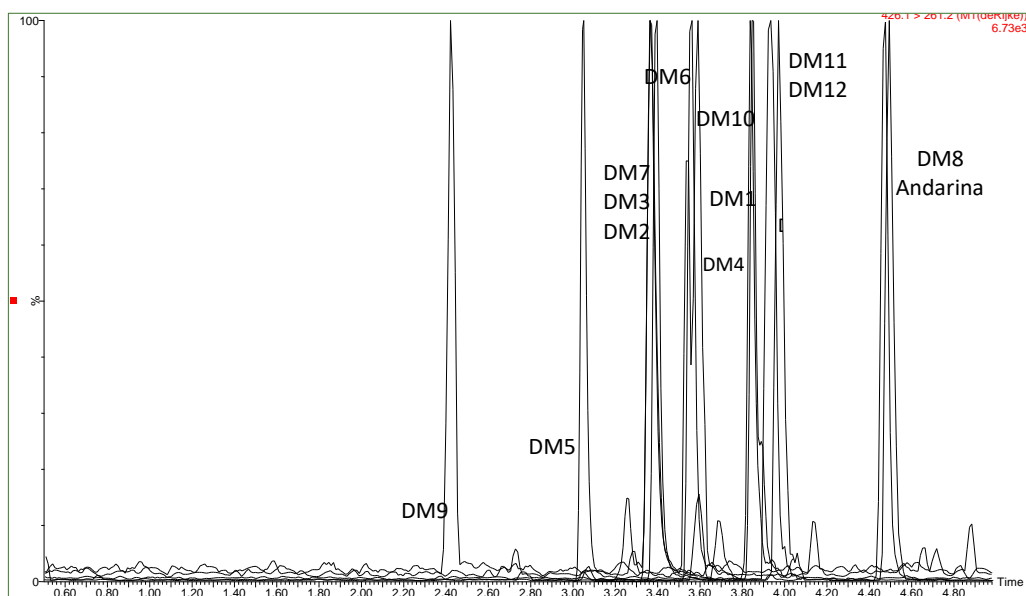


Figure 24. Chromatogramme composé correspondant aux échantillons d'urine et de fèces de porcs traités par Andarine

(DM1 : 205>175 ; DM2 : 221>175 ; DM3 : 301>221 ; DM4 : 307>205 ; DM5 : 397>221 ; DM6 : 398,1>205 ; DM7 : 410,1>150 ; DM8 : 426,1>261,2 ; DM9 : 590>261 ; DM10 : 483,1>205 ; DM11 : 616,1>440,1 ; DM12 : 494>414,1 et Andarine : 440,1>261)

DM1 : La Figure 25 montre la structure chimique proposée, en accord avec les études précédentes [43].

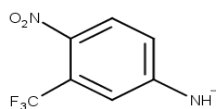


Figure 25. DM1 (m/z = 205).

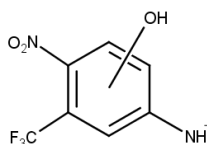


Figure 26. DM2 (m/z = 221).

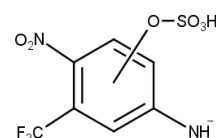


Figure 27. DM3 (m/z = 301).

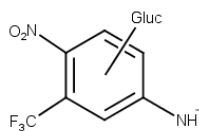


Figure 28. DM5 (m/z : 397).

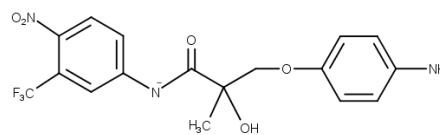


Figure 29. DM6 (m/z : 398).

DM2 : Cela correspondrait à la forme hydroxylée de la DM1. La Figure 26 montre la structure chimique probable. Ce métabolite a déjà été signalé dans l'urine de chevaux traités à l'Andarine [43].

DM3 : correspondrait au dérivé sulfate-conjugué de la DM1. La Figure 27 montre la structure chimique probable correspondant au DM3. Ce métabolite a déjà été signalé dans l'urine de chevaux traités à l'Andarine [43].

DM4 : Le temps de rétention et les fragments de ce métabolite sont conformes à un métabolite décrit dans des travaux antérieurs [34-36, 39, 55]. Comme dans les travaux précédents, dans celui-ci on ne peut pas proposer une structure à cause de sa taille ($m/z = 307$) ; ce pourrait être l'Andarine sans le groupe phényle, mais les fragments ($m/z = 234$; $m/z = 205$; $m/z = 175$) observés avec la spectrométrie de masse ne sont pas en accord avec la structure d'Andarine sans le groupe phényle.

DM5 : Ce métabolite a déjà été signalé dans l'urine de chevaux traités à l'Andarine [43]. La Figure 28 montre une structure probable du DM5.

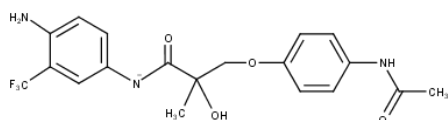


Figure 30. DM7 (m/z : 410).

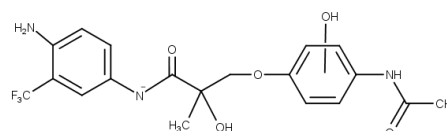


Figure 31. DM8 (m/z : 426).

DM6 : La Figure 29 montre la structure chimique probable correspondant à la DM3. [39].

DM7 : La structure proposée est présentée à la Figure 30. Ce métabolite a déjà été signalé dans l'urine de chevaux traités à l'Andarine [43].

DM8 : Ce métabolite correspondrait à la DM7 hydroxylée. La Figure 31 montre la structure chimique probable correspondant au DM8. Ce métabolite a été signalé lors d'un test in vitro incubant Andarine dans un système enzymatique qui reproduirait les conditions d'un organisme vivant [36].

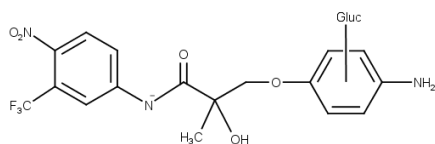


Figure 32. DM9 (m/z : 590).

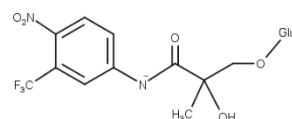


Figure 33. DM10 (m/z : 483).

DM9 : La Figure 32 montre la structure chimique probable correspondant à la DM9. Ce métabolite a été signalé dans un test in vitro incubant l'Andarine dans un système enzymatique qui reproduirait les conditions d'un organisme vivant [39].

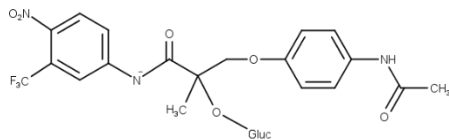


Figure 34. DM11 (m/z: 616)

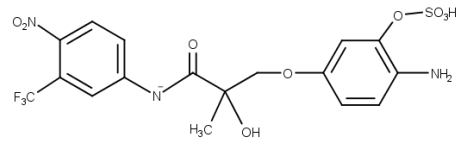


Figure 35. DM12 (m/z: 494).

DM10 : La structure chimique proposée de ce métabolite est illustrée à la Figure 33. Cependant, ce n'est pas la seule possibilité. Ce métabolite a été signalé dans un test in vitro incubant l'Andarine dans un système enzymatique qui reproduirait les conditions d'un organisme vivant [39].

La présence de DM10 est décrite dans des travaux antérieurs qui indiquent également la présence du métabolite correspondant à son aglycone (m/z : 307) [39]. Les explications peuvent être plusieurs ou des combinaisons de celles-ci, car il pourrait ne pas être détectable par la faible concentration de m/z : 307, aussi il pourrait arriver que les conditions du détecteur de masse ne favorisent pas l'acquisition de la charge électrique du fragment [56] ou par l'effet de suppression ionique [57] m/z n'est pas détecté : 307.

DM11 : La Figure 34 montre la structure chimique probable correspondant au DM11. Ce métabolite a été signalé dans un test in vitro incubant l'Andarine dans un système enzymatique qui reproduirait les conditions d'un organisme vivant [39].

DM12 : La Figure 35 montre la structure chimique probable correspondant au DM12. Ce métabolite a été signalé dans un test in vitro incubant Andarine dans un système enzymatique qui reproduirait les conditions d'un organisme vivant [39].

L'apparition d'Andarine et de ses métabolites dans les excréments du porc traité indique son absorption intestinale. L'apparition de 12 métabolites montre un métabolisme intense chez les porcs ainsi que chez les animaux de laboratoire et les chevaux [43, 54].

Conclusions partielles :

- Une méthode rapide a été développée pour le dosage du Bicalutamide et d'Andarine dans le sérum, montrant des résultats satisfaisants de précision, d'exactitude et de linéarité. La méthode permet un flux de travail élevé et est idéale pour les analyses de routine. Sa limite de quantification était de 2 ng/mL.

- La variation de la concentration sérique de Bicalutamide, après l'administration d'une dose orale, a été établie : elle présente un maximum à 24 heures suivi d'une lente diminution avec des concentrations détectables jusqu'au dernier jour de l'essai chez les porcs (jour 10) et les bovins (jour 11).

- Chez le porc, Andarine présente un maximum sérique (47,81 ng/mL) entre 4 et 8 h et une diminution rapide ne montrant aucun résultat détectable au jour 3.

- Le profil d'élimination fécale et urinaire a été établi pour les animaux traités par le Bicalutamide et Andarine. Les métabolites de phase I et de phase II des deux médicaments ont été trouvés dans les excréments des porcs et des bovins traités. L'information recueillie à l'aide de détecteurs de chromatographie et de spectrométrie de masse a été utilisée pour proposer des structures des métabolites trouvés pour le Bicalutamide et l'Andarine (sauf pour la DM 4).

- Les métabolites du Bicalutamide décrits pour les bovins de race Montbéliard (M1-M5) se retrouvent dans les excréments des bovins Angus. Chez le porc, on a observé l'absence du métabolite M5.

- Les porcs traités avec Casodex® ont présenté des métabolites détectables dans l'urine jusqu'au 6e jour et dans les fèces jusqu'au 8e jour.

- Les bovins traités avec Casodex® ont présenté des métabolites détectables à différentes périodes : avec 200 mg dans l'urine jusqu'au 7e jour et dans les fèces jusqu'au 9e jour ; avec 100 mg dans l'urine jusqu'au 5e jour et dans les fèces jusqu'au 7e jour (pour la race Angus ; la race Montbéliar a présenté des métabolites dans les deux matrices jusqu'au 7e jour) ; avec des doses 5 fois par jour de 50 mg dans l'urine et les fèces jusqu'au 11e jour. Cependant, chez tous les animaux, la performance du Bicalutamide (sans modification) comme " analyte marqueur " de l'administration de Casodex était meilleure, certains animaux restant plus longtemps et d'autres ayant un signal plus élevé.

- Chez le porc traité par Andarine, 12 métabolites ont été identifiés, montrant une métabolisation intense. Le profil d'élimination urinaire et fécale après l'administration orale de 100 mg a été déterminé.

- Les métabolites d'Andarine dans les excréments ont montré un maximum avant 24 h. diminuant rapidement, montrant des concentrations détectables dans l'urine et les fèces pendant 48 h. Cette courte permanence pose un grand défi analytique pour le contrôle de cette substance dans les pratiques d'élevage, dans les matrices étudiées.

Évaluation des métabolites candidats pour le contrôle des pratiques d'élevage

Dans ce travail, on a trouvé des métabolites ayant des comportements analytiques différents (intensité et durée du signal). Pour cette raison, et afin d'évaluer l'utilité de chaque métabolite, des graphiques comparatifs des *abondances relatives* (chromatographic areas) de chaque métabolite excrété ont été construits pendant tous les essais (Figure 36, Figure 37 et Figure 38). Ces graphiques visent à montrer la sensibilité de chaque métabolite en indiquant la " facilité de visualisation du pic chromatographique ", car ils génèrent une plus grande surface par rapport aux autres métabolites.

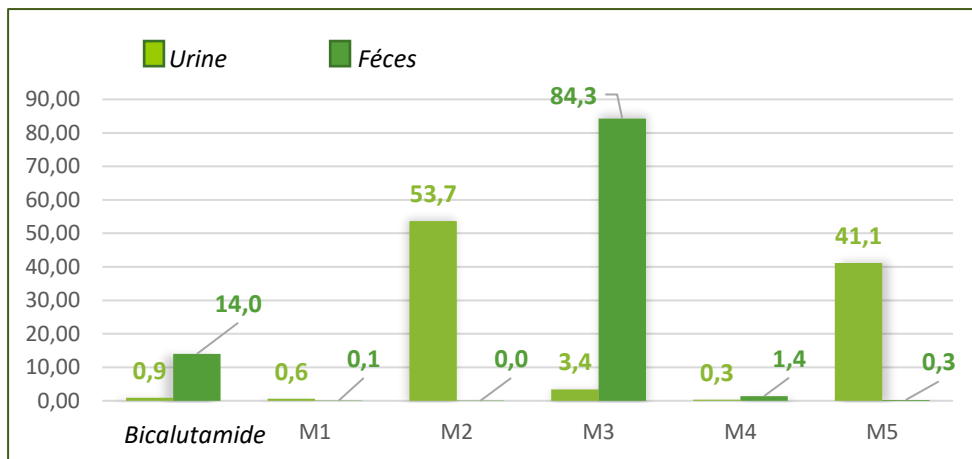


Figure 36. Abondances relatives des métabolites du Bicalutamide obtenus dans les excréments de bovins.

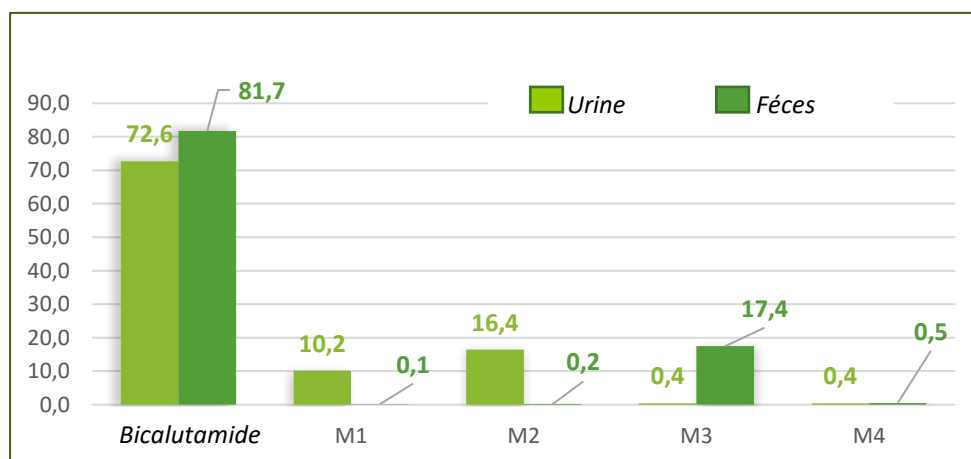


Figure 37. Abondance relative des métabolites du Bicalutamide dans les excréments de porc.

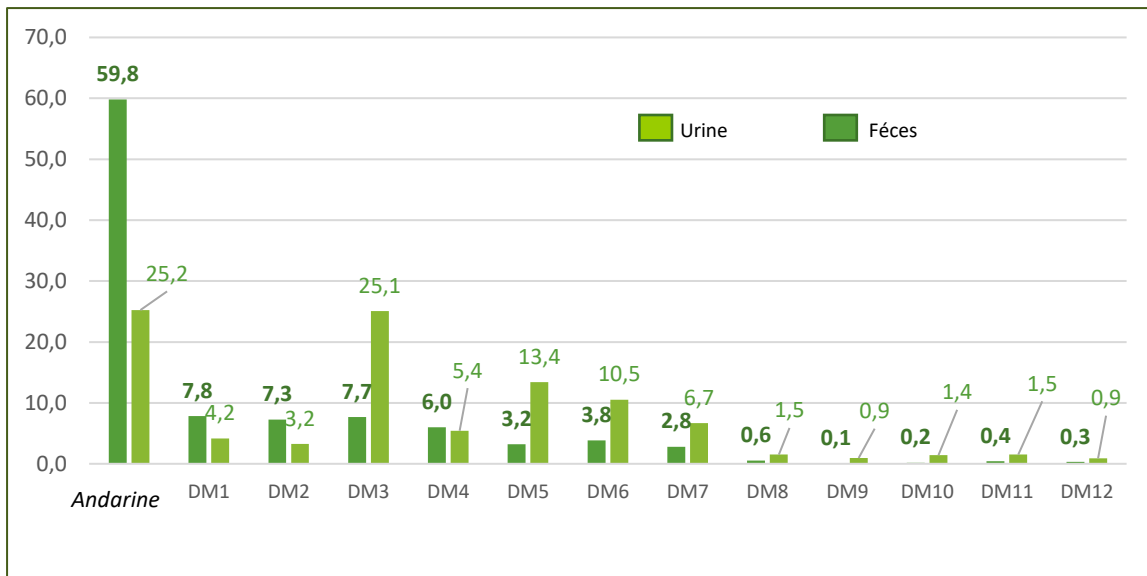


Figure 38. Abondance relative des métabolites d'Andarine dans les excréments de porc.

La Figure 36 présente les *abondances relatives* du Bicalutamide et de ses métabolites excrétés (dans les fèces et l'urine) chez les bovins traités avec différentes doses de Casodex®. Sur cette Figure, on peut constater une différence marquée entre l'abondance de certains métabolites dans l'urine et dans les fèces. Cette "excrétion différentielle" de chaque métabolite permettrait de concentrer les efforts d'analyse en fonction de la matrice prise pour le laboratoire. Il est important de le souligner puisque les doses administrées dans ce travail sont élevées et en supposant que l'abus se fasse avec des doses plus faibles, seule la recherche des métabolites les plus "détectables" pourrait faire la différence entre détecter ou non le cas. Dans le cas des matières fécales, les pourcentages de Bicalutamide (14,0 %) et de M3 (84 %) sont plus élevés. Dans les urines, la situation est différente, les plus abondantes étaient M2 (53,7 %) et M5 (41,1 %).

La Figure 37 présente les *abondances relatives* obtenues pour le Bicalutamide et ses métabolites dans les excréments des porcs traités avec Casodex®. On peut constater que le Bicalutamide est plus abondant dans les matières fécales (81,7 %) que dans l'urine (72,6 %). De plus, dans les fèces, le M3 (17,4 %) est le plus abondant ; dans l'urine, le M2 (16,4 %) et le M1 (10,2 %) prédominent. Enfin, M4 a un "début" bas.

La Figure 38 montre les *abondances relatives* d'Andarine et de ses 12 métabolites trouvés dans les excréments des porcs traités par Andarine.

Dans les fèces, on peut voir que l'Andarine (59,8%) est l'analyte le plus abondant et avec un pourcentage similaire parmi eux mais beaucoup plus faible sont la DM1 (7,8%), la DM2

(7,3%), la DM3 (7,7%) et la DM4 (6,0%). Dans l'urine, l'Andarine (25,2%) et le DM3 (25,1%) ont les plus fortes abondances ; le DM5 (13,4%) et le DM6 (10,5%) et le DM7 (6,7%) ont des abondances plus faibles, mais pourraient être utilisés à des fins de contrôle.

Conclusions partielles

- Chez les bovins traités par CasodexMD, le métabolite " le plus détectable " dans les fèces était le M3, suivi du Bicalutamide. Dans l'urine, on a utilisé le M2 et le M5.

- Dans le cas des porcs traités avec Casodex®, le Bicalutamide est plus facilement détectable dans l'urine et les fèces comme indicateur d'abus. Dans les fèces, on pourrait également surveiller le M3, tandis que dans l'urine, il serait pratique de rechercher le M1 et le M2.

- Dans le cas de porcs traités avec Andarine dans les urines et les fèces, il faut rechercher Andarine. En abondance relative dans les fèces, la DM1, la DM2 et la DM3 suivent en importance. Dans l'urine, les métabolites les plus abondants étaient la DM3, la DM5 et la DM6.

- Les matières fécales lyophilisées ont montré leur valeur comme matrice analytique pour le contrôle de l'administration du Bicalutamide et d'Andarine dans les pratiques bovines.

Conclusions générales

Ce travail constitue la première étude scientifique réalisée avec l'administration orale de Bicalutamide chez des animaux producteurs d'aliments.

Des méthodes analytiques ont été mises au point et évaluées pour l'étude d'Enobosarm, d'Andarin, de Bicalutamide et d'Hydroxyflutamide, dans l'urine et les fèces. Les méthodes ont montré les caractéristiques nécessaires à leur utilisation de routine dans les laboratoires de contrôle des aliments.

Des méthodes analytiques ont été mises au point et évaluées pour l'étude d'Andarine et du Bicalutamide dans le sérum. Obtenir de bonnes caractéristiques analytiques pour le contrôle de ces médicaments chez les porcs et les bovins.

Après l'administration orale de Casodex[®], des métabolites de phase I et de phase II ont été détectés dans les fèces et l'urine de quatre bovins et d'un porc. Il s'agit du premier travail scientifique publié qui souligne l'utilité des matières fécales comme matrice analytique valide pour le contrôle de l'utilisation du Bicalutamide dans les pratiques d'élevage.

Après l'administration orale d'Andarine, des métabolites de phase I et de phase II ont été détectés dans les fèces et l'urine d'un porc.

Les structures chimiques ont été proposées pour 16 des 17 métabolites trouvés, d'après l'information obtenue par des techniques de chromatographie liquide couplées à des détecteurs de spectrométrie de masse.

Cinq métabolites du Bicalutamide ont été observés dans les excréments des bovins traités par Casodex[®], dont deux ont été signalés pour la première fois dans le cadre de cette étude. Le profil d'excrétion des 5 métabolites (fèces et urine) a été établi pour obtenir les fenêtres temporelles respectives et l'intensité du signal a été évaluée pour les proposer comme indicateurs utiles pour le contrôle des pratiques des bovins. Ceux qui ont été sélectionnés étaient le Bicalutamide et le M3 dans les fèces ; le Bicalutamide, le M2 et le M5 dans l'urine. Dans le cas du Bicalutamide, son utilité dans l'urine a été soulignée, même si le signal n'est pas élevé puisqu'il est possible de quantifier sa concentration à l'aide d'un modèle commercial.

Dans les excréments des porcs traités avec Casodex[®], on a déterminé 4 des 5 métabolites observés chez les bovins. Les profils d'excrétion respectifs ont été déterminés. De plus, la fenêtre temporelle et l'amplitude de chaque signal ont été évaluées pour proposer les candidats suivants : dans les fèces M3 et le Bicalutamide et dans l'urine M1, M2 et le Bicalutamide.

Chez les bovins et les porcs traités avec Casodex® , la variation des concentrations sériques a également été déterminée.

La présence de 12 métabolites a été déterminée dans les excréments des porcs traités à l'Andarine. En évaluant les profils de concentration respectifs dans le temps, les fenêtres temporelles et l'intensité du signal, il a été conclu qu'il est préférable de rechercher l'Andarine dans toute matrice. Les métabolites les plus abondants trouvés dans les fèces sont la DM1, la DM2 et la DM3 ; dans l'urine, ce sont la DM3, la DM5 et la DM6.

Bibliographie

1. Waltner-Toews, D. and S.A. McEwen, *Residues of hormonal substances in foods of animal origin: a risk assessment*. Preventive Veterinary Medicine, 1994. **20**(3): p. 235-247.
2. Bischoff, F., *Carcinogenic Effects of Steroids*, in *Advances in Lipid Research*, P. Rodolfo and K. David, Editors. 1969, Elsevier. p. 165-244.
3. Gao, W., J. Kim, and J.T. Dalton, *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Nonsteroidal Androgen Receptor Ligands*. Pharmaceutical research, 2006. **23**(8): p. 1641-1658.
4. Penot, M., *Développement méthodologique pour l'étude des cinétiques et du métabolisme d'un Modulateur Spécifique des Récepteurs Androgènes : l'ENOBOSARM*, in *Chimie des Molécules Bioactives Spécialité Stratégie et Qualité en Chimie Analytique*. 2014, ONIRIS: Laboratoire d'étude des résidus et contaminants dans les aliments - Nantes - France. p. 52.
5. Kicman, A.T., *Pharmacology of anabolic steroids*. British Journal of Pharmacology, 2008. **154**(3): p. 502-521.
6. Narayanan, R., et al., *Selective androgen receptor modulators in preclinical and clinical development*. Nuclear Receptor Signaling, 2008. **6**: p. e010.
7. Dotson, J.L. and R.T. Brown, *The History of the Development of Anabolic-Androgenic Steroids*. Pediatric Clinics of North America, 2007. **54**(4): p. 761-769.
8. Clark, A.S. and L.P. Henderson, *Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids*. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2003. **27**(5): p. 413-436.
9. Handelsman, D.J., *Androgen misuse and abuse*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2011. **25**(2): p. 377-389.
10. Kanayama, G., et al., *Treatment of anabolic-androgenic steroid dependence: Emerging evidence and its implications*. Drug and Alcohol Dependence, 2010. **109**(1-3): p. 6-13.
11. Dalton, J.T., et al., *Discovery of Nonsteroidal Androgens*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998. **244**(1): p. 1-4.
12. Sydor, A.R.J., *Développement méthodologique associé à l'étude de la cinétique de l'enobosarm et de ses métabolites dans les fèces de veaux*, in *ECOLE NATIONALE VETERINAIRE, de l'AGROALIMENTAIRE ET DE L'ALIMENTATION*. 2015, ONIRIS NANTES ATLANTIQUE. p. 99.
13. Aikawa, K., et al., *Synthesis and biological evaluation of novel selective androgen receptor modulators (SARMS). Part I*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2015. **23**(10): p. 2568-2578.
14. Bhasin, S. and R. Jasuja, *Selective Androgen Receptor Modulators (SARMS) as Function Promoting Therapies*. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, 2009. **12**(3): p. 232-240.
15. Gao, W., C.E. Bohl, and J.T. Dalton, *Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor*. Chemical reviews, 2005. **105**(9): p. 3352-3370.
16. Boyle, G.W., et al., *Metabolism of Casodex in laboratory animals*. Xenobiotica, 1993. **23**(7): p. 781-798.
17. McKillop, D., et al., *Metabolism and enantioselective pharmacokinetics of Casodex in man*. Xenobiotica, 1993. **23**(11): p. 1241-1253.
18. Lunglmayr, G., *Casodex (ICI 176,334), A New, Non-Steroidal Anti-Androgen. Early Clinical Results*. Hormone Research in Paediatrics, 1989. **32**(suppl 1)(Suppl. 1): p. 77-81.
19. Tyrrell, C.J., et al., *Casodex 10-200 mg daily, used as monotherapy for the treatment of patients with advanced prostate cancer. An overview of the efficacy, tolerability and pharmacokinetics from three phase II dose-ranging studies*. Casodex Study Group. Eur Urol, 1998. **33**(1): p. 39-53.

20. Soloway, M.S., et al., *Bicalutamide in the Treatment of Advanced Prostatic Carcinoma: A Phase II Noncomparative Multicenter Trial Evaluating Safety, Efficacy and Long-Term Endocrine Effects of Monotherapy*. The Journal of Urology, 1995. **154**(6): p. 2110-2114.
21. Chodak, G., et al., *Single-agent therapy with Bicalutamide: a comparison with medical or surgical castration in the treatment of advanced prostate carcinoma*. Urology, 1995. **46**(6): p. 849-55.
22. Mahler, C. and L. Denis, *Clinical profile of a new non-steroidal antiandrogen*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1990. **37**(6): p. 921-924.
23. Kennealey, G.T. and B.J. Furr, *Use of the nonsteroidal anti-androgen Casodex in advanced prostatic carcinoma*. Urol Clin North Am, 1991. **18**(1): p. 99-110.
24. Verhelst, J., et al., *Endocrine profiles during administration of the new non-steroidal anti-androgen Casodex in prostate cancer*. Clin Endocrinol (Oxf), 1994. **41**(4): p. 525-30.
25. Cockshott, I., *Bicalutamide*. Clinical Pharmacokinetics, 2004. **43**(13): p. 855-878.
26. Furr, B.J., *"Casodex" (ICI 176,334)--a new, pure, peripherally-selective anti-androgen: preclinical studies*. Horm. Res., 1989. **32**: p. 69-76.
27. Gao, W. and J.T. Dalton, *Expanding the therapeutic use of androgens via selective androgen receptor modulators (SARMs)*. Drug discovery today, 2007. **12**(5-6): p. 241-248.
28. Marhefka, C.A., et al., *Design, Synthesis, and Biological Characterization of Metabolically Stable Selective Androgen Receptor Modulators*. Journal of Medicinal Chemistry, 2004. **47**(4): p. 993-998.
29. Chen, J., J. Kim, and J.T. Dalton, *Discovery AND Therapeutic Promise OF Selective Androgen Receptor Modulators*. Molecular interventions, 2005. **5**(3): p. 173-188.
30. Dalton, J.T., D.D. Miller, and J. Kearbey, *Sarms and method of use thereof*. 2011, Google Patents.
31. Thevis, M., et al., *Ultrahigh pressure liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in human sports drug testing: Possibilities and limitations*. Journal of Chromatography A, 2013. **1292**(0): p. 38-50.
32. Thevis, M.S., Wilhelm, *Targeting new performance enhancing drugs in doping controls: Selective androgen receptor modulators (SARMs)*. Spectroscopy Europe, 2010. **22**(4): p. 6.
33. Gomez, C., et al., *Analytical strategies based on mass spectrometric techniques for the study of steroid metabolism*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2014. **53**(0): p. 106-116.
34. Kuuranne, T., et al., *Aryl-propionamide-derived selective androgen receptor modulators: liquid chromatography-tandem mass spectrometry characterization of the in vitro synthesized metabolites for doping control purposes*. Drug Metab Dispos, 2008. **36**(3): p. 571-81.
35. Krug, O., et al., *Characterization of In Vitro Synthesized Equine Metabolites of the Selective Androgen Receptor Modulators S24 and S4*. Journal of Equine Veterinary Science, 2012. **32**(9): p. 562-568.
36. de Rijke, E., et al., *Selective androgen receptor modulators: in vitro and in vivo metabolism and analysis*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2013. **30**(9): p. 1517-26.
37. Thevis, M., et al., *Characterization of in vitro generated metabolites of the selective androgen receptor modulators S-22 and S-23 and in vivo comparison to post-administration canine urine specimens*. Drug Test Anal, 2010. **2**(11-12): p. 589-98.
38. Thevis, M. and W. Schänzer, *Analytical approaches for the detection of emerging therapeutics and non-approved drugs in human doping controls*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014. **101**(0): p. 66-83.

39. Thevis, M., et al., *Mass spectrometric characterization of urinary metabolites of the selective androgen receptor modulator andarine (S-4) for routine doping control purposes*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2010. **24**(15): p. 2245-2254.
40. Thevis, M., et al., *Detection of the arylpropionamide-derived selective androgen receptor modulator (SARM) S-4 (Andarine) in a black-market product*. Drug Test Anal, 2009. **1**(8): p. 387-92.
41. Thevis, M., et al., *Trafficking of drug candidates relevant for sports drug testing: Detection of non-approved therapeutics categorized as anabolic and gene doping agents in products distributed via the Internet*. Drug Testing and Analysis, 2011. **3**(5): p. 331-336.
42. Grata, E., et al., *SARM-S4 and metabolites detection in sports drug testing: A case report*. Forensic Science International. **213**(1): p. 104-108.
43. Hansson, A., et al., *Characterization of equine urinary metabolites of selective androgen receptor modulators (SARMS) S1, S4 and S22 for doping control purposes*. Drug Testing and Analysis, 2015. **7**(8): p. 673-683.
44. Rydevik, A., et al., *Isolation and characterization of a β -glucuronide of hydroxylated SARM S1 produced using a combination of biotransformation and chemical oxidation*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014. **98**(0): p. 36-39.
45. Thevis, M., M. Kamber, and W. Schänzer, *Screening for metabolically stable arylpropionamide-derived selective androgen receptor modulators for doping control purposes*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006. **20**(5): p. 870-876.
46. Grata, E., et al., *SARM-S4 and metabolites detection in sports drug testing: A case report*. Forensic Science International, 2011. **213**(1): p. 104-108.
47. Kim, J., et al., *Absorption, distribution, metabolism and excretion of the novel SARM GTx-024 [(S)-N-(4-cyano-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-cyanophenoxy)-2-hydroxy-2-methylpropanamide] in rats*. Xenobiotica, 2013. **43**(11): p. 993-1009.
48. Lozano, A., et al., *Identification and measurement of veterinary drug residues in beehive products*. Food Chemistry, 2019. **274**: p. 61-70.
49. Anastassiades, M., K. Maštovská, and S.J. Lehotay, *Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides*. Journal of Chromatography A, 2003. **1015**(1): p. 163-184.
50. McKillop, D., et al., *Enantioselective metabolism and pharmacokinetics of Casodex in the male rat*. Xenobiotica, 1995. **25**(6): p. 623-633.
51. Animal, O.-O.M.d.S., *Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres, (mamíferos, aves y abejas)*. 2004. **1**.
52. Gao, W., et al., *Interspecies differences in pharmacokinetics and metabolism of S-3-(4-acetylamino-phenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-N-(4-nitro-3-trifluoromethylphenyl)-propionamide: the role of N-acetyltransferase*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2006. **34**(2): p. 254-260.
53. Perera, M.A., et al., *In Vivo Metabolism and Final Disposition of a Novel Nonsteroidal Androgen in Rats and Dogs*. Drug Metabolism and Disposition, 2006. **34**(10): p. 1713-1721.
54. Kearbey, J.D., et al., *Pharmacokinetics of S-3-(4-acetylamino-phenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-N-(4-nitro-3-trifluoromethyl-phenyl)-propionamide in rats, a non-steroidal selective androgen receptor modulator*. Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems, 2004. **34**(3): p. 273-280.
55. Rydevik, A., et al., *The fungus *Cunninghamella elegans* can produce human and equine metabolites of selective androgen receptor modulators (SARMS)*. Xenobiotica, 2013. **43**(5): p. 409-420.

56. Li, H., et al., *Modified metabolites mapping by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry using full scan/all ion fragmentation/neutral loss acquisition*. Journal of Chromatography A, 2018.
57. Araujo, P., et al., *A simple liquid extraction protocol for overcoming the ion suppression of triacylglycerols by phospholipids in liquid chromatography mass spectrometry studies*. Talanta, 2016. **148**: p. 463-471.



Thesis

Convention de Cotutelle Internationale de Thèse Doctorale entre
ONIRIS – Universidad de Buenos Aires

STUDY OF SOME ARYL-PROPIONAMIDE SARMS
METABOLISM IN FOOD PRODUCING ANIMALS.
HIGHLIGHTING BIOMARKERS OF EXPOSURE
AND EFFECTS FOR CONTROL PURPOSES.

Student: Dante Emanuel ROJAS

Director: Dr. Andrea CALZETTA RESIO

Director: Dr. Gaud DERVILLY-PINEL

- Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) - Oniris, LUNAM Université (Nantes-Francia).
- Laboratorio de Contaminantes Químicos – Instituto Tecnología de los Alimentos – INTA (Buenos Aires – Argentina).
- Estación Experimental Agropecuaria Anguil – INTA (La Pampa – Argentina).
- Estación Experimental Agropecuaria Concordia – INTA (Entre Ríos – Argentina).

Dedication

To Vivi, my mother and father for their love, company and encouragement...

Acknowledgements

To my family and my colleagues (from INTA, from Facultad de Ciencias Veterinaria de la UBA y from LabERCA).

Special thanks for your help to Andrea Calzetta, Gaud Dervilly, Bruno LeBizec, Ariel Miranda, Mariana Galicio, Maria Juana Ruiz, Alba Castro, Susana Rojas, Diego Cristos, Diego Fernandez, Gaston Pelissier, Martin Paladino, Alexis Sosa, Alexander Sydor, Zied Kaabia, Gerome Laparre, Tao Peng, Berenger Marais, Kristine Hennig, Margarida Cardoso, Natalia Pesquero, Gabriela Denoya, Juan Manuel Rojas, Geronimo Ortigosa, Fernanda Martinez, Juan Carlos Fernandez, Claudia Gonzalez, Marcelo Masana y Sergio Vaudagna.

Abstract

At present, the chemical industry produces veterinary drugs that are used in livestock production for animal health care or to improve zootechnical aspects that increase production yield. However, the misuse of these substances may lead to residues that may remain in food derived from treated animals. Finally, these chemical residues could be ingested by the human consumer and it could eventually cause some negative effect on their health.

Depending on the toxicity of such residues in food, veterinary drugs are regulated by voluntarily implementing regulations or mandatory legislation. These regulations may change according to the criteria considered by each country and consequently international food trade may be affected by these differences in tolerances for waste between countries.

Growth promoters are substances that are ingested, injected or implanted in animals that improve production performance. There are a large number of substances that increase weight gain, feed efficiency and protein percentage in the carcass. The mechanism of action of these substances to gain weight can go from medicines that eliminate parasites favoring the correct assimilation of the ingested nutrients to chemicals with mechanism of action at the cellular level of the skeletal muscle that stimulate protein synthesis.

In livestock, the growth promoters traditionally used are anabolic androgenic steroids, β -agonists and Growth hormone (GH). Other anabolic substances used include zeranol, anabolic antimicrobials, stylobens and thyrostatics substances.

Emerging anabolic practices include GH secretagogues, IGF-1 analogues (Insulin Growth Factor-1) and Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs).

Selective modulators of androgen receptors are a new family of non-steroids substances, which has the ability to bind to androgen receptors (AR). Ideally they have selectivity in their effect (anabolic or androgenic) depending on the tissue, they have low toxicity (hepatic, cardiovascular, etc.) and they possess favorable pharmacological properties such as high digestive absorption facilitating oral

administration and show a long average life. For these reasons, they have been already sold on the Internet and cases have been detected in sport (animal and human). With this background, it is to be hoped that the SARMS will follow the same path as other anabolic compounds until they reach animal production.

In Argentina since 1961, substances with anabolic effect have been regulated and restrictions have increased over time. Establishing the importance of ensuring food quality and strengthening international trade.

In Europe, as economic community, control and restriction for the use of anabolic agents in livestock farming began in 1981. The employment of growth promoters is currently prohibited in food producing animals.

The study of the metabolism of these chemicals is essential when controlling livestock practices. This is because after administration, a substance suffers metabolic reactions within the body. Thus, the concentration of the administered drug decreases at the expense of the increase of the products of these metabolic reactions (metabolites). Therefore, some metabolites could remain as indicators of the use of the substance in higher concentrations and for longer periods of time than the administered drug.

The general objective of this paper is to provide tools for the control of SARMS in livestock production, developing analytical methods and generating information about their metabolism in food producing animals. In the study liquid chromatography coupled to mass detectors was applied, which is a confirmation method and provide structural data for unknown substances.

Enobosarm, Andarine, Bicalutamide and Hidroxyflutamide were studied in different stages of this work because of the accessibility to get each of them.

The analytical methods developed for the SARMS were evaluated to fulfill Argentine and European normative criteria. A method was achieved for the control of Enobosarm, Andarine, Bicalutamide and Hidroxyflutamide in urine and faeces, while for serum a method was developed for Bicalutamide and Andarine.

Two animal trials were conducted to learn about metabolic aspects of these substances. The first with Bicalutamide administration to a bovine (Montbeliard

breed), taking urine and faeces. In the second test cattle (Angus breed) and pigs (Chetapuy breed) were used, worked as follows: 6 cattle in 2 groups of 3 animals: treated with Bicalutamide and control (untreated); 3 pigs in three groups: treated with Bicalutamide, treated with Andarine and control (no treatment). Urine, faeces and blood were collected after administration, as they were easily accessible for routine work. The urinary and fecal elimination profiles with the corresponding serum level curves were established.

Bicalutamide was found to have rapid absorption and slow elimination, with detectable concentrations in excreta for more than one week (9 – 11 days). In contrast, Andarine showed rapid elimination (48 hs.) together with rapid absorption.

Phase I and Phase II metabolites were found in animal excreta. The results showed 5 metabolites in cattle treated with Bicalutamide but only 4 of them in the pig treated with the same substance. In contrast, the porcine treated with Andarine presented 12 metabolites. Based on the information provided by the mass spectrometry it was possible to propose the chemical structure of 16 metabolites found, leaving only one metabolite of Andarine without structure proposed.

After analysing the results in cattle treated with a single dose of Bicalutamide, it can be concluded that the lyophilized fecal matter is the best matrix for control. The markers in faeces that showed the highest signal were M3 followed by Bicalutamide (without modification). In urine the best marker was M2 followed by M5. Despite the large signal obtained for these metabolites, Bicalutamide (without modification) was the substance that remained most detectable, 7 days in urine and 11 days in faeces. For the control of Bicalutamide in pigs with a single dose, Bicalutamide was selected in both matrices based on intensity and signal duration. The control of Andarine and its metabolites in pigs poses a difficulty that lies in the short period that remains detectable.

This work is the first scientific study carried out with oral administration of Bicalutamide in food producing animals. It is the first work done with Andarine in

pigs of Chetapuy breed. In addition, it is the first work to report 2 of the 5 proposed Bicalutamide metabolites.

Table of contents

Dedication	2
Acknowledgements	2
Abstract	3
List of figures	10
List of tables.....	12
Abreviaturas.....	13
Hypotheses and Objectives.	15
Hypotheses	15
General Objectives.....	15
Particular Objectives	15
Introduction.....	16
Food Safety and Veterinary Drug	16
Argentine Legislation	16
European Union Legislation	16
Growth promoters in livestock production	18
Androgens and its receptors.....	18
Androgen Receptors	19
Selective Androgen Receptor Modulators (SARMS).....	21
Materials and Methods	24
Control method for SARMS in livestock production.....	31
Reagents and solutions.....	31
Instrumentation: Control Method for SARMS (LabERCA, ONIRIS)	31
Sample Preparation.....	32
Method Performance.....	32
Bicalutamide and Andarine In animal trials.....	34
First Animal Trial (Oniris-LabERCA)	34
Second Animal trial (INTA – Anguil)	35
Results and discussion.....	41
CONTROL METHOD FOR SARMS IN LIVESTOCK PRODUCTION.....	41
Evaluation of method performance.....	45

Conclusions Partial:.....	48
METABOLITE STUDY OF BICALUTAMIDE AND ANDARINE	49
First animal trial (Bicalutamide).....	49
Partial Conclusions:.....	60
Second animal trial.....	62
Excretion of Bicalutamide and Andarine	64
Bicalutamide metabolites	70
Partial Conclusions:.....	90
Evaluation of Markers Metabolites for the Control of Livestock Practices	92
Partial Conclusions	95
Conclusions.....	96
Bibliografía.....	98
Annex I.....	105
LabERCA Cromatographic System	105
Chromatography	106
Annex II.....	110
HYDROLYSIS STUDIES AND STABILITY OF BICALUTAMIDE	110
Enzymatic Hydrolysis.....	110
Chemical Hydrolysis	112
Annex III.....	114
Method Evaluation	114
Urines	114
Faeces.....	116
Annex IV.....	121
FiRst Animal Trial	121
Elimination profiles	121
Annex V.....	122
First Animal Trial: Metabolites	122
Chromatographic System.....	122
Characteristic fragments of Bicalutamide.....	123
Annex VI.....	124

Adjuste of Cone Energy	124
Annex VII.....	127
method Evaluation	127
Calibration curves	127
Linearity.....	130
Accuracy	130
Precision	132
Annex VIII.....	134
Characteristic fragments of Andarine.....	134
Annex IX.....	135
Metabolites Study (2nd animal Trial)	135
SARMs Concentrations	136
Metabolites de Bicalutamide.....	139
Bovines	139
Porcine	141
Porcine Metabolites of Andarine.....	143

List of figures

Figure 1. Chemical structure of Testosterone and Dihydrotestosterone. [6]	18
Figure 2. Structure of the human Androgen Receptor [7]	19
Figure 3. Mechanism of action of the androgen receptor [8].....	19
Figure 4. Effects of Testosterone on tissues [3, 9].	20
Figure 5. Chemical structure of Bicalutamide (a); Andarine (b); Ostarine (c); Hidroxyflutamide (d).	23
Figure 6. Animal N°4382 - calf (1 st animal trial)	34
Figure 7. Steers (Angus) treated by Casodex [®] (2 nd animal trial).	36
Figure 8. Method for Urines samples.	42
Figure 9. Method for faeces samples.	44
Figure 10. Cromatogramas SRM used for quantification of SARMS.	47
Figure 11. Excretion profile of Bicalutamide in faeces (a) y Urine (b).	50
Figure 12. Composite Chromatogram constructed by TICs (1 ^o trial)	52
Figure 13. Proposed structure for M1 (m/z = 605).	53
Figure 14. Proposed structure for M2 (m/z = 621).	54
Figure 15. Proposed structure for M3 (m/z = 445).	54
Figure 16. Proposed structure for M4 (m/z = 509).	55
Figure 17. Proposed structure for M5 (m/z = 525).	55
Figure 18. Excretion profile of Bicalutamide metabolites.....	56
Figure 19. SIM Chromatograms: Standard solutions, blank samples and spiked samples.	64
Figure 20. Concentrations of Bicalutamide in Urine.	65
Figure 21. Concentrations of Bicalutamide in faeces.....	66
Figure 22. Serum concentrations of Bicalutamide.	67
Figure 23. Concentrations of Andarine in Urine, Faeces and Serum of the treated porcine.	68
Figure 24. Composite chromatogram for the treated steer with 200 mg Casodex.	73

Figure 25. Composite chromatogram of the porcine after Casodex [®] administration.....	75
Figure 26. Composite chromatogram of the porcine treated with Andarine.	76
Figure 27. Chemical structure of Andarine (m/z = 440).....	77
Figure 28. Chemical structure proposed for DM1 (m/z = 205).	77
Figure 29. Chemical structure proposed for DM2 (m/z = 221).	77
Figure 30. Chemical structure proposed for DM3 (m/z = 301).	78
Figure 31. Chemical structure proposed for DM5 (m/z: 397).....	78
Figure 32. Chemical structure proposed for DM6 (m/z: 398).....	79
Figure 33. Chemical structure proposed for DM7 (m/z: 410).....	79
Figure 34. Chemical structure proposed for DM8 (m/z: 426).....	79
Figure 35. Chemical structure proposed for DM9 (m/z: 590).....	80
Figure 36. Chemical structure proposed for DM10 (m/z: 483).....	80
Figure 37. Chemical structure proposed for DM11 (m/z: 616).....	81
Figure 38. Chemical structure proposed for DM12 (m/z: 494).....	81
Figure 39. Excretion profile of Bicalutamide metabolites.....	82
Figure 40. Excretion profile of Andarine metabolites.	88
Figure 41. Relative abundances of Bicalutamide metabolites in excreta of bovine.	93
Figure 42. Relative abundances of Bicalutamide metabolites in excreta of porcine.	94
Figure 43. Relative abundances of Andarine metabolites in excreta of porcine.	94

List of tables

Table 1. Non steroid SARMs Families [17].	22
Table 2. Analytical characteristics of the compounds studied.....	25
Table 3. Methods considered for the analysis of APA-SARMs in Urine.	26
Table 4. Methods considered for the analysis of APA-SARMs in faeces.....	27
Table 5. Methods considered for the analysis of APA-SARMs in Blood.....	28
Table 6. Chromatographic Conditions considered for the analysis of APA-SARMs.	29
Table 7. Parameters of mass spectrometry detectors considered for analysis of APA-SARMs.	30
Table 8. Doses administrated on second animal trial	35
Table 9. Sampling on the second animal trial (2 nd animal trial).....	36
Table 10. Parameters of mass spectrometry used for study Bicalutamide and Andarine.....	39
Table 11. Parameters used for SARMs during method development.	45
Table 12. Parameters obtained during the performance evaluation.	46
Table 13. Bicalutamide Metabolites found in the treated calf.	51
Table 14. Transitions used for the construction of excretion profiles.....	55
Table 15. Parameters of mass spectrometry used for SARMs (2 ^o trial).....	63
Table 16. Parameters obtained the performance evaluation (2 nd trial).	63
Table 17. Bicalutamide metabolites found in the treated steer.....	71
Table 18. Bicalutamide metabolites found in the treated porcine.....	74
Table 19. Andarine metabolites found in the treated porcine.	75
Table 20. Transitions MRM of Andarine metabolites.	82

ABREVIATURAS

SARMS: Selective Androgenic Receptor Modulator

APA: Aryl-Propionamide

APA-SARMS: Aryl-Propionamide SARMS

AES: Anabólicos Esteroides Androgénicos

GH: Growth Hormone

IGF-1: Insulin Growth Factor-1

AR: Androgen Receptors

AcH: acetic acid

ACN: acetonitrile

ADR: Adverse Drug Reaction

APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization

API: Atmospheric Pressure Ionization

APPI: Atmospheric Pressure Photoionization

CYP: Cytochrome P450 Enzyme

DMSO: Dimetil Sulfoxide

ECVAM: European Centre for the Validation of Alternative Methods

EMS: Enhanced Full Mass Scan

EPI: Enhanced Product Ion Scan

ER: Enhanced Resolution Scan

ESI: Electrospray Ionization

FA: formic acid

TBME: Methyl t-butyl ether

FWHM: Full Width at Half Maximum

GC: gas chromatography

GSH: Glutathione (reduced form)

GST: Glutathione S-transferase

HLH: Human Liver Homogenate

HLM: Human Liver Microsomes

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

HRMS: High-Resolution Mass Spectrometry

IADR: Idiosyncratic Adverse Drug Reaction

IDA: Information Dependent Acquisition

IT: Ion Trap

KCN: Potassium Cyanide

LC: Liquid Chromatography

LLE: Liquid-Liquid Extraction

MDF: Mass Defect Filter

MeOH: methanol

MRM: Multiple Reaction Monitoring

MS: Mass Spectrometry

MS/MS: Tandem Mass Spectrometry

m/z: mass-to-charge ratio

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate(forma reducida)

SRM: Single Reaction Monitoring

STD: standard

ISTD: internal standard

SPE: solid phase extraction

AA: ammonium acetate

AF: acid formic

AcH: acetic acid

FA: ammonium formiate.

Hypotheses and Objectives.

HYPOTHESES

- The study of the metabolism of aryl-propionamide SARMS (APA-SARMS) is necessary for the development of analytical methods of control of livestock practices.
- APA-SARMS and its metabolites in urine and faeces samples can be used to monitor abuse in livestock practices.

GENERAL OBJECTIVES

- Study APA-SARMS levels in urine, faeces, and blood in production animals.
- Develop analytical chemistry tools for residue monitoring to implement APA-SARMS control in production animals.

PARTICULAR OBJETIVES

- Develop a Liquid Chromatography coupled to tandem mass spectrometry method for the study of APA-SARMS.
- Identify useful metabolites for the APA-SARMS control in livestock practices.
- Study APA-SARMS and its metabolites excretion in urine and faeces in swine and bovine.

Introduction

FOOD SAFETY AND VETERINARY DRUG

Use of veterinary drugs in livestock could leave residues that may remain in food derived from treated animals. Finally, these chemical residues could be ingested by the human consumer and it could eventually cause some negative effect on their health.

Depending on the toxicity of such residues in food, veterinary drugs are regulated by voluntarily implementing regulations or mandatory legislation. These regulations may change according to the criteria considered by each country and consequently international food trade may be affected by these differences in tolerances for waste between countries.

Argentine Legislation

The Argentine legislation proposes to ensure the supply of safe and quality food to domestic consumers and international buyers. Moreover, as a member of the WTO (World Trade Organization), it complies with the SPS Agreement (Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures) and bases its legislation on scientific evidence.

In Argentina since 1961, substances with anabolic effect have been regulated and use of growth promoters during livestock production is currently prohibited. However, the therapeutic use of oestrogen is permitted.

European Union Legislation

EU legislation seeks to ensure safe food for EU consumers, regardless of whether they were produced in the EU or in third countries.

In relation to the employment of growth promoters in livestock production, European legislation is based on the *precaution principle* established in the SPS Agreement (substances for which the full toxic effect is not known) and based on scientific information showing that under certain

circumstances and doses these substances have toxic effects on the animal and the consumer of food derived from treated animals [1, 2].

In Europe, as an economic community, control and restriction for the use of anabolic agents in livestock farming began in 1981. In that year, its regulations (Directive 81/602/EEC) prohibited certain substances (diethylstilbestrol, other stilbenes and thyrostatics). Then in 1988, the European Community (EC) banned the use of growth promoters in food producing animals [3]. However, the therapeutic use of oestrogen is permitted.

GROWTH PROMOTERS IN LIVESTOCK PRODUCTION

Growth promoters are substances that are ingested, injected or implanted in animals that improve production performance. There are a large number of substances that increase weight gain, feed efficiency and protein percentage in the carcass [4].

In livestock, the growth promoters traditionally used are anabolic androgenic steroids, β 2-agonists and Growth hormone (GH). Other anabolic substances used include zeranol, anabolic antimicrobials, stylebens and thyrostatics substances [3].

Emerging anabolic practices include GH secretagogues, IGF-1 analogues (Insulin Growth Factor-1) and Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs) [3].

ANDROGENS AND ITS RECEPTORS

Androgens are substances known to develop male sexual characteristics and should also be able to bind and activate androgen receptors (AR) [5]. Testosterone (T), Dihydrotestosterone (DHT) and Androstenodione are natural androgens. Androgens are produced in different organs and a part of T is converted into DHT in tissues (Figure 1). After entering the cells of the target tissues, a part of the Testosterone is transformed into DHT, especially into organs such as the prostate and genitals. Some functions depend on this transformation, that is to say depend on DHT levels. The basic intracellular mechanism of the anabolic effect is attributed to increased protein synthesis in the target cell. [6].

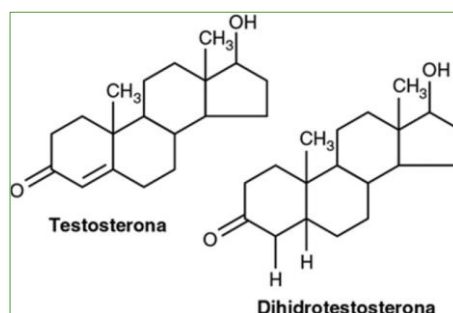


Figure 1. Chemical structure of Testosterone and Dihydrotestosterone. [6]

Androgen Receptors

The androgen receptor (AR) is a member of the superfamily of nuclear steroid receptors. It is a soluble protein, which works as an intracellular transcription factor. Figure 2 show it has three regions : DNA-Binding Domain (DBD), Ligand Binding Domain (LBD) and N-terminal domain (NTD) [7].

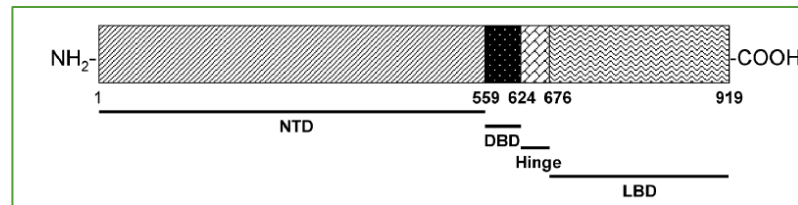


Figure 2. Structure of the human Androgen Receptor [7]

AR remains in the cytoplasm attached to HSP 70 and HSP 90 (Heat Shock Protein, HSP). However, in the presence of an agonist ligand that binds at the LBD region, triggering conformational changes through which it travels inside the Cellular Nucleus, convening cofactors and activating the transcriptional machinery in order to activate the dependent genes of AR under stimulation of agonist ligands (Figure 3) Effects on reproductive tissues (prostate, testicles, seminal vesicles and accessory structures) are known as *androgenic effects* while effects on muscles and bones are called *anabolic effects* [7].

In the last decade progress was made on the mechanism of action of T in the different tissues. There are three types of actions: (a) T can activate AR directly where *5 α -reductase* is not expressed; (b) T is transformed to DHT before activating AR (5 % to 10 %); (c) about 0,2 % T is attacked by an aromatase that transforms T into an oestrogen by activating *Oestrogen Receptors* [3, 7].

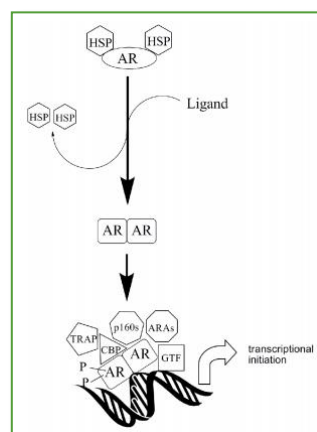


Figure 3. Mechanism of action of the androgen receptor [8]

The formation of DHT is important because it has greater affinity for RA than T, giving a more powerful response in "*DHT-dependent*" tissues such as prostate, testicles, seminal vesicles and accessory structures (androgenic effects). Oestrogens generated by T transformation would be strong regulators of metabolic processes related to behavior and cognition, cardiovascular activity, sexual function including libido and bone turnover processes in the male. However, the highest proportion of T would act without changes in "*DHT-Independent*" tissues or where 5α -reductase is poorly expressed, acting directly on the growth of skeletal muscle, bone tissue formation, the distribution of adipose tissue and sexual function [7, 9].

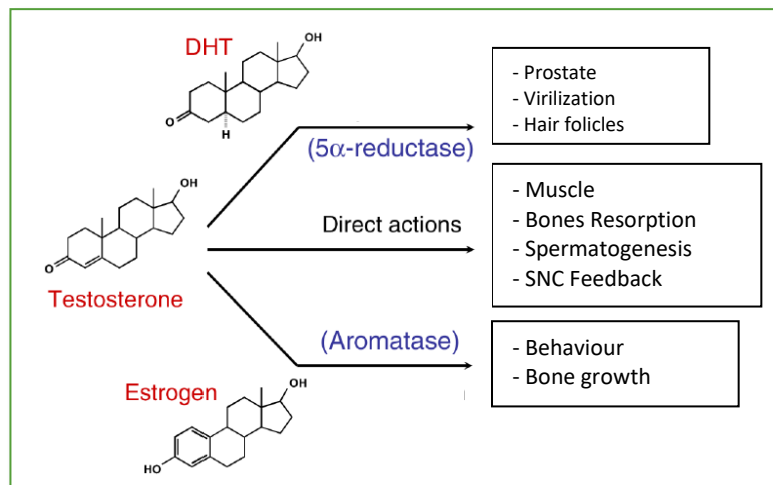


Figure 4. Effects of Testosterone on tissues [3, 9].

T can bind to androgen receptors (AR) directly. In some cases, according to the enzymes present in the tissue, T can be transformed by 5α -reductase to join the AR with greater affinity than T. In other tissues, an *Aromatase* is present capable of transforming T and enabling its binding to oestrogen receptors (ER).

SELECTIVE ANDROGEN RECEPTOR MODULATORS (SARMS)

Anabolic androgenic steroids have the disadvantage of simultaneously producing anabolic and androgenic effects. In addition, its therapeutic use is limited due to low oral bioavailability, cross reactivity with other steroid receptors, liver toxicity and other undesirable side effects in the prostate and cardiovascular system [5, 10-12].

The term selective androgen receptor modulators SARMS and its tissue selectivity was first reported in 1998. SARMS are a new family of non-steroids substances, which has the ability to bind to androgen receptors (AR) [13, 14]. Ideally they have selectivity in their effect (anabolic or androgenic) depending on the tissue, they have low toxicity (hepatic, cardiovascular, etc.) and they possess positives pharmacological properties such as high digestive absorption facilitating oral administration and show a long average life [7, 8, 15, 16].

The mechanism of action of the SARMS is not fully established. However, the probable hypotheses are not susceptible to the action of the *5 α -reductase* that makes possible the action of steroid androgens in some tissues (Figure 4) or generate a different conformational changes on AR in different tissues, modifying the recruitment of cofactors at the genomic level (Figure 3).

(Table 1), MRSA can be classified into at least four classes: 1) arylpropionamide (APA), 2) bicyclic hydantoin, 3) quinoline, and 4) analogs of tetrahydroquinolein.

Considering their chemical structures, SARM can be classified into at least four classes as show Table 1: 1) arylpropionamide (APA), 2) bicyclic hydantoin, 3) quinoline, and 4) Analogues of tetrahydroquinolein.

Table 1. Non steroid SARMS Families [17].

Chemical Families	General Structure
Analogues of Aryl-propionamide	
Analogues of Bicyclic Hydantoin	
Analogues of Tetrahydroquinolein	
Analogues of Quinolein	

The first successful development of a SARM is Bicalutamide (Figure 5), belonging to the derivatives of aryl-propionamide (APA) [18, 19]. Despite being used as an antiandrogen, by blocking AR, in human it produces an increase in hormone levels: testosterone, oestradiol, luteinizing hormone and stimulating follicle hormone [20-26].

Bicalutamide metabolism studies had reported metabolites produced by Phase I (hydroxylation) and Phase II (glucuronide and sulfate conjugation) reactions. In addition, fecal and urine elimination profiles of Bicalutamide and its metabolites highlighted the importance of these matrices as a quantitatively important route of excretion [27, 28].

Bicalutamide metabolism studies had reported metabolites produced by Phase I (hydroxylation) and Phase II (glucuronide and sulfate conjugation) reactions [18, 19]. In addition, fecal and urine elimination profiles of Bicalutamide and its metabolites highlighted the importance of these matrices as a quantitatively important route of excretion [27, 28].

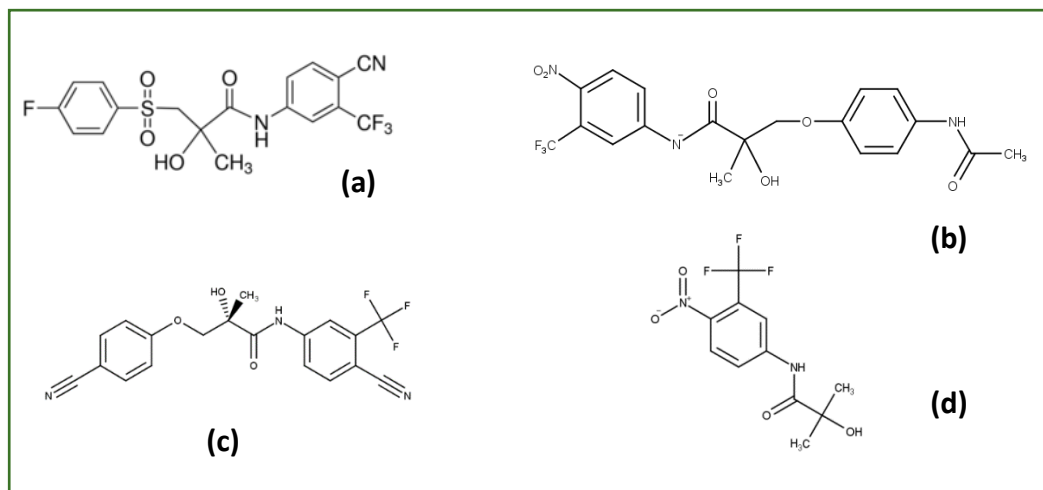


Figure 5. Chemical structure of Bicalutamide (a); Andarine (b); Ostarine (c); Hydroxyflutamide (d).

SARMs are in different stages of clinical study [7, 29, 30]. There are also patents for the use of these substances in animal production [31] due to their AR agonist capacity [32].

In recent years, a growing number of studies have been published on the analytical and metabolic aspects of SARMs. The methods employed are mostly liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry detectors [33-35]. Metabolic studies had confirmed Phase I (hydroxylation, dephenylation, nitrorreduction, etc.) and Phase II (glucuronide and sulfate conjugation) reactions for in-vitro and in-vivo studies [36-39].

For the above mentioned SARMs constitute a risk of abuse in sport and animal production. For this reason, since 2008, the use of SARMs in sports was prohibited by the World Drug Enforcement Agency [40, 41]. In addition, there have been cases of Internet illegal sales and their use in pig production has been reported [42, 43]. Cases of abuse by SARMs in sports have been published [44] and 13 detections have been reported in 2013 [45]. In this way, SARMs began to travel a path from sports doping to livestock production as has happened before with other anabolic agents [38].

Materials and Methods

Table 2 presents a summary of the studied SARMS, their structures and mass spectrometry fragmentation.

Samples preparation was based on previous work carried out in the Laboratoire d'étude des résidus et Contaminants dans les Aliments [3, 14] and other studies summarised in the Table 3, Table 4, Table 5, Table 6 and Table 7.

Table 2. Analytical characteristics of the compounds studied.

Compound	Synonyms	CAS	Formula	Structure	MW (g/mol)	Metabolites	Fragments (m/z)	Elimination
Ostarine	(S)-3-(4-Cyanofenoxi)-N- [4-cyano-3-(trifluoromethyl)phenyl]-2-hidroxy-2-methylpropionamide S22, MK-2866 ENOBOSARM GTx	841205-47-8	C ₁₉ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₃		389.33	dephenylation Hydroxylation with/without glucuronidation Sulfonation Carboxylation	<u>ions (± 0.5)</u> : 388.1; 118.1; 184.9; 241.1; 269.1	t _{1/2} Urine= 4hs till 6 days t _{1/2} plasma= 1.4hs till 16.3h
Andarine	(S)-3-(4-Acetylaminofenoxi)-2-hidroxy-2-methyl-N-(4-nitro-3-trifluoromethylphenyl) propionamide S4	401900-40-1	C ₁₉ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₆		441.36	O-dephenylation	<u>ions (± 0.5)</u> : 440.0; 150.1; 205.0; 261.1; 289.1	t _{1/2} plasma= 2,6 hs till 5.3hs
Bicalutamide <i>Casodex</i> ®	N- [4-Cyano-3-(trifluoromethyl)phenyl]-3- [(4-fluorophenyl)sulfonyl]-2-hidroxy-2-methylpropionamide	90357-06-5	C ₁₈ H ₁₄ F ₄ N ₂ O ₄ S		430.37	Glucuronidation Dephenylation Hydroxylation	<u>ions (± 0.5)</u> : 428.9; 185.1; 255.1	t _{1/2} plasma= 1 week (rats 1 day, dogs/humans 6-7 days)
Flutamide <i>Flucinom</i>	2-Methyl-N-(4-nitro-3-[trifluoromethyl]phenyl) Propionamide	13311-84-7	C ₁₁ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₃		276.21	2-Hidroxyflutamide	<u>ions (± 0.5)</u> : 275.1; 229.1; 205.0; 202.0; 186.0 <u>2OH ions (± 0.5)</u> : 291.1; 205.0; 175.0; 159.0; 155.0	-Flutamida: variable -2-Hidroxyflutamida: t _{1/2} plasma= 5.2hs
Arylpropionamides	X	X	X		X		<u>ions (± 0.5)</u> : 289 ; 261 ; 241 ; 205	x

STD: standard; **ISTD:** internal standard; **LLE:** liquid-liquid extraction; **SPE:** solid phase extraction; **TBME:** Methyl t-butyl ether; **AA:** ammonium acetate; **AF:** acid formic; **AcH:** acetic acid; **FA:** ammonium formiate.

Table 3. Methods considered for the analysis of APA-SARMS in Urine.

Compound	Method	
Enobosarm [38]	<p>LLE</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 mL Urine + ISTD (Bicalutamide) + Buffer Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (1: 2, v/v); (pH = 7) • Hydrolysis β-glucuronidase 1 h (50 °C) + <i>sulfatase</i> • Cool a Room temp.+ 100 mg K₂CO₃/NaHCO₃ (2: 1, v/v) + vortex • Extraction <i>head-over-head</i> con 4 mL TBME 15min • Centrifugation 4000 x g 10 min + dry supernatant (40 °C) with N₂ • Adding STD APA (0,01 mg/L) to blank extracts for <i>Matrix Match calibration</i> • Evaporation to dry → 40 °C with N₂ → Reconstitute 250 μL H₂O /ACN 4: 1 (v/v), vortex 	<p>SPE</p> <ul style="list-style-type: none"> • 3 mL de Urine + ISTD + 3 mL Buffer AA 0,25M, pH = 5 • Conditioning 12 mL MeOH + 6 mL H₂O • Load sample(strata-X) • Wash 1° 6 mL MeOH/H₂O (4: 6, v/v) + 1 % AcH • Wash 2° 6 mL MeOH/H₂O (2: 8, v/v) + 0,25 % NH₄⁺ • Elution 6 mL MeOH • Evaporation to dry → 40 °C with N₂ • Reconstitute 100 μL MeOH + 400 μL AF 20 mM
Enobosarm [46]	Centrifugation a 17 500 x g durante 5 min with recuperation del supernatant	
Enobosarm [47, 48]	<p>SPE</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 mL Urine + ISTD → Conditioning 2 mL MeOH + 2 mL H₂O → Load sample → Wash 2 mL H₂O → Elution 2 mL MeOH → Evaporation to dry → Reconstitute the residuesiduo with 100 μL MeOH /0,1 % AF 	
Andarine [49]	<p>Screening</p> <ul style="list-style-type: none"> • Urine thawed (37 °C) • Centrifugation 1350 x g (5 min) • <u>1ra aliquot:</u> 2 mL + ISTD (mefuside) → saturation with potassium carbonate → extraction with basic pH /4 mL of ethyl acetate • <u>2da aliquot:</u> 2 mL + ISTD (mefuside) → saturation with NaH₂PO₄ → extraction a pH acid/4 mL de ethyl acetate • Centrifugation a 1350 x g (5 min) → collect organic phases and evaporate • Reconstitute 125 μL de Buffer FA 10 mM pH 4/ACN (80/20) 	<p>Confirmation</p> <ul style="list-style-type: none"> • Urine thawed (37 °C) • Centrifugation 1350 x g (5 min) • 2 mL Urine + ISTD (mefuside) + 1 mL Buffer phosphate 0,8 M pH 7 • Hydrolysis β-glucuronidase a 50 °C (1 h) • + Buffer Na₂CO₃/NaHCO₃ → pH 8,5-9 • LLE with 5 mL TBME • collect organic phase • Evaporation to dry → with flow of air (50 °C) • Reconstitute 125 μL Buffer FA 10 mM pH = 4/ACN (80/20)
Andarine [50]	<ul style="list-style-type: none"> • 3 mL Urine (Hydrolysis : 1 mL buffer phosphate pH = 7 + 30 μL glucuronidase (1 h) a 56 °C) → Cool- room temp. + NaHCO₃/K₂CO₃ (2 : 1) → LLE with 5 mL diethyl ether → Centrifuge and evaporate the organic phase → Reconstitute 100 μL MeOH/H₂O (30/70) 	

STD: standard; **ISTD:** internal standard; **LLE:** liquid-liquid extraction; **SPE:** solid phase extraction; **TBME:** Methyl t-butyl ether; **AA:** ammonium acetate; **AF:** acid formic; **AcH:** acetic acid; **FA:** ammonium formiate; **H₂O:** water.

Table 4. Methods considered for the analysis of APA-SARMS in faeces.

Compound	Protocols
Acetotiolutamide [51]	Faeces (6-10.5 g) + 10 mL H ₂ O → blender → Extract 3 times with MeOH/AE 2: 1 (v/v) → Collect liquid phases of extraction and vaporate to low Pressure → Reconstitute with methanol and filter 300 µL with membrane (0.45µm).
Andarine [52]	<ul style="list-style-type: none"> • Faeces with adding double volume with H₂O → blender → freezing to -20 °C → Thawed, centrifuge 3000 x g (10 min) + ISTD → Filter supernatant (0.22 µm) → Inject 20 µL - HPLC/MS • Extract x 4 times (Solid with ethyl acetate/methanol 2:1 (v/v)) → centrifuge 3000 x g (10 min) → Mix and evaporate the supernatants under N₂ → Reconstitute with 500 µL de methanol/H₂O, 1:1 (v/v) → Filter supernatant (0.22 µm) → Inject 20 µL -HPLC/MS
SARM LY2452473 [53]	Faeces: 3 x Extraction with 5 volumes of ACN/AA 10 mM (1:1, v:v) → Evaporate and then Reconstitute extracts - MeOH/AA 10 mM (1:2, v:v).
S-26 [54]	Faeces: 3x extraction with 10 mL de MeOH/AE 2: 1. (v/v) → Mix and evaporate liquid phases → Dilute the residues with MeOH.
Enobosarm [46]	Homogenate faeces with 3 times volume H ₂ O → Extraction: 5 g de faeces 2 x (15 mL de ACN) → Vortex 2 min → Centrifuge to 1400 x g. 10 min) → Mix supernatant and evaporate to 20 °C with N ₂ → Reconstitute 1 mL de ACN/H ₂ O (1: 1, v/v) → Centrifuge to 17500 x g. 5 min
Bicalutamide [19]	Extraction de faeces homogenised (5-10g) with ACN (30 mL) → Evaporate to dry under low Pressure → Reconstitute with 1 mL MeOH → Analysis by TLC
Bicalutamide [18]	Extraction faeces homogenised (5g) with 3-6 volume MeOH → Evaporate to dry dry under low Pressure → Reconstitute with 1-2 mL MeOH → Analysis by TLC

MeOH: Methanol; **AE:** Ethyl acetate; **ACN:** Acetonitrile; **AA:** Ammonium acetate; **ISTD:** Internal Standard (internal standard); **TLC:** Thin Layer Chromatography; **H₂O:** water.

Table 5. Methods considered for the analysis of APA-SARMS in Blood.

Compound	Protocols
Bicalutamide [55]	• 50 µL Plasma + 950µL MeOH (ISTD) → Shake 30" → Centrifuge 14000 rpm (5 min) → 50 µL supernatant + 950 µL ACN al 70% → Shake 30"
Ostarine [46]	• 3 x Extractions: Plasma + 3 volumes ACN → Took and mix 3 supernatants → Evaporate to dry 20 °C y N ₂ → Reconstitute 0.7-0.9 mL of H ₂ O:ACN (1+1) → Centrifuge 17500 x g (5 min)
Andarine [56]	• Plasma + ACN (ISTD) same volumes of plasma → 16000 g x 30 min (4 °C) → Recuperation of supernatant
S-1 [57]	• 100 µL Plasma + 30ul ISTD + 1 mL ACN → Centrifuge 16100 x g (10 min) → supernatant + 1 mL H ₂ O + 7.5 mL AE → shake 10 min → Centrifuge 1540 x g (10 min) → Evaporate the organic phase to dry with N ₂ → Reconstitute en 150 µL de H ₂ O: ACN (1+1) → Centrifuge 16100 x g (10 min)
Bicalutamide [58]	• 50 µL Plasma + 200 µL ACN (ISTD) → Shake 15" → Centrifuge 14000 x g (10 min) → Recover supernatant
Andarine [52]	• 500 µL Plasma + ISTD + 1 mL ACN → Centrifuge 2000 x g (5 min) → + 7 mL AE shake 40 min → Centrifuge 2000 x g (5 min) → Evaporate the organic phase to dry with N ₂ → Reconstitute 100 µL ACN: Agua (35: 65 v/v)
Hidroxyflutamide [59]	• 200 µL Plasma + 20 µL MeOH (ISTD) + 20 µL MeOH → Vortex → + 600 µL MeOH → Vortex (60") → Centrifuge 1200 rpm (5 min) → Recover supernatant

MeOH: Methanol; **AE:** Ethyl acetate; **ACN:** Acetonitrile; **ISTD:** Internal Standard (internal standard); **H₂O:** water.

Table 6. Chromatographic Conditions considered for the analysis of APA-SARMS.

Compounds	Chromatographic Conditions	
Ostarine [38]	Column BEH C18 (150x2.1 mm; 1.7 μ m); (50 °C) V_{inj} = 5 μ L Flow 0.2 mL/min - <u>Grad.</u> : A= H ₂ O + AF 5 mM; B= ACN+AF 5 mM 10 % B to 0 y 1 min \rightarrow to 100 % in 15 min \rightarrow hold (2 min) \rightarrow 100 % to 10 % B in 1min \rightarrow 10 % B (8 min) = 28 min	Column BEH C18 (100x2.1mm; 1.7 μ m) (50 °C) – V_{inj} = 5 μ L Flow 0.6 mL/min (<u>Split 1: 1 to MSD</u>) - <u>Grad.</u> : A= H ₂ O; B= ACN 0 % B hold 0-0.3min \rightarrow to 20 % B at 0.3-1min \rightarrow to 70%B at 1-5 min \rightarrow to 100 % B at 5-5.5min \rightarrow 100 % B (1min) \rightarrow 100% to 10 % B in 0.5min \rightarrow 0 % B (2min) = 9 min
Ostarine [46]	Column Sepax C18 (250x4.6 mm; 5 μ m) – Flow 0.8 mL/min – <u>Grad.</u> : A= H ₂ O+AF 0.1% (ESI +) /A= H ₂ O + AF 0.1% (ESI -) + FA 20 mM B= ACN + AF 0.1% – 10 % to 80 % B in 20min \rightarrow 90 % B in 1min \rightarrow hold (4min) \rightarrow 10% B in 8min	
Ostarine [48]	Column Kinetics Phenomenex (100x2.1 mm; 2.7 μ m) – Flow 0.2 mL/min – <u>Grad.</u> : A= H ₂ O+AA 5 mM – pH = 3.5; B= ACN 5 % to 100 % B in 12min \rightarrow hold (2min)	
Andarine [49]	Column Sunfire C8 (100x2.1 mm; 3.5 μ m) with Filtro (0.2 μ m) – Flow 0.35 mL/min (25 °C); Vol. Injection= 10 μ L <u>Grad.</u> : A= H ₂ O+FA 10mM pH=4; B= ACN; 5 %B (0 to 0.75 min) \rightarrow to 80 % in 4.25 min \rightarrow hold (1min) \rightarrow 5 % B in 1.5 min	
Andarine [50]	Column BEH C18 (100x2.1 mm; 1.7 μ m) – Pre-column BEH C18 (50x2.1 mm; 1.7 μ m) (30 °C) – Flow 0.4 mL/min; Vol. Injection= 10 μ L <u>Grad.</u> : A= H ₂ O + FA 0.1 %; B= ACN + FA 0.1 % 5 % to 40 % B in 15min \rightarrow 95% in 2min \rightarrow 5 % B in 3min	
APA-SARMS [47. 48]	Column monolithique RP C18(100x 3um) Vol. Injection= 50 μ L <u>Grad.</u> : A= H ₂ O ; B= MeOH; 30% to 90% de B in 10min with Flow de 0.9 mL/min	
Hidroxyflutamide [59]	Column Ultimate C18 (50x2.1 mm; 5 μ m) (30 °C) - Pre-Column Phenomenex C18 (4x3.0 mm; 5 μ m) - Flow 0.2 mL/min; Vol. Injection= 5 μ L <u>Hold</u> : H ₂ O/ACN 2: 1 (v/v) 4min	

V_{inj} : injected volume; **ESI**: electrospray ionization; **AA**: ammonium acetate; **AF**: acid formic; **FA**: ammonium formiate; **MeOH**: Methanol; **ACN**: Acetonitrile; **MSD**: Mass Spectrometer Detector.

Table 7. Parameters of mass spectrometry detectors considered for analysis of APA-SARMS.

SARMS	Condiclons de MS	
Ostarine [38]	MicroTof-Q y Triple Quadrupole Full scanESI (-/+) y SRM MS/MS; Capillary Voltage 2,5 kV; Source 120 °C; Desolvat. Temp 450 °C; Cone flow450 L/h; Gas de Desolvat. Flow 150 L/h; Gas CID: argon 2,2.10 ⁻³ mbar	
Ostarine [46]	LTQ	
	ESI (-): sheath gas 50 u; Spray 3,2 kV; Capillary Voltage -35V (300 °C) Lens tube -65V	ESI (+) (glucuronidated) sheath gas 50 u; Spray 3,2kV; Capillary Voltage 35V (300 °C) Lens tube 65V
Ostarine [48]	QTrap MS/MS ESI (-) Source 350 °C, -4 kV; Ionisation -3 kV; Capillary Voltage 290 °C; Full scan m/z 50 - 2000; Resolution 50000; Full scan 50 - 2000 m/z; Resolution 25000; HCD 20 V; Full scan 50 - 2000 m/z; Resolution 25000; HCD 40 V	
Andarine [49]	Screening: TSQ ESI (-) Colis. offset volt.: 20 V; Q1 y Q3 en 0,7 amu mass resolution Source temp 320 °C; spray 3 kV; Lens/tube 110 V; Q2 Gas Colis.: argon 0,2 Pa	
Andarine [50]	QTOF-MS ESI (-); m/z 100 - 1000: Desolvat. Gas flow 850 L/h (360°C); Capillary Voltage 2,4 kV; Voltage Cone 40 V; Micro-channel plates 1750 V; Source temp. 120 °C; Cone flow10 L/h; Gas Colis. 0,25 mL/min	
APA-SARMS [47, 48]	LTQ orbitrap APCI (+) full scan 100 - 500 m/z; tps scan: 1s; Tension decharge 5 kV; Desolvat. 300 °C; Cone voltage 30 V; Gas Nebul. (N ₂): 1 L/min; Resolution 60000 FWHM	
Hidroxyflutamide [59]	Q Trap ESI (-): -4200/-4500 V; Full scan m/z 70 – 1000; Source 275 – 350 °C; Gas Colis.: (N ₂) 6,10 ⁻³ Pa	

CONTROL METHOD FOR SARMS IN LIVESTOCK PRODUCTION

Reagents and solutions

Methanol, Ethanol and Acetonitrile HPLC grade were purchased from Fisher scientific (Pittsburgh, USA). Ultra-pure water ($> 18.4 \text{ M}\Omega/\text{cm}$) was obtained from Barnstead® NANOpure® ultrapure water purification system (Thermo Scientific). Acid formic was purchased from LGC Standards (Teddington, UK). β -Glucuronidase/Arylsulfatase (from *Helix pomatia*) stabilized aqueous solution for biochemistry (EC3.2.1.31+EC3.1.6.1) and Ammonium Acetate for analysis were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Standards of Enobosarm, Andarine, Bicalutamide and Hidroxyflutamide were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Louis, USA) and Bicalutamide-D4 was purchased from LGC Standards (Teddington, UK). Oasis® HLB extraction cartridges (3cc, 60 mg, 30 μm) were purchased from Waters (Milford, USA).

Standard Solutions

Primary stock standards solutions of each SARMS compound in ethanol at 1 mg/ml were prepared with a gravimetric procedure. Bicalutamide-D4 was used as internal standard (ISTD). Mixture and dilutions of Enobosarm, Andarine, Bicalutamide and Hidroxyflutamide were made to obtain properly concentrations. Standards solutions were stored to $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Instrumentation: Control Method for SARMS (LabERCA, ONIRIS)

Chromatographic separation was carried out on Acquity system UPLC (Waters, Milford, MA, USA). A column ACQUITY UPLC® BEH (2.1x100 mm; 1.7 μm) was used as stationary phase. Mass spectrometric analysis was performed using a triple quadrupole mass detector XEVO TQ-S (Waters, Milford, MA, USA) equipped with an electrospray ionization source operating in negative mode (ESI-). Data acquisition was performed using MassLynx 4.0 software (Waters,

Milford, MA, USA). A centrifuge Heraeus Multifuge X3FR (Thermo Scientific) was used for sample preparation (Annex I; page 105).

Sample Preparation

Urin samples were treated by a solid phase extraction (SPE) and faeces samples preparation involves a combination of liquid-liquid extraction (LLE) followed by SPE. Phase II metabolites were studied applying an enzymatic hydrolysis step (see Annex II ; page 110).

Method Performance

Parameters of *selectivity*, *linearity*, *accuracy*, *precision* and *sensibility* were studied in order to evaluate the performance of the method.

Blank samples were taken from non-treated animals and it were used for the construction of calibration curves and for recuperation assays.

The blank samples were spiked with different amounts of standard solutions and then were processed with a batch samples. Calibration curves were constructed for each compound using chromatograms areas ratio (S =analytes/ISTD) as a function of the concentration. The samples concentrations were determined by interpolation therefore calibration curves were made to cover different ranges of concentration for urines 0.25 – 30 ng/ml and for faeces 0.5 – 1600 ng/g.

Concentrations (C) were calculated as follow:

$$C = \frac{(S - b)}{a}$$

S : area ratio; b : intercept and a : slope of the equation of linear regression.

Linearity: was evaluated by *determination coefficient* (r^2) from the equation of linear regression of the calibration curves.

Accuracy: was evaluated as recovery (R %) at different concentrations levels in the calibration curves range, for urines between 0.25 – 30 ng/ml and for faeces 0.5 – 1600 ng/g. Another calibration curves were constructed adding different amounts of stock standard solutions to blank samples extracts. The recovery was calculated for each compound and to different level of

concentrations to evaluate the accuracy of the method. The recovery of the method was calculated as follow:

$$R\% = \frac{C}{C_{spiked}} \times 100$$

C: concentration calculated; **C_{spiked}**: spiked concentration.

Precision: was evaluated as relative standard deviation (RSD %) calculated from the triplicate analysis of spiked samples (urines: 0.25 – 30 ng/mL and faeces: 0.5 – 1600 ng/g).

Sensibility: was determined at the lowest level of calibration curves 0.25 ng/ml for urine and 0.5 ng/g for faeces. A ratio signal-to-noise more than 10 and recovery between 70 % – 120 % were fixed as acceptability criteria for each compound in both matrices.

Selectivity: was given by the HPLC-MS/MS method applying a Multiple Reaction Monitoring mode, relative retention time to the ISTD and the relative abundance ions. Blank sample chromatograms showed no interferences for the studied compounds.

BICALUTAMIDE AND ANDARINE IN ANIMAL TRIALS

The metabolism study was carried out through two animal trials described below (ver *First Animal Trial*, page 34 y en *Second Animal*, page 35).

First Animal Trial (Oniris-LabERCA)

In 10 mL of ethanol were dissolved 100 mg of Bicalutamide (CASODEX®) and then four times the volume of commercial apple juice was added. The oral dose was administrated by a syringe.

Sampling

Bicalutamide elimination study was approved by French Committee of Ethics (Protocol N° 02323.01). Urines and faeces samples of a healthy calf (race: Montbeliard, weight: 190 kg, age: 8.5 months) were taken before and after an oral dose of 100 mg of Bicalutamide at day 0. Sampling of faeces and urine started 3 days before the administration, every day until Day 7 (Figure 2). In addition, during Day 0: 3 samples were taken 8 a.m. (0 hours) 12 a.m. (4 hours) and 4 a.m. (8 hours).

Urines samples were stored at freezer (- 20 °C) until process, the faeces were immediately freeze-dried.



Figure 6. Animal N°4382 - calf (1st animal trial)

An oral dose of 100 mg of Bicalutamide was given to the calf. (breed Montbeliard, weight: 190 kg, age: 8.5 months).

Metabolites Study

The study of the metabolites was carried out by mixing extracts of matrices (urine and faeces) from the days: 1; 3; 5 and 7.

The strategy for this test was to combine the information obtained from different Scan modes (Precursor Ion Scan, Product Ion Scan, Neutral Losses Scan and Full Scan). After postulating structures candidate for metabolites, tests were performed on Multiple Reaction Monitoring and Single Reaction Monitoring to obtain more confidence on the structures proposed.

Second Animal trial (INTA – Anguil)

In this trial 3 pigs, Chetapuy breed (females) and 6 Angus cattle, had received the detailed doses in Table 8. The animals were in good health and the whole test was performed under veterinary supervision.

Sampling procedures based on the OIE Manual [60] were carried out by veterinarians of the Estacion Experimental Agropecuaria Anguil (INTA Anguil).

Oral doses of Bicalutamide and Andarine (dissolved in ethanol and diluted in apples juice) were administrated with syringes.

Table 8. Doses administrated on second animal trial

Animal N°	Weight (kg)	Treatment	Doses	Species
379	320	CDX	50 mg durante 5 days	Steer
421	340	CDX	200 mg	Steer
404	336	CTR	-	Steer
323	329	CTR	-	Steer
326	306	CTR	-	Steer
443	338	CDX	100 mg	Steer
334	108	CDX	100	Porcine
330	103	AND	100	Porcine
329	95	CTR	-	Porcine

CDX: Casodex®; AND: Andarine; CTR: control (no doses).



Figure 7. Steers (Angus) treated by Casodex[®] (2nd animal trial).

Table 9. Sampling on the second animal trial (2nd animal trial).

Day	Steers			Porcines		
	Sangre	Faeces	Urine	Sangre	Faeces	Urine
-3	X	X	X	X	X	X
-2	X	X	X	X	X	X
-1	X	X	X	X	X	X
0	X	X	X	X	X	X
0,17	X	X	X	X	X	X
0,33	X	X	X	X	X	X
1	X	X	X	X	X	X
2	X	X	X	X	X	X
3	X	X	X	X	X	X
4	X	X	X	X	X	X
5	X	X	X	X	X	X
6	X	X	X	X	X	X
7	X	X	X	No	no	No
8	no	No	No	X	X	X
9	X	X	X	No	no	No
10	no	No	No	X	X	X
11	X	X	X	No	no	No

Sampling

Urine, faeces and blood samples were taken before and after drugs administration (day 0) as shown in

Table 9. On day 0 extra samples were taken, at 4 and 8 hours after dosing.

The urine and faeces were preserved (- 20 °C) until they were processed in the laboratory. The blood was incubated at 25 °C for 1 hour, then centrifuged and finally separated the serum which was stored at - 20 °C.

Reagents and solutions

Methanol, Ethanol and Acetonitrile HPLC grade were purchased from Fisher scientific (Pittsburgh, USA). Ultra-pure water (> 18.4 MΩ/cm) was obtained from PureLab Classic ultrapure water purification system (Elga). Acid formic was purchased from Sigma-Aldrich. β-Glucuronidase/Arylsulfatase (from *Helix pomatia*) stabilized aqueous solution (EC3.2.1.31+EC3.1.6.1) was obtained from Roche and Ammonium Acetate for analysis were purchased from Sigma Aldrich.

Standards of Andarine, Bicalutamide and Hidroxyflutamide were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Louis, USA). Oasis[®] HLB extraction cartridges (3cc, 60 mg, 30 μm) were purchased from Waters (Milford, USA).

Preparation of standards solution

Primary stock standards solutions of each SARMS compound in ethanol at 1 mg/ml were prepared with a gravimetric procedure. Hidroxyflutamide was used as internal standard (ISTD). Mixture and dilutions of Andarine, Bicalutamide and Hidroxyflutamide were made to obtain adequate concentrations. Standards solutions were stored to -20 °C.

Sample preparation

Serum

Serum samples were thawed at room temperature. Serum (100 uL) were spiked with 50 uL of ISTD 2.5 ng/mL in water:acetonitrile (7:3; 0.1 % Formic acid) solution. To precipitate serum proteins a methanol:acetonitrile (1:1) solution (200 uL) was added and 15 seconds vortex mixed was carried on. Then samples were centrifuged at 19000 rcf for 20 min and the clear supernatant was injected.

Instrumentation (INTA Castelar)

Chromatographic separation was carried out on Acquity system UPLC (Waters, Milford, MA, USA). A C18 column XBridge (2.1x100 mm; 3.5 μm) was

used as stationary phase (Waters). Mass spectrometric analysis was performed using a single quadrupole mass detector XEVO SQD (Waters, Milford, MA, USA) equipped with an electrospray ionization source operating in negative mode (ESI-). Data acquisition was performed using MassLynx 4.0 software (Waters, Milford, MA, USA).

Chromatographic and mass spectrometric conditions

Chromatographic separation was achieved using a mobile phase of solution A (water with 0.1 % acid formic) and solution B (acetonitrile-methanol, 50:50 v/v, with 0.1 % acid formic). A gradient at a flow rate of 0.25 ml/min was employed starting at 90 % A (0-1 min); to 65 % A (1-2 min), to 45 % A (11 min), to 0 % A (11.01 min) and holding at 0 % A (12.5 min); to 90 % A (13 - 15 min). The injection volume was 10 µl. The autosampler temperature was set at 20 °C and the column was kept at 55 °C.

Mass spectrometer source temperature was set at 150 °C. Nitrogen was used as desolvation gas at a temperature of 350 °C and at a flow of 750 l/h. Capillary voltage was set at -2.9 kV. Andarine, Bicalutamide and Hidroxyflutamide were detected by Single Ion Monitoring (SIM) mode (Table 15).

The study of metabolites was performed using a mobile phase with Solution A: water with 0.1 % Formic Acid and 0.1 % Ammonium Formiate and Solution B: acetonitrile-methanol, 50:50 v/v, with 0.1 % acid formic. The flow rate was 0.25 ml/min and the gradient employed was 90 % A (0 – 1 min), 90 % to 70 % A (1 – 3 min), 70 % to 20% A (3 – 11 min), 20 % to 0 % A (11 – 13 min), hold at 0 % A (13 – 15 min), to 90 % B (15 – 16 min) and hold at 90 % A (16 – 18 min). The injection volume used was 10 µl. The autosampler temperature was set at 20 °C and the column was kept at 55 °C.

Table 10. Parameters of mass spectrometry used for study Bicalutamide and Andarine.

RT (min)	Compound	Ion	Cone (V)
8.01	Hidroxyflutamide	291.1 (Q)	40
		205.0 (q)	
8.60	Andarine	261.0 (q)	40
		440.1 (Q)	
9.20	Bicalutamide	429.1 (q)	30
		255.1 (Q)	

Ions and retention times (RT) used for Andarine, Bicalutamide e Hidroxyflutamide. (Q) Ion de quantification, (q) Ion de qualification.

Performance Method (2° animal trial)

Parameters of *selectivity, linearity, accuracy, precision* and *sensibility* were studied in order to evaluate the performance of the method.

Blank urines, faeces and serum samples were obtained from non-treated animals and to perform the calibration curves for each matrix blank samples from different animals were mixed to have a representative a blank sample.

Calibration curves were constructed using drawing signal (**S**) obtained as areas ratio ($S = \text{Area}/\text{Area}_{\text{STD}}$) and the spiked concentration. The covered ranges were: urines 0.5 – 200 ng/mL, faeces 2 – 3500 ng/g and serum 2 – 3000 ng/mL.

Linearity: was evaluated by *determination coefficient* (r^2) from the equation of linear regression of the calibration curves.

Accuracy: was evaluated as recovery (**R %**) at different concentrations levels in the calibration curves range, for urines between 0.5 – 200 ng/mL, for faeces 2 – 3500 ng/g and for serum 2 – 3000 ng/mL. Another calibration curves were constructed adding different amounts of stock standard solutions to blank samples extracts. The recovery was calculated for each compound and to different level of concentrations helped by *matrix matched calibration* [61,62])

Precision: was evaluated as the relative standard deviation (RSD %). The compounds concentration of each spiked sample was determined 3 times at

these levels to calculate the RSD%: urines 0.25; 0.5; 1; 3 y 10 ng/mL and for faeces and serum 1; 2; 5; 10 y 20 ppb (serum: ng/mL and faeces: ng/g).

Sensitivity: was determined at the lowest level of calibration curves a ratio signal-to-noise more than 3 and recovery between 70 % – 120 %.

Selectivity: was based on relative retention time of each analytes to ISTD and relative abundance of the ions described on Table 10. Blank sample chromatograms showed no interferences for the studied compounds.

SARMS Metabolites Study (INTA – EEA CONCORDIA)

Metabolites were studied with the collaboration of the Laboratory of INTA – Concordia (To Ríos, Argentina). In this study, urines and faeces samples of the second animal trial were treated as mentioned before XXX.

Instrumentation

Chromatographic separation was carried out on Acquity system UPLC (Waters, Milford, MA, USA). A column ACQUITY UPLC® BEH (2.1x100 mm; 1.7 µm) was used as stationary phase and mobile phase used was constituted by a gradient of solution A (water, 10% Acetonitrile and 0.1% formic acid) and solution B (Acetonitrile 0.1% formic acid). The gradient flow rate was 0.45 mL/min and starts with 100 % of solution A by 2.5 min then 0 % of solution A at 7.5 min, holding this condition by 1 min then initial condition in 1.5 min. Mass spectrometric analysis was performed using a triple quadrupole mass detector XEVO TQ-D (Waters, Milford, MA, USA) equipped with an electrospray ionization source operating in negative mode (ESI-). Data acquisition was performed using MassLynx 4.0 software (Waters, Milford, MA, USA). A centrifuge Heraeus Multifuge X3FR (Thermo Scientific) was used for sample preparation.

Results and discussion

CONTROL METHOD FOR SARMS IN LIVESTOCK PRODUCTION

Urines

Frozen samples were thawed at room temperature then to 3 ml of sample and 20 μ l of ISTD 0.1 ng/ μ l 3 ml ammonium acetate buffer (0.25 M; pH 4.8) were added in order to adjust the pH to 5 ± 0.3 . The pH was checked with pH indicator strip sand, if necessary, adjusted with acetic acid or sodium hydroxide. SPE cartridges were preconditioned with 2 x 3 ml methanol and 3 ml water. Samples were transferred to the cartridges. Immediately after, the SPE phases were washed with 3 ml solution water/methanol (95:5) followed 3 ml solution water/methanol (80:20). Analytes were eluted from the SPE cartridges with 4 ml methanol. Evaporation to dryness under a gentle stream of nitrogen at 45 °C was performed. Evaporation was followed by reconstitution in 0.2 ml of a 70:30 (v/v) water/acetonitrile with 0.1 % acid formic mixture. The method is presented in Figure 8.

Phase II metabolite were treated by an enzymatic hydrolysis. Urines (3 ml) were put in a tube and then 20 μ l of ISTD 0.1 ng/ μ L, 3 ml ammonium acetate buffer (0.25 M; pH 4.8) was added in order to adjust the pH to 5.0 ± 0.3 . The pH was checked with pH indicator strip sand, if necessary, adjusted with acetic acid or sodium hydroxide. Then 20 μ l β -Glucuronidase/Arylsulfatase was added before overnight (10 h) incubation at 50 ± 5 °C. Subsequent purification steps were performed as described above (Annex II; page 110)

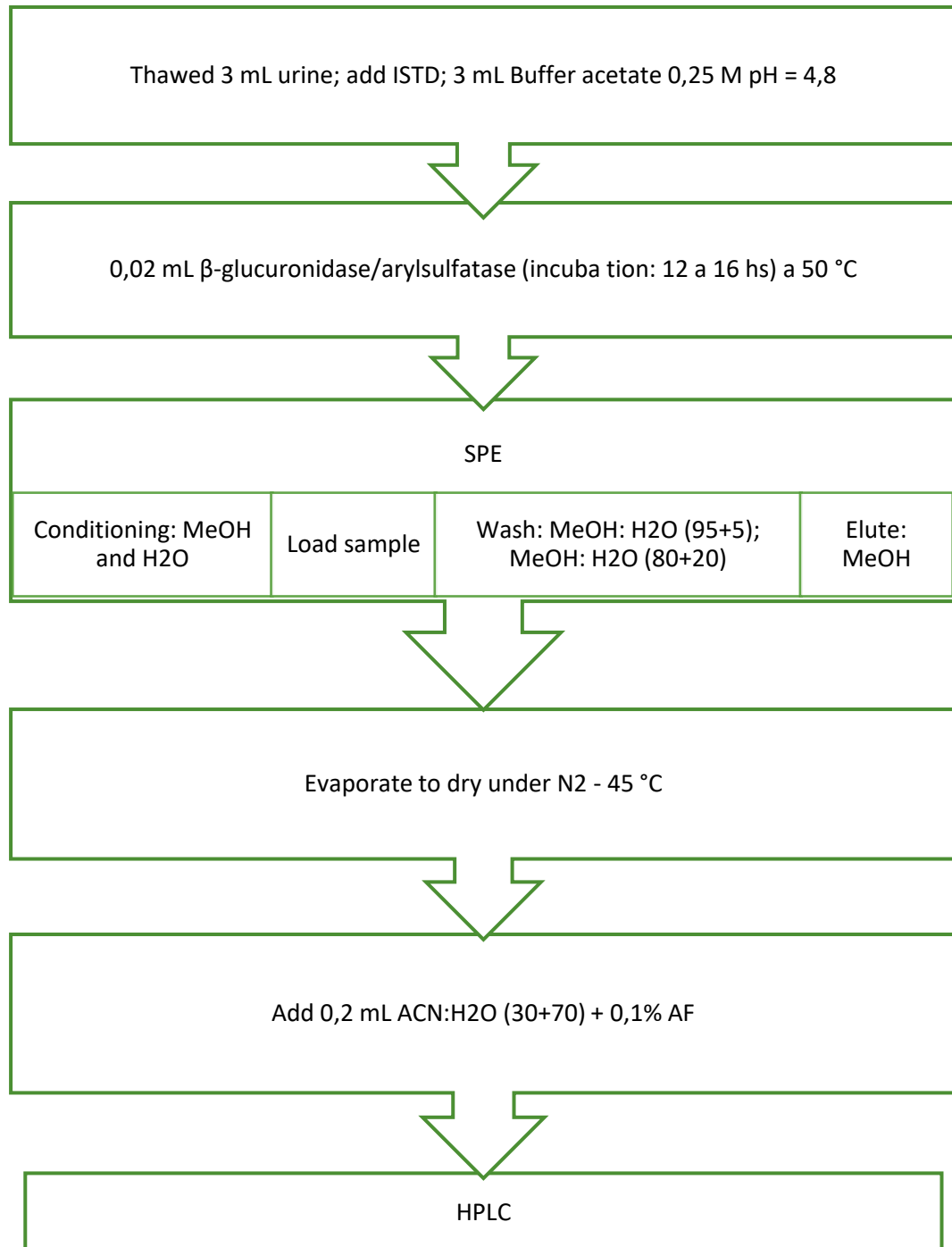


Figure 8. Method for Urines samples.

Faeces

Bicalutamide elimination study was carried out with the lyophilized samples. In a tube, 0.5 g homogenized portions were weighted, 4 ml ammonium acetate buffer (0.25 M; pH 4.8) and 20 μ l of ISTD 10 ng/ μ l were added. The pH was checked with pH indicator strip sand, if necessary, adjusted with acetic acid or sodium hydroxide. Next an agitation of 30 min followed by a centrifugation was made (20 min, 5500 r.p.m. and 5 °C). The liquid phase was centrifuged again (5 min, 2500 r.p.m., 5 °C) to avoid solids residues. Liquid phase was taken and was evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 45 °C. The residues were resuspended with 2 ml ammonium acetate buffer (0.25 M; pH 4.8).

SPE cartridge was preconditioned with 2 x 3 ml methanol and 3 ml water. Samples were transferred to the cartridges. Immediately after the SPE cartridges were washed with 3 ml solution water/methanol (95:5) followed 3 ml solution water/methanol (80:20). Analytes were eluted from the SPE cartridges with 4 ml methanol. Next, evaporation to dryness under a gentle stream of nitrogen at 45 °C was performed. Evaporation was followed by reconstitution in 0.2 ml of a 70:30 (v/v) water/acetonitrile with 0.1 % acid formic mixture. Finally, the purified were filtered 30 min with centrifugal Polyethersulfone membrane (10 K) at 17000 x g (Figure 9).

Phase II metabolites were deconjugated by an enzymatic hydrolysis. The lyophilized and homogenized samples were weighted in a tube (0.5 g) and 4 ml ammonium acetate buffer (0.25 M; pH 4.8) and 20 μ l of ISTD 10 ng/ μ l were added. The pH was checked with pH indicator strip sand, if necessary, adjusted with acetic acid or sodium hydroxide. Then an agitation of 30 min followed by a centrifugation was made (20 min, 5500 r.p.m. and 5 °C). The liquid phase was centrifuged again (5 min, 2500 r.p.m., 5 °C). Liquid phase was taken and was evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 45 °C. The residues were resuspended with 2 ml ammonium acetate buffer (0.25 M; pH 4.8). The tube was incubated overnight (10 h) with 20 μ l of β -Glucuronidase/Arylsulfatase added. Subsequent purification steps were performed as described above (see Annex II; page 110).

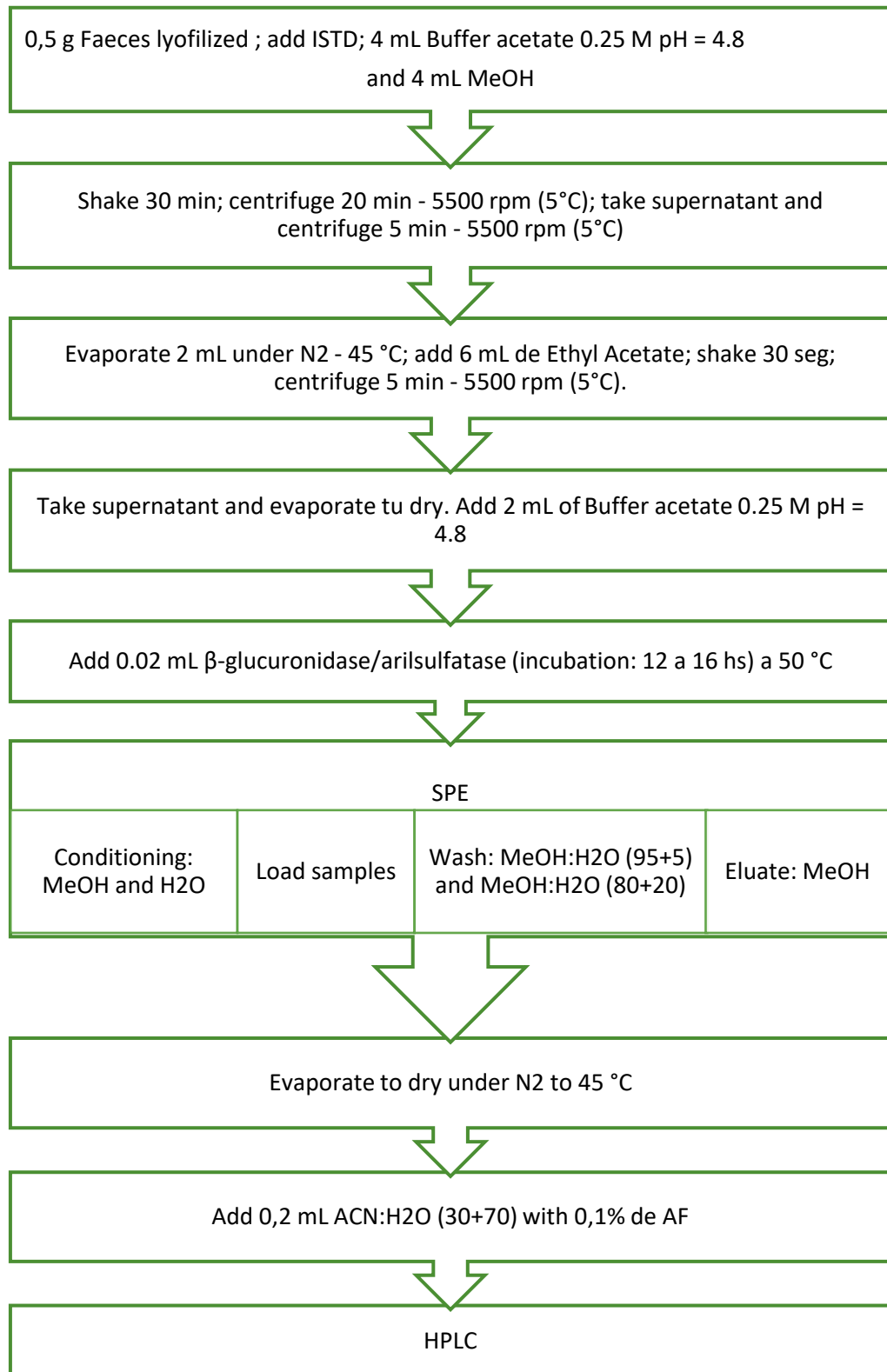


Figure 9. Method for faeces samples.

Evaluation of method performance

Table 11 presents the chromatographic parameters employed for the performance evaluation, more information are presented in Annex I. Annex III (page 114) presents data used for the performance evaluation.

Table 11. Parameters used for SARMS during method development.

RT (min)	Analyte	Transitions	Cone (V)	Collision (eV)
2.81	Hidroxyflutamide	291.1>205.0 (Q)	40	24
		291.1>175.0 (q)		32
		291.1>155.0 (q)		36
3.02	Andarine	440.1>150.0 (Q)	40	26
		440.1>261.0 (q)		18
		440.1>205.0 (q)		32
3.44	Bicalutamide- D4	433.1 > 255.0 (Q)	30	16
		433.1 > 185.0 (q)		44
		433.1 > 177.0 (q)		24
3.46	Bicalutamide	429.1 > 255.1 (Q)	30	16
		429.1 > 185.0 (q)		44
		429.1 > 173.0 (q)		24
3.96	Ostarine	388.1>118.0 (Q)	30	18
		388.1>269.0 (q)		18
		388.1>185.0 (q)		38

Enobosarm, Andarine, Bicalutamide, Bicalutamide-D4 y Hidroxyflutamide, (Q) Transitions of quantification, (q) transitions of qualification.

Table 12 shows the parameter obtained during the performance evaluation. Results show proper performance of the method ($120\% > R\% > 70\%$; $r^2 > 0.99$; $RSD\% < 20\%$) in the range of concentrations studied 0.25 – 30 ng/mL para Urine y 0.5 – 1600 ng/g para faeces (Decision 2002/657/EC) [38, 45].

Sensitivity expressed as limit of quantification (LQ or LOQ) was 0.25 ng/mL for urines and 0.5 ng/g for faeces. These levels of concentration are appropriate, taking into account that the European recommendation (CRL Guidance Paper 2007) for anabolic steroid substances in urine was 0.5 ng/mL [38]. In the case of faecal matter, there are no recommendations [38] for steroid anabolic agents.

Table 12. Parameters obtained during the performance evaluation.

Urine				
	Hidroxyflutamide	Enobosarm	Bicalutamide	Andarine
a	1.4176	0.9815	0.9604	0.3593
b	0.1774	0.0859	0.1529	0.0471
r²	0.998 ± 0.002	0.998 ± 0.002	0.999 ± 0.007	0.999 ± 0.006
RSD (%)	0.6 - 11.6	2.4 - 7.1	1.8 - 6.6	4.4 - 17.9
R%	97 - 118	73 - 118	95 - 111	71 - 107

Faeces				
	Hidroxyflutamide	Enobosarm	Bicalutamide	Andarine
a	0.7532	0.5833	0.6086	0.2108
b	0.7926	0.3069	0.4191	0.1650
r²	0.996 ± 0.003	0.993 ± 0.005	0.996 ± 0.003	0.996 ± 0.002
RSD (%)	1.6 - 10.9	2.8 - 13.9	1.6 - 10.9	0.6 - 18
R%	88 - 115	85 - 117	83 - 109	74 - 108

Figure 10 presents chromatograms showing sensitivity, specificity and selectivity achieved by the method at low concentrations. The absence of interference (peaks) in blank samples and also a very good signal at the lowest tested concentrations can be observed.

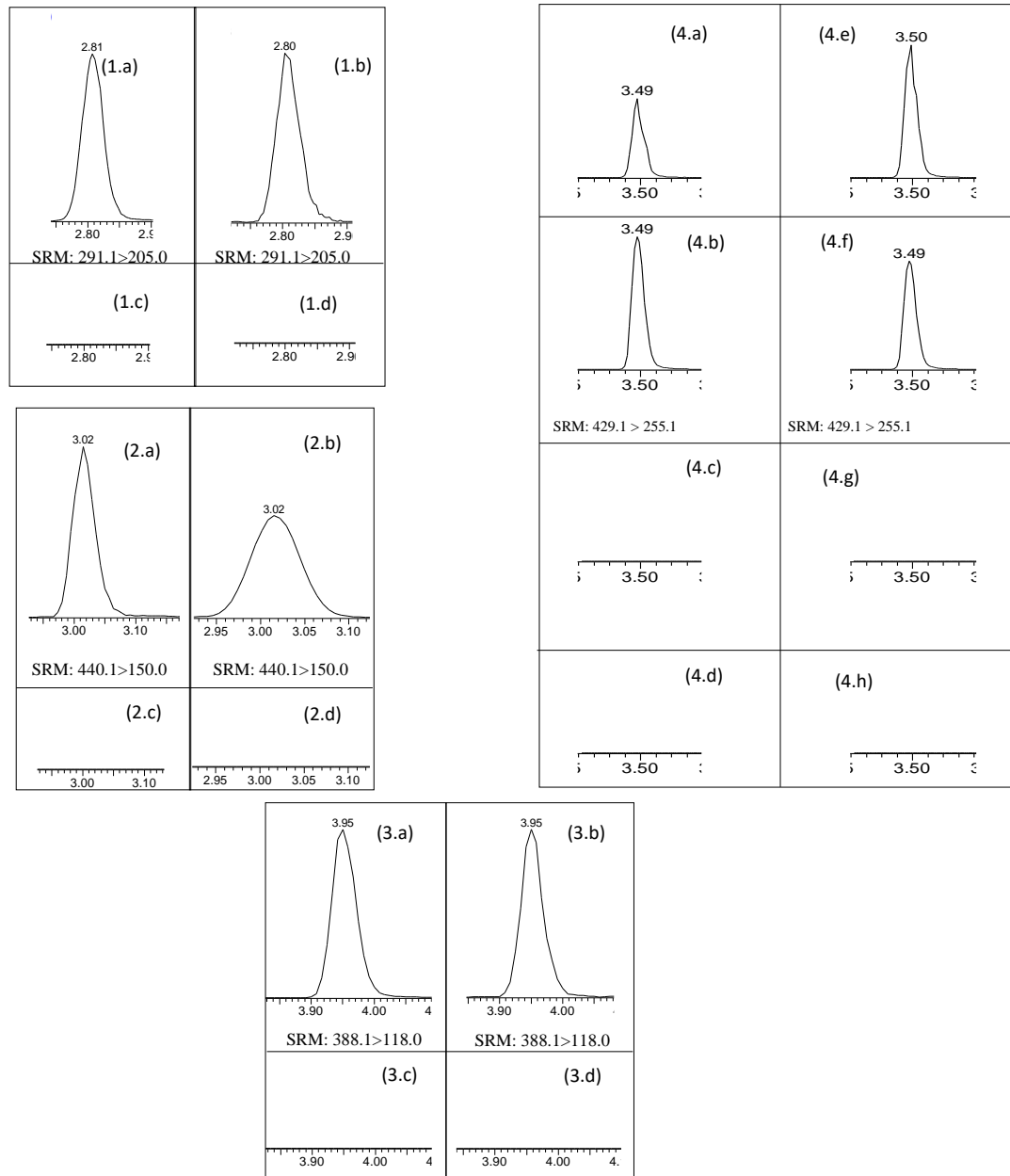


Figure 10. Cromatogramas SRM used for quantification of SARMS.

(1.a) Extract of Blank Urine with addition of Hidroxyflutamide (0.25 ng/mL); (1.b) Extract of blank faeces with addition of Hidroxyflutamide (0.5 ng/g); (1.c) Extract of Blank Urine; (1.d) Extract of blank faeces; (2.a) Extract of Blank Urine with addition of Andarine (0.25 ng/mL); (2.b) Extract of blank faeces with addition of Andarine (0.5 ng/g); (2.a) Extract of Blank Urine; (2.d) Extract of blank faeces; (3.a) Extract of Blank Urine with addition of Enobosarm (0.25 ng/mL); (3.b) Extract of blank faeces with addition of Enobosarm (0.5 ng/g); (3.c) Extract of Blank Urine; (3.d) Extract of blank faeces; (4.a) Extract of Urine of treated calf, after administration of Casodex (day 1); (4.b) Extract of Blank Urine with addition of Bicalutamide; (4.c) Extract of Blank Urine; (4.d) Extract of Urine of treated calf, before administration of Casodex (day -3); (4.e) Extract of Urine of treated calf, after administration of Casodex (day 1); (4.f) Extract of Blank Urine with addition of Bicalutamide; (4.g) Extract of Blank Urine; (4.h) Extract of Urine of treated calf, before administration of Casodex (day -3).

Conclusions Partial:

- An analytical method for the study of Enobosarm, Hidroxyflutamide, Bicalutamide and Andarine was developed in urine and bovine faeces, The limit of quantification was 0.25 ng/mL for urine and 0.5 ng/g for faeces.
- The proposed method of processing for urine is simpler than for faeces. This was expected considering that faecal matter is a more complex matrix (heterogeneous and more content of protein, lipid, etc.). As a consequence faeces requires more work to eliminate possible interference or substances that could contaminate/deteriorate the instrumental equipment. For this reason the time taken for faeces analysis is double, especially due to evaporation stages.
- An analyst on a working day of 8 hours, applying the proposed protocols, could process up to 12 stool samples or up to 24 urine samples. In the case of enzymatic hydrolysis, we should consider overnight incubation.
- The proposed methods showed satisfactory performance for regulatory requirements in terms of linearity, sensitivity, precision, accuracy, selectivity and specificity. Consequently, the methodology developed is capable of being applied in the bovine production with the purpose of controlling use of Bicalutamide, Ostarine, Hidroxyflutamide and Andarine, in urine and faeces.
- It should be noted that this is the first work that studies the elimination of Bicalutamide in cattle and uses the faecal material as a matrix for its control in livestock production.

METABOLITE STUDY OF BICALUTAMIDE AND ANDARINE

First animal trial (Bicalutamide)

Bicalutamide Quantification in urines and faeces

The results obtained for Bicalutamide in urine and faeces during the 7 days of the test are presented in Figure 14 and more details are presented in the tables of Annex IV (page121). As expected, no Bicalutamide was detected in the samples before the treatment. Four hours after oral administration, Bicalutamide was already detected in urine and faeces. In urine, Bicalutamide concentration increased quickly to show the maximum at day 1 as follows: free form, 13.15 ng/ml and for the addition of free and deconjugated forms total: 17.36 ng/ml, attesting for the metabolisation of the drug under phase II metabolites. Both Bicalutamide forms (free and total) exhibited similar elimination profiles, they increase quickly to day 1 and the decreasing was slow afterwards. In faeces, Bicalutamide elimination was observed in greater proportion than in urine. Indeed, at day 1 the concentrations reached the ppm level (free= 1254.11 ng/g; total= 1346.66 ng/g). In faeces also, conjugated forms could be highlighted.

Studies obtained in some laboratory animals describe an excretion similar to that found in this work with a greater elimination of Bicalutamide in the first days of post-administration [18, 63].

The concentrations found in faeces were much higher than in urine. However, the relative increase for day 1 was higher in urine (4hs= 19 %; 8hs= 49 %) than in faeces (4hs=1 %; 8hs=19 %). Early urinary augmentation could be explained because Bicalutamide has 2 isomers (R and S) of which the S isomer has little biological activity and would be rapidly eliminated with minimal metabolic changes. Then the elimination would start quickly with the S isomer by urine [19, 63]. In contrast, R-Bicalutamide excretion is slow because of its metabolism that includes enterohepatic recirculation with biliary excretion [27]. This behaviour would probably be applicable to the bovine studied since

in Figure 11 (a) and (b) it can be seen that during the first 3 days we have the highest concentration values.

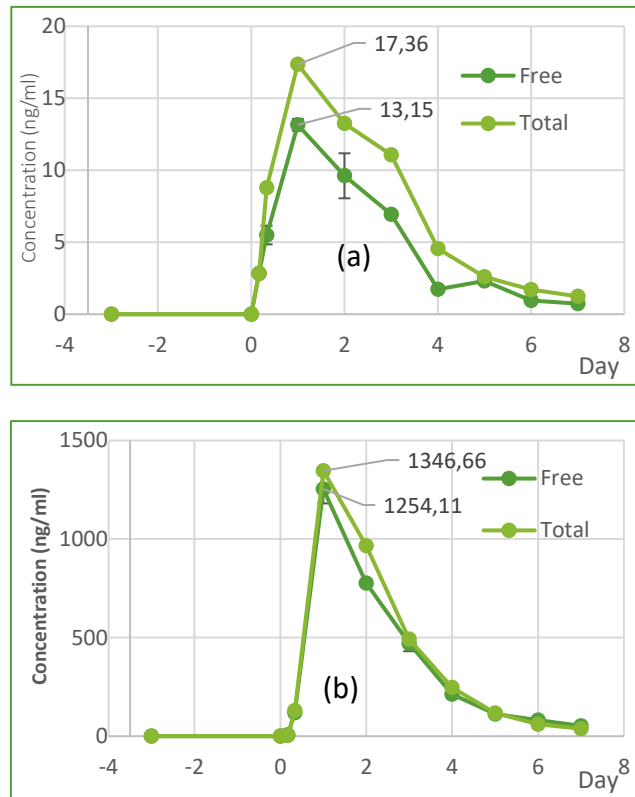


Figure 11. Excretion profile of Bicalutamide in faeces (a) y Urine (b).

Metabolites study

Figure 11 (a) y (b) present the concentration results for Bicalutamide *free* and Bicalutamide *total* (free + released, by enzymatic action). *Total* Bicalutamide curve is parallel to the *free* and during the whole test is above but always very close. It would be explain because the free (released without modifications) is eliminated in greater amount than conjugate (such as glucuronide, sulfate, etc.) in both matrices (urine and faeces). It is also possible to observe conjugated Bicalutamide in urine and faeces, performing subtraction of less free total. The presence of Bicalutamide *free* without modification in faeces could also be explained because a part of conjugated Bicalutamide is excreted in bile and the digestive flora would release the Bicalutamide from its conjugation [27].

Table 13 shows the results of the analysis carried out for the search of Bicalutamide metabolites with the mass spectrometry detector, searching with the different SCAN modes and confirming in SRM mode. The quasi-molecular ions $[M-H]^-$ can be observed with the related ions and the transitions confirmed by SRM are indicated.

The search focused on previous works identifying characteristic ions [18, 19, 38], $m/z = 185, 255, 159, 173, 621, 445, 525, 411$ (Annex IV; page 121).

Table 13. Bicalutamide Metabolites found in the treated calf.

	M1	M2	M3	M4	M5
[M-H]⁻	605	621	445	509	525
Related Ions (m/z)	587	603	427	491	507
	561	445*	409	411	445*
	543	427*	185*	173*	427*
	429*	365*	255*	185*	255*
	411*	185*	189*	255*	185*
	193*	255*		429*	175
	185	175			189
	255	189*			
	159*	271*			
	173	201*			
		173			
		159			

Figure 12 presents a composite chromatogram constructed by the sum of the SRM (total current ion, TIC) obtained in the analysis of the extracts mixture prepared as described in Metabolites Study (page 35).

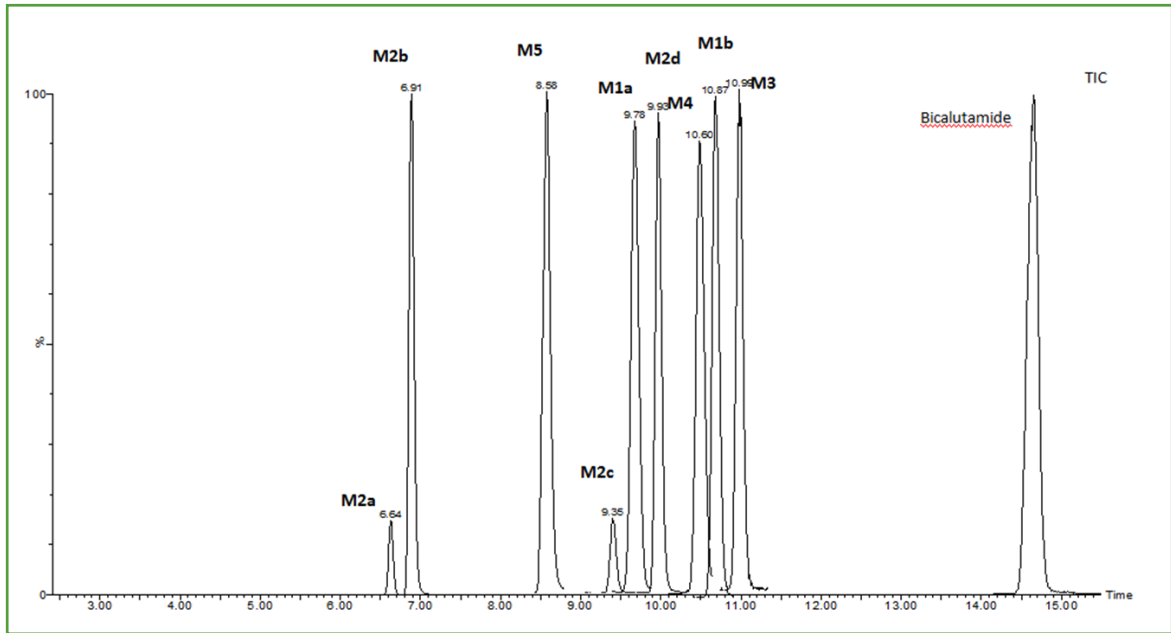


Figure 12. Composite Chromatogram constructed by TICs (1° trial)

TICs: M1a – M1b: 605>159 + 605>193 + 605>411; M2a – M2b: 621>185 + 621>255 + 621>445; M2c – M2d: 621>201 + 621>445 + 621>271; M3: 445>185 + 445>189 + 445> 255; M4: 509>173 + 509>185 + 509>255; M5: 525>185; 525>255; 525>445; Bicalutamide: 429,1>173,02 + 429,1>185,04 + 429,1>255,1.

After analyzing mass spectrometry information and bibliographic data, the metabolites found were 5. The following structures were proposed:

Metabolite 1 (M1): It has been attributed to glucuronated Bicalutamide observed under its deprotonated form (Figure 13). It showed relations with the following fragment ions: a) M1 losing water, $m/z = 587$; b) M1 losing formiate, $m/z = 561$, followed by a loss of water, $m/z = 543$. It also showed: Bicalutamide characteristic fragments, $m/z = 429$, 411 and fragment: $m/z = 193$, which is consistent with glucuronides moieties. M1 generated fragments corresponding to both Bicalutamide rings without changes which is consistent with the glucuronidation at the tertiary alcohol of Bicalutamide as follows: a) ring tri-fluoro-methyl substituted, $m/z = 185$, 255 and b) ring mono-fluoro substituted, $m/z = 159$, 173. M1 has already been observed and reported in previous studies [18, 19, 63].

Figure 12 shows two chromatographic peaks for M1 SRM transitions, M1a (9.78 min) and M1b (10.87 min), but this study has no evidence to confirm

which peak correspond to R and S Bicalutamide forms. Figure 13 presents a probable structure for M1, but the present work could not indicate the real position of glucuronic acid (Gluc).

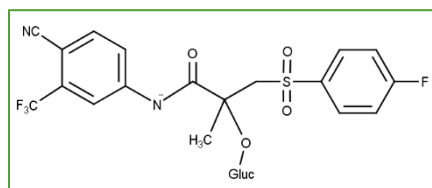


Figure 13. Proposed structure for M1 ($m/z = 605$).

Metabolite 2 (M2): It corresponds to hydroxylated and glucuronated Bicalutamide deprotonated form, M2 (Figure 14). It showed relations with the follow fragments: a) Bicalutamide hydroxylated, $m/z = 445$; b) Bicalutamide hydroxylated losing water, $m/z = 427$. It was also found $m/z = 643$, consistent with the sodium adducted of M2. M2 was reported in previous studies. [18, 19, 28, 63]. Figure 12 shows four peaks (M2a, M2b, M2c and M2d) for M2 - MRM transitions. It could suggest mono-hydroxylation with glucuronidation could happen at each ring for the isomer R and S. The limitations of this study not allow suggesting wich of these peak correspond to S or R forms. M2a (6.6 min) and M2b (6.9 min): showed fragments corresponding to the tri-fluorate- methyl substituted ring without changes, $m/z = 185, 255$ and fragments consistent with the mono-fluorate substituted ring hydroxilated ($m/z = 175, 189$) and glucuronated ($m/z = 365$). M2c (9.3 min) and M2d (9.9 min): showed fragments corresponding to the mono-fluorate substituted ring without changes $m/z = 159, 173$ and fragments consistent with the tri-fluorate- methyl substituted ring hydroxilated ($m/z = 201, 271$).

Figure 14 shows 2 possible location alternatives for glucuronic acid (Gluc). This Figure does not propose an exact structure since the information provided by the mass spectrometry detector is not sufficient.

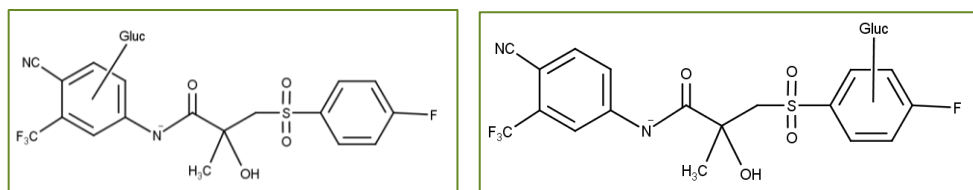


Figure 14. Proposed structure for M2 ($m/z = 621$).

Metabolite 3 (M3): Corresponding to the deprotonated form of Bicalutamide hydroxylated, M3, $[M-H] = 445$ (Figure 15). It was reported in previous studies [19, 63].

M3 showed relations with the follow fragments: M3 losing water molecules, $m/z = 427$ y $m/z = 409$. M3 also showed relations with the unchanged tri-fluorated-methyl ring, $m/z = 185$, 255 and fragments consistent with the hydroxylated monofluorate ring ($m/z = 189$).

Figure 15 shows a probable chemical structure of M3 consistent with the mass spectra information obtained. Hydroxyl can be assumed to be in the monofluorinated ring but the exact position cannot be known.

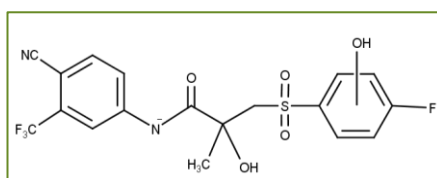
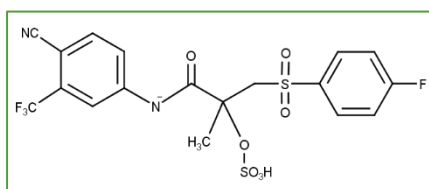


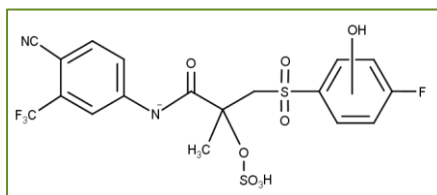
Figure 15. Proposed structure for M3 ($m/z = 445$).

Metabolite 4 (M4): Corresponding to the deprotonated form of Bicalutamide sulfated, M4 (Figure 16). It showed a fragment consistent with losing water, $m/z = 491$, and characteristics fragments of Bicalutamide, $m/z = 429$ y 411. It showed relations consistent to the both unchanged rings of Bicalutamide, $m/z = 173$, 185 y 255, it suggest the sulfate is located at the tertiary alcohol of Bicalutamide.

Figure 16 shows a probable chemical structure of M4 consistent with the mass spectra information obtained.

Figure 16. Proposed structure for M4 ($m/z = 509$).

Metabolite 5 (M5): Corresponding to the deprotonated form of hydroxylated and sulfated Bicalutamide, M5 (Figure 17). It showed fragments consistent with: a) M5 losing water, $m/z = 507$; b) deprotonated form of Bicalutamide hydroxylated, $m/z = 445$ and c) the deprotonated form of Bicalutamide hydroxylated losing water, $m/z = 427$. M5 also showed fragments corresponding to the tri-fluorated-methyl ring without changes $m/z = 185$, 255 and fragments consistent with the monofluorate ring hydroxylated ($m/z = 175$, 189) suggesting sulfate was located at the monofluorate ring hydroxylated. Figure 17 shows a probable chemical structure of M5 consistent with the mass spectra information obtained.

Figure 17. Proposed structure for M5 ($m/z = 525$).

Metabolites elimination

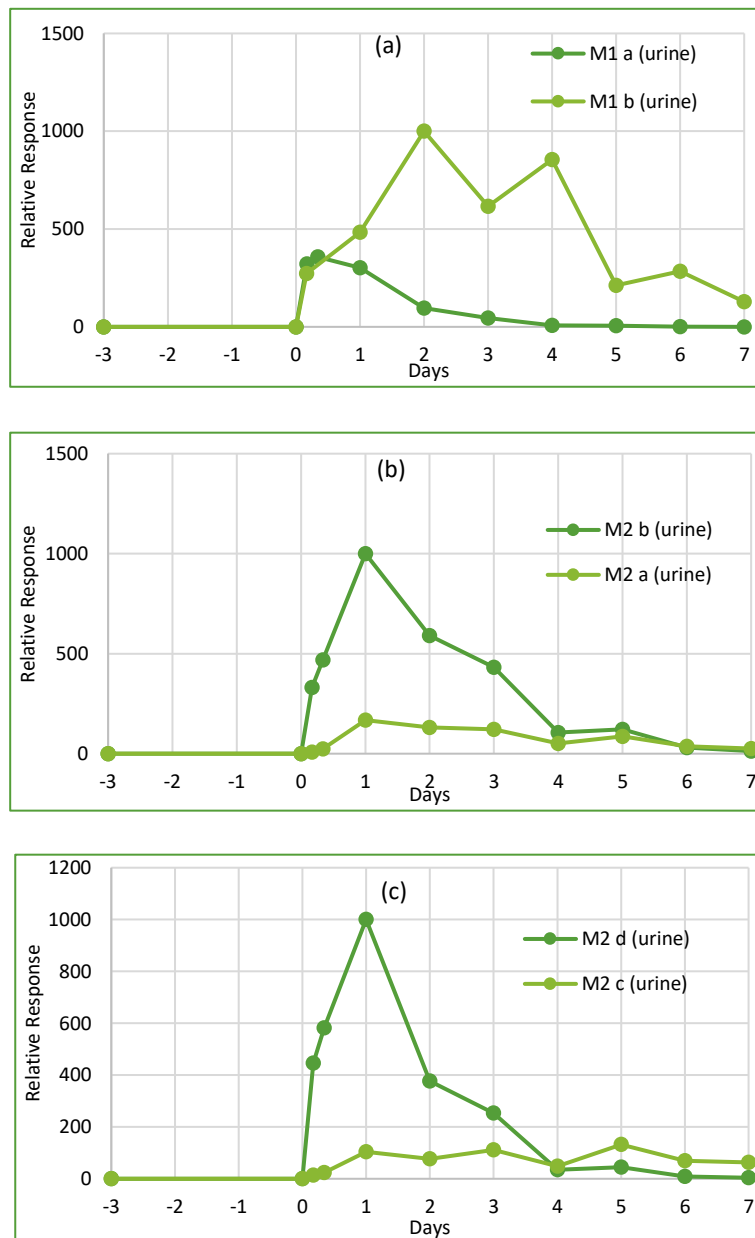
Table 14 shows the MRM used to establish the time windows for each metabolite found in the samples.

Table 14. Transitions used for the construction of excretion profiles.

	[M-H] ⁻	MRM (m/z)		
M1	605	605>411	605>193	605>159
M2	621	621>185	621>255	621>189
M3	445	445>185	445>255	445>189
M4	509	509>173	509>185	509>255
M5	525	525>445	525>255	525>185

Below are the metabolite excretion profiles obtained from chromatographic analysis (Figure 18). In the absence of standards for each metabolite, the signal cannot be transformed into units of concentration. For this reason the following figures are constructed on an arbitrary basis, where the signal of each Figure is relative to the maximum metabolite signal. However, these Figures are very important since they show which metabolites are characteristic of each matrix and in addition, how long each metabolite is detectable by determining the temporal window.

Figure 18. Excretion profile of Bicalutamide metabolites.



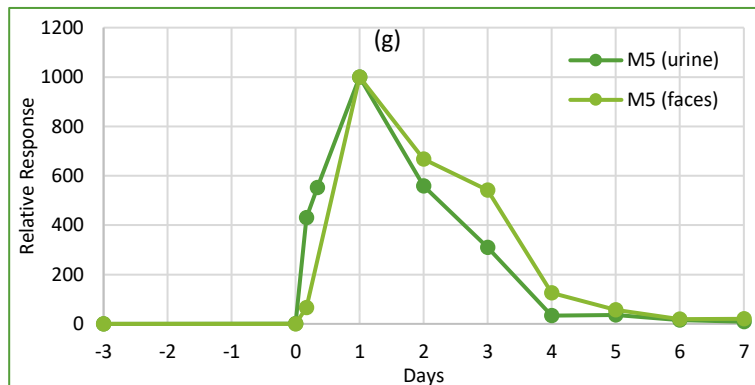
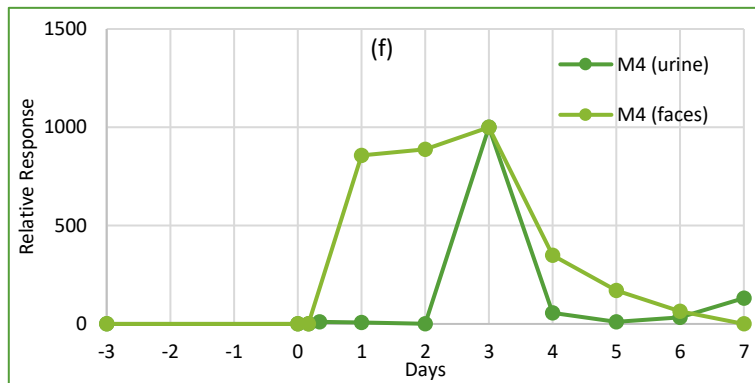
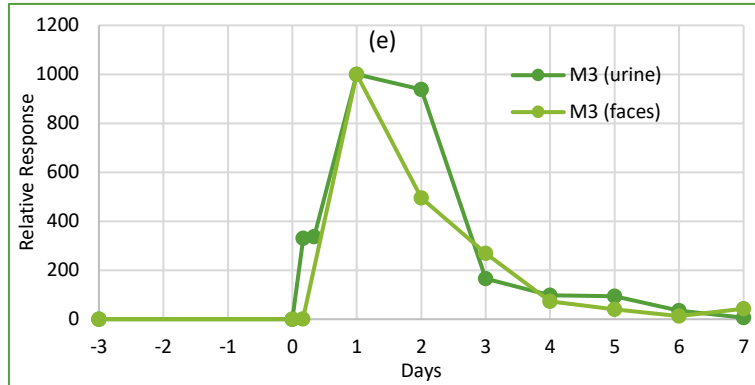
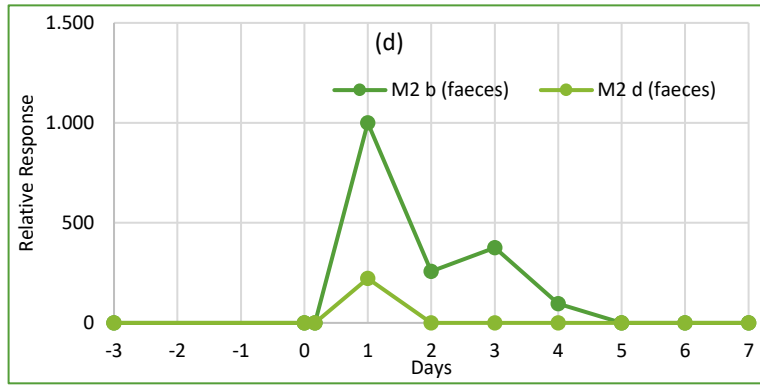


Figure 18 (a), (b), (c), (d), (e), (f) y (g) show the results obtained in this part of the study, presenting the variation of the relative response during the trial (days).

M1: In urine, M1a and M1b start its quick increasing 4 hs after the administration of Bicalutamide (Figure 18 (a)). The maximum for M1a was at 8 hs after the administration follow by a slow and marked decreasing. M1b show the maximum to day 1, its decreasing was the slower than M1a. In faeces, M1a and M1b were not found.

M2: In urine, M2a and M2c show a slow increasing until day 1 and then they maintain the response. M2b and M2d show a quick and big increasing with a maximum at day 1 follow by a slow decreasing even with a response similar to M2a and M2c at day 4 and lower at day 6 and 7 (Figure 18 b y c).

In faeces, M2d was found just at day 1 with a 22 % of the signal of M2c. M2c shows his first value at day 1 then decrease and since day 5 was not detected (Figure 18 d).

M3: In both matrices, the increasing starts 4 hours after the Bicalutamide administration and the maximums were found at day 1. The decreasing was slower than the increasing (Figure 18 e).

M4: In urine, the relative response was low during the trial and it shows a peak at day 3. In faeces, the increasing starts 4 hours after the Bicalutamide administration and it shows the peak at day 3 (Figure 18 f).

M5: In both matrices, the maximum were at day 1. In urine, the peak was almost symmetric while in faeces it increased quickly and it decreased slowly (Figure 18 g).

The Bicalutamide and its metabolites behaviour as observed in this studied are in agreement with observations reported in rat, mouse and rabbit, where the maximum Bicalutamide concentration was recovered in 48hs in rat mouse and rabbit (25). The relative responses found in this study between different peaks, mainly M2, were consistent with enantioselective metabolism of Bicalutamide in others animal (25) and men (24).

The results found demonstrate that main metabolites of Bicalutamide in calf result from hydroxylation and the phase II reactions. The observed metabolic pathways are similar to other APA-SARMs (10, 16, 29, 31, 32).

Because of the low aqueous solubility of Bicalutamide (< 5 mg/L) a low occurrence of the drug in excreta would be expected. However, as noted in the results presented and previous studies show a slow elimination explained by an intense absorption of the drug.

The results indicate an intense metabolism of the drug that includes oxidative modifications, sulfated and glucuronated derivatives. The metabolites found can be explained by described reactions for other APA-SARMs [34, 36, 46, 49, 54].

There was also a large excretion of the drug without changes in urine and faeces. These results are confirmed by previous work in laboratory animals and humans [18, 19, 63]. However, in laboratory animals other authors highlight the appearance of a majority urinary metabolite that was not found in this trial. Also, the metabolites from the cleavage of amide bond, described by other authors were not found in this study [18, 19, 63].

Maximum concentrations found in faeces and urine within the first 24 hours are consistent with previous work performed on humans and laboratory animals [18, 63]. In rat, mouse and rabbit the recovery of most part of the administered drug is obtained in the first 48 hs [18, 19, 63].

In addition, the data obtained (especially for M2) support the hypothesis of a metabolism with enantio-selectivity as reported in other species [18], including humans [63]. The signal intensity of M1 and M2 in faeces would refer more to contamination (during sampling or laboratory manipulation of the sample) than to a true faecal excretion of these glucuronides [18, 19, 63].

The metabolites found in urine and the prolonged time of excretion would support the existence of an intense intestinal reabsorption proposed by other authors [18, 19, 63]. This explains much of the persistence attributed to this drug.

Higher concentrations of Bicalutamide in faeces may be related to the removal of faecal water during the lyophilisation process although some

previous work in laboratory animals indicates a significant excretion of Bicalutamide in faeces [18, 27]. In our case it is possible that both effects are simultaneous.

For metabolites M4 and M5 no previous bibliographic description was found. The observed differences could be explained by the metabolism of the animal and the studied breed or by the methodological differences used [38] [64].

Partial Conclusions:

- The variation in Bicalutamide concentration in urine and faeces was determined after oral administration of 100 mg of Bicalutamide. In both matrices a rapid increase is observed, reaching a maximum on day 1 (13.15 ng/mL in urine and 1254.11 ng/g in faeces) and a slow decrease in concentration until day 7 (0.72 ng/mL in urine and 52.90 ng/g in faeces).

- These data support the use of urine and faeces as useful matrices for the control of this drug and probably for other APA-SARMS in livestock practices.

- Both studied matrices presented metabolites from Phase I and Phase II reactions. The metabolites found come from hydroxylation and conjugation reactions. Some metabolites found were previously described on in-vivo trials in humans and laboratory animals (rat, dog, rabbit and mice).

- The metabolites found can be explained by described reactions for other APA-SARMS.

- The largest variety of metabolites were found in urine showing their maximum within 48 hours after administration of the drug. Only M4 (derived sulphate) showed its peak on day 3 for urine and faecal matter. After day 4 the metabolites are close to 10 % of its maximum intensity, except Bicalutamide, M1b, M2b and M2c which are kept above (in urine).

- Based on the results, the analytical control of Bicalutamide should be carried out by studying in urine M2, M5 and M3; in faeces M3. However, Bicalutamide without modification is the best candidate since it presents large

signal, it is detectable until the end of the test and it is possible to quantify because of it has a standard.

- This work constitutes the first study of Bicalutamide elimination in bovine animals, the first to propose the faeces as matrix of analysis and the first to describe the presence of M4 and M5.

Second animal trial

Excretion study of Bicalutamide, Andarine and its metabolites

Chromatographic equipment for the analysis of excretion on this animal trial was different from the first trial and for this reason the performance was evaluated by: *Linearity, Accuracy, Precision, Sensibility and Selectivity*.

Method Performance (INTA – Castelar)

Table 15 shows chromatographic and mass spectrometric parameters used for the identification and quantification of the APA-SARMS. Annex VI presents the development of this parameters (page 124).

Table 16 presents a summary of the results of the parameters calculated for the 3 matrices.

The parameters obtained for the study were satisfactory in all cases, in a wide range of tested concentrations (urine: 0.5 - 200 ng/mL; faeces: 2 - 3500 ng/g; serum: 2– 3000 ng/mL), for Bicalutamide and Andarine:

- Coefficients of determination (r^2) > 0.98
- Recoveries between 70 % - 120 %
- Relatives Standard Deviation (RSD %) < 20 %
- Interferences were not observed on the 3 studied matrices.

Annex VII (page 127) presents tables and more information about this evaluation.

Figure 19 presents SIM (Single Ion Monitoring) chromatograms of spiked blank samples using stock standards solutions (5 ng/mL) urines 0.5 ng/mL, faeces: 2 ng/g and serum: 2 ng/mL.

Table 15. Parameters of mass spectrometry used for SARMs (2° trial).

RT (min)	Analitos	Ions	Cono (V)
8.01	Hidroxyflutamide	291.1 (Q)	40
		205.0 (q)	
8.6	Andarine	261.0 (q)	40
		440.1 (Q)	
9.2	Bicalutamide	429.1 (q)	60
		255.1 (Q)	

Single Ion Monitoring used for Andarine, Bicalutamide and Hidroxyflutamide. (Q) Ion of quantification, (q) Ion of qualification.

Table 16. Parameters obtained the performance evaluation (2nd trial).

	Urine	
	Bicalutamide	Andarine
a	0.0626	0.0099
b	-0.5630	-2.6763
r²	0.9987 ± 0.0018	0.9988 ± 0.0014
R %	84.3 – 112.1	80.4 – 108.8
RSD %	3.5 - 13.4	4.9 – 12.0

	Faeces	
	Bicalutamide	Andarine
a	0.0548	0.0076
b	1.2819	0.1190
r²	0.9914 ± 0.0083	0.9993 ± 0.0008
R %	86.7 - 110.8	82.1 - 108.1
RSD %	5.3 - 12.1	5.6 - 10.7

	Serum	
	Bicalutamide	Andarine
a	0.0022	0.0016
b	-0.0037	0.0278
r²	0.9994 ± 0.0023	0.9986 ± 0.0013
R %	82.7 - 110.5	86.5 - 109.4
RSD %	5.3 - 11.9	7.7 - 11.3

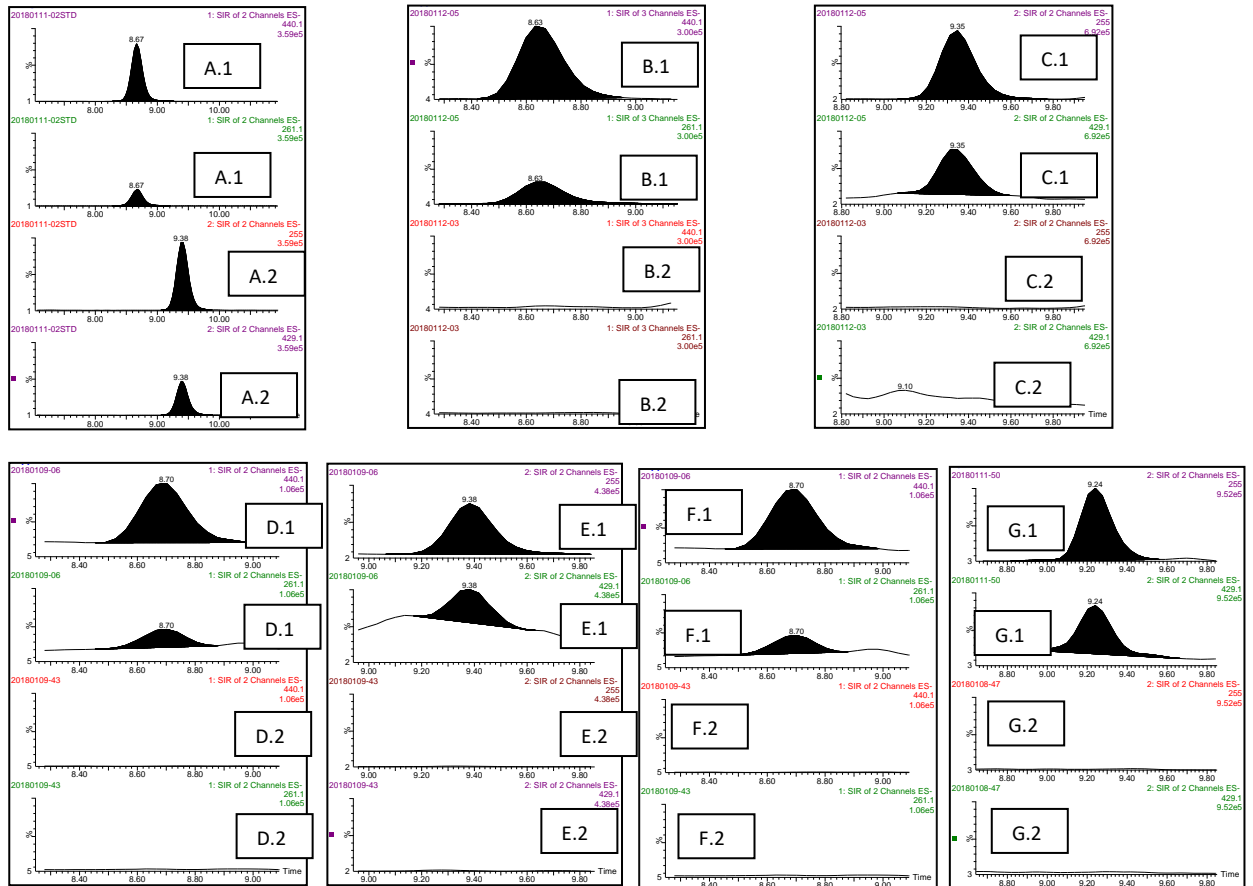


Figure 19. SIM Chromatograms: Standard solutions, blank samples and spiked samples.

(A.1) Andarine, (A.2) Bicalutamide; Blank Urine (B.2) and Spiked Urine with Andarine (B.1); Blank Urine (C.2) and Spiked Urine with Bicalutamide (C.1); Blank Faeces (D.2) and Spiked Faeces with Andarine (D.1); Blank Faeces (E.2) and Spiked Faeces with Bicalutamide (E.1); Blank Serum (F.2) and Spiked Serum with Andarine (F.1); Blank Serum (G.2) and Spiked Serum with Bicalutamide (G.1).

Excretion of Bicalutamide and Andarine

The results for free and total Bicalutamide in urine are presented in the Figure 20; in the faeces Figure 21 ; in the serum Figure 22 and the results of Andarine in the treated porcine are presented Figure 23.

Figure 20. Concentrations of Bicalutamide in Urine.

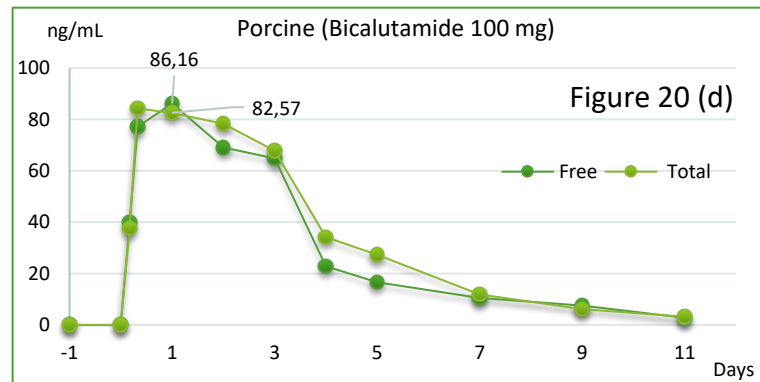
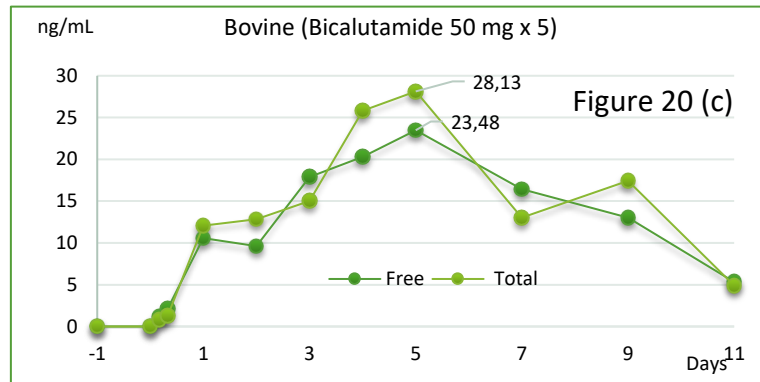
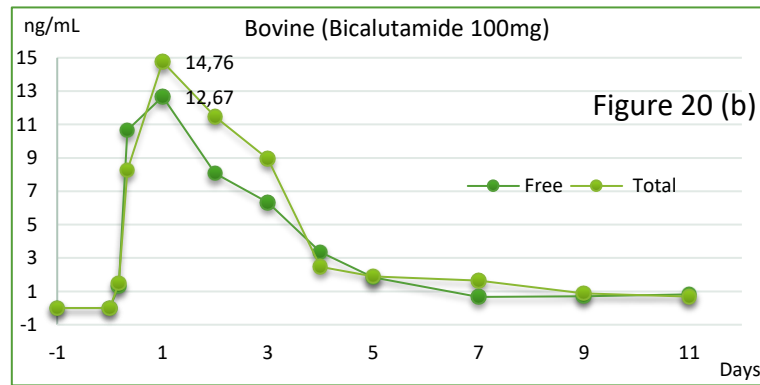
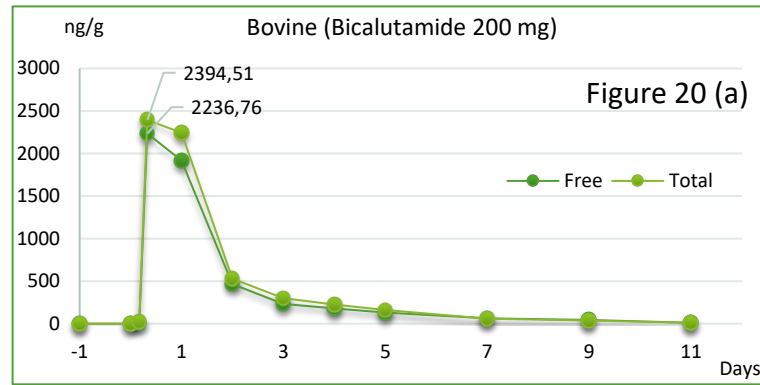


Figure 21. Concentrations of Bicalutamide in faeces.

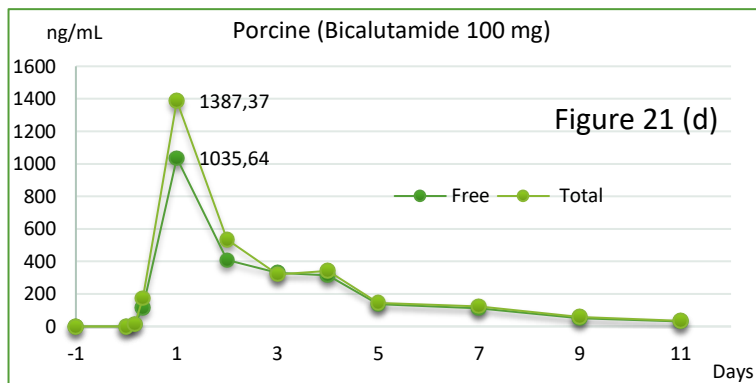
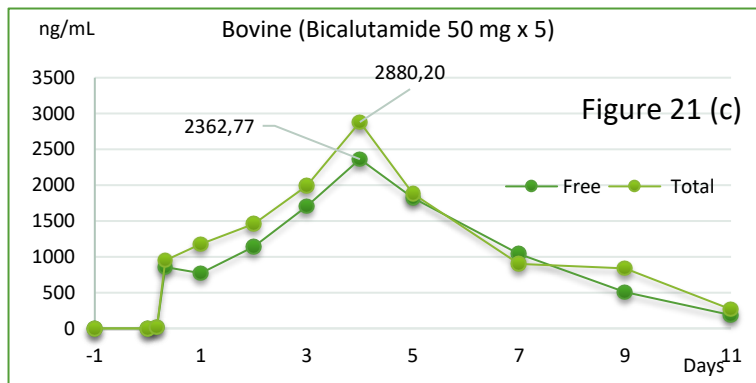
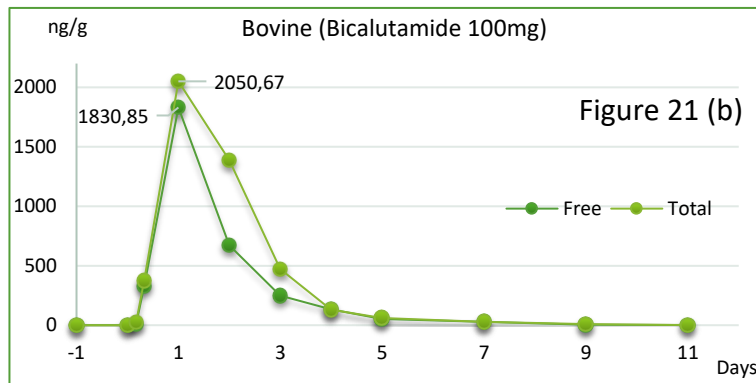
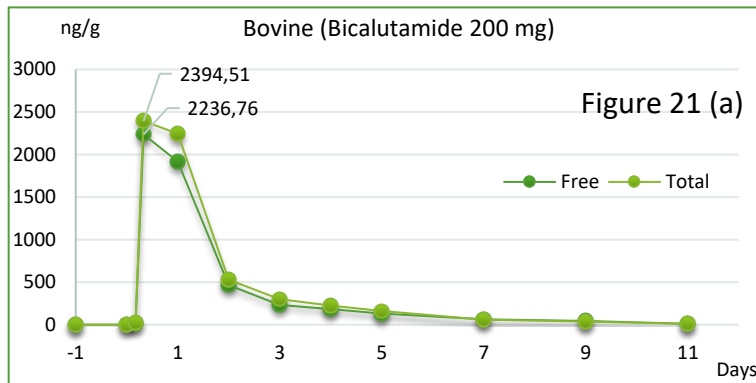


Figure 22. Serum concentrations of Bicalutamide.

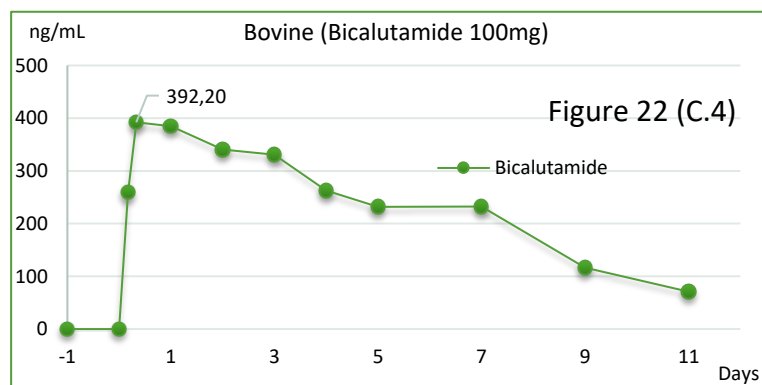
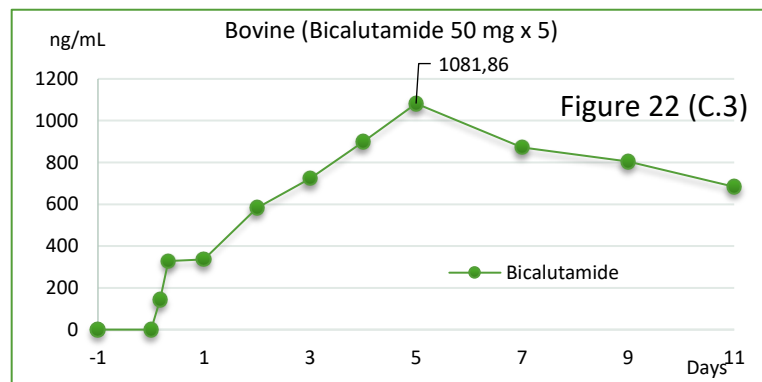
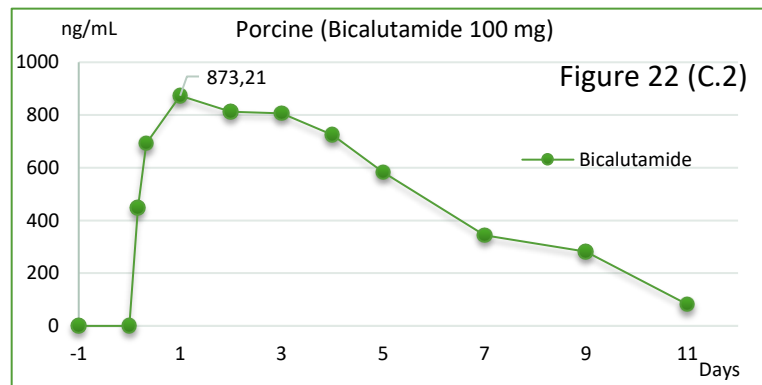
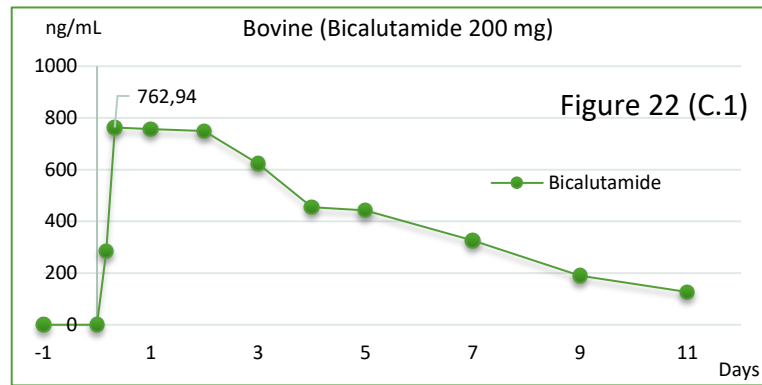
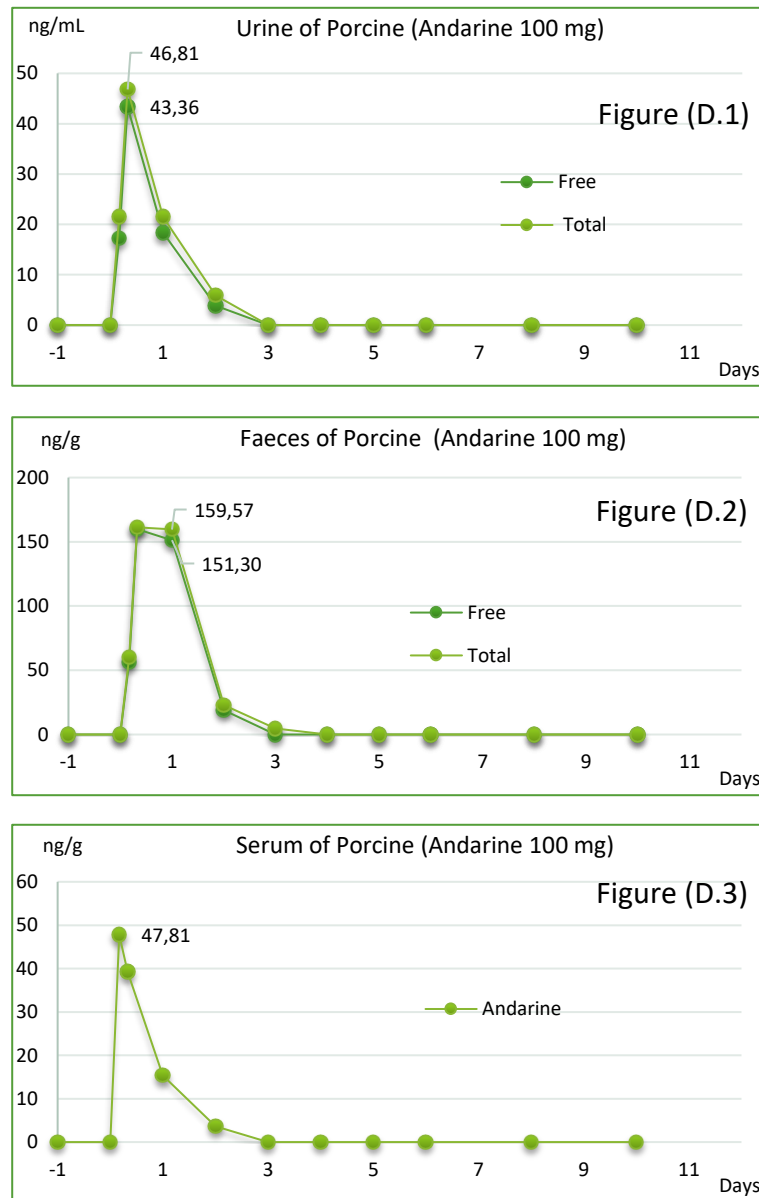


Figure 23. Concentrations of Andarine in Urine, Faeces and Serum of the treated porcine.



As expected, before administration no SARMS were detected in any of the studied matrices. Analysing the obtained concentration values, the lyophilized faeces showed highest concentrations for both species, both drugs and the different doses administered. This could be partly attributed to the lyophilisation process in which up to 80 % of the faecal weight is reduced by removing water and thus generating the concentration of non-volatile solutes such as SARMS and its metabolites.

Comparing the results obtained in treated animals with a single dose of Bicalutamide, a rapid increase of concentration can be observed (4 hs) which indicates a good absorption as in other animal species[18]. Excretion reaches its maximum by day 1, except in faecal matter with doses of 200 mg which had its maximum before. After maximum concentration in each matrix decreases slowly, describing asymmetric curves similar to those found in the first animal trial (page 49). These results in pigs and cattle, will support studies made by other authors in laboratory animals, where the almost total recovery of a single dose by collecting urine and faeces is described, finding less than 1 % in exhaled air. [18, 19].

Serum concentration curves of Bicalutamide in both species studied indicate a rapid absorption and a long period of permanence in blood, as in humans would probably be transported along with proteins mainly in albumin [27].

About the cumulative effect of daily doses of 50 mg, Figure 22 (C.3) shows the increase in serum concentration over the first 5 days of trials follows by similarly increases on the excretion (in urine and faecal matter). Clinical studies conducted in human volunteers with a daily administration of 50 mg describe an increase in serum concentration of Bicalutamide of up to 10 times [27]. The results obtained in our work for cattle, would be explained by the existence of biliary excretion of conjugated Bicalutamide and its reabsorption based on the described entero-hepatic circulation which would cause the accumulation effect [27, 52, 63].

The results obtained for Andarine presented a maximum fast concentration (4 hs) in all matrices and a rapid decrease, being not detectable at 3 days (in urine and serum). This behaviour is similar to previous studies carried out on other animals with a rapid appearance in the blood, indicating a fast digestive absorption [45, 52, 65].

Comparing the concentrations of Bicalutamide and Andarine in pigs, it is observed that Bicalutamide has a greater permanence in the animals, being detected until the last day of sampling in all matrices. On the other hand, Andarine is quickly eliminated, also the absorption is fast and for this reason

they present "sharped peaks" in serum, urine and faeces. The results presented in this work, referring to rapid absorption and distinctive permanence behaviour for Bicalutamide and Andarine, are similar to those described in previous work done by other authors [8].

Observing the Figures constructed with the concentrations of Andarine in the different matrices, it can be pointed out a first inconvenience for the control laboratories due to their short period of detection. These analytical drawbacks were mentioned in previous work carried out by other authors with laboratory animals and sports competition animals [45, 65, 66]. Andarine metabolisms are described as so intense that at low doses it is not possible to find the parent drug in urine [52]. In our case, it could be assumed that the dose given would be high enough to exceed/saturate the capacity of the metabolic pathways of pig removal and for this reason we found Andarine in urine and faeces.

Metabolites Study

In the case of animals treated with Casodex[®] the work of finding metabolites was simplified by having characteristic fragments (Annex V; page 122). In the case of the pig treated with Andarine the characteristic fragments were first established (Annex VIII; page 134). Then analyses in SCAN mode and SRM mode were performed.

Bicalutamide metabolites

Table 17 shows the relevant ions found in SCAN mode and with an asterisk are marked the confirmed reactions in SRM mode. The information in this table shows that the metabolites found are the same as those previously found, as described in the Table 13 (page 50).

Table 17. Bicalutamide metabolites found in the treated steer.

	M1	M2	M3	M4	M5
[M-H]	605	621	445	509	525
Related Ions (m/z)	587	603	427	411	507
	543	445	185*	173*	445*
	429	427	255*	185*	427
	411*	185*	189*	255*	255*
	193*	255*			185*
	185	175			175
	255	271			
	159*	173			
		159			

Figure 24 shows a composite chromatogram constructed with the results obtained from the bovine treated with 200 mg Casodex[®]. In time order it can be seen 2 peaks corresponding to M2, the largest at 3.64 min.; a first peak from M1 to 4.04 min.; then a peak of M5 (4.11 min.); another peak of M1 (4.19 min.); the peaks of M3 and M4 leave together at 4.29 min. and finally Bicalutamide (4.71 min).

By comparing the composite chromatograms in Figure 12 (page 52) with Figure 24, differences in all peak retention times can be observed, this is because the chromatographic system used in INTA – Concordia was different from that used in LabERCA (Nantes).

Another difference is the absence of metabolites M2c and M2d in the chromatogram of Figure 24, an explanation could be that these animals do not produce absent M2 metabolites, which could be due to inter-species differences due to the existence of different isoforms of some enzymes involved in the metabolism of SARMS [64]. Another explanation could be, as mentioned above, when changing the chromatographic system we can think that our method/instruments applied in this test are not able to detect them at a low concentration at which they were produced. Another explanation would be that the substances administered in both cases (Casodex[®]) were commercial products and could have some minimal differences in their composition, since they were produced by the same manufacturer, were acquired in different

countries and years. The lack or minimal production of M2c or M2d in treated animals could be the most likely cause because the tests carried out were subject to great biological variability (race, physiological status, age, etc.). Finally, the combination of all the above causes cannot be ruled out as another explanation either.

The details of the metabolites, ions and SRMs used for identification in the Annex IX (page 135).

Table 18 presents the ions found in the porcine samples after the mass spectrometry analysis. Comparing with the previous results from bovine samples (Table 17 y Table 13), it can be observed M1, M2, M3 and M4 but there was not found M5.

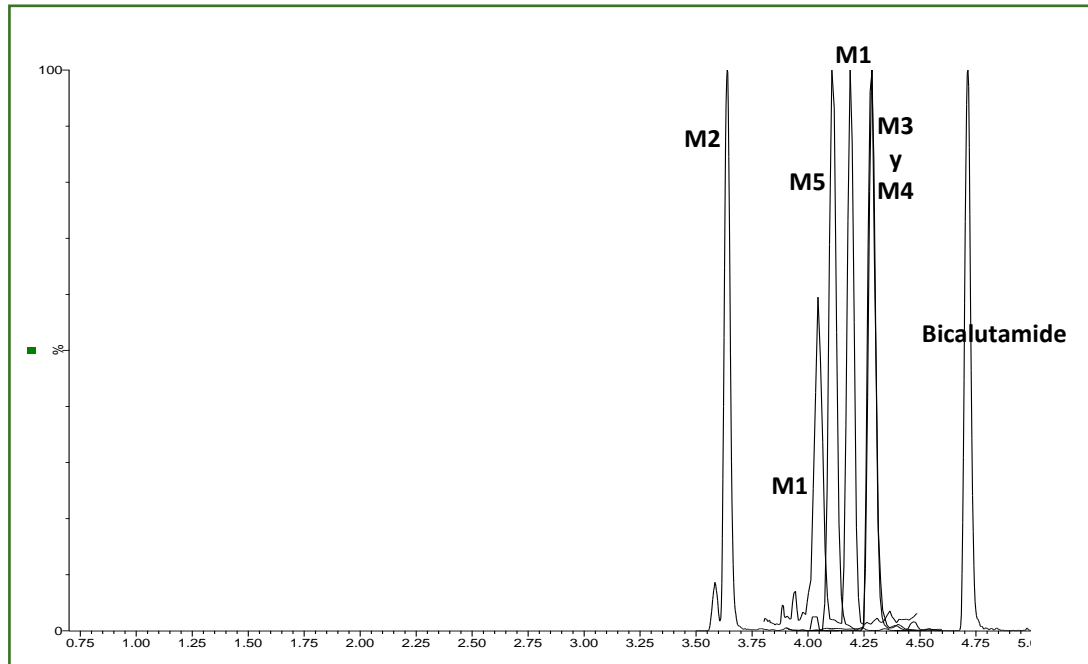


Figure 24. Composite chromatogram for the treated steer with 200 mg Casodex.

SRM: M1: 605>411; M2: 621>255; M3: 445> 255; M4: 509>255; M5: 525>255
Bicalutamide: 429.1>255.1

Table 18. Bicalutamide metabolites found in the treated porcine.

	M1	M2	M3	M4
[M-H]⁻	605	621	445	509
Related Ions (m/z)	587	603	427	411
	561	445	409	185*
	543	365	185*	255*
	429	185*	255*	
	411*	255*	189*	
	185	175		
	255	189		
		271		
		173		
		159		

Figure 25 presents a composite chromatogram corresponding to urine samples and faeces of the pig treated with Casodex[®]. This figure was constructed with SRM that confirm the presence of metabolites M1, M2, M3, M4 and Bicalutamide. As expected this chromatogram shows retention times similar to the metabolites in cattle treated with Casodex[®]. In order of appearance can be observed: M2 with two peaks and the larger one at 3.65 min.; two peaks corresponding to M1 (4.04 min. and 4.19 min.); again M3 and M4 have almost simultaneous elution (4.3 min.). Further details of the metabolites, ions and SRMs used for identification in the Annex IX (page 135).

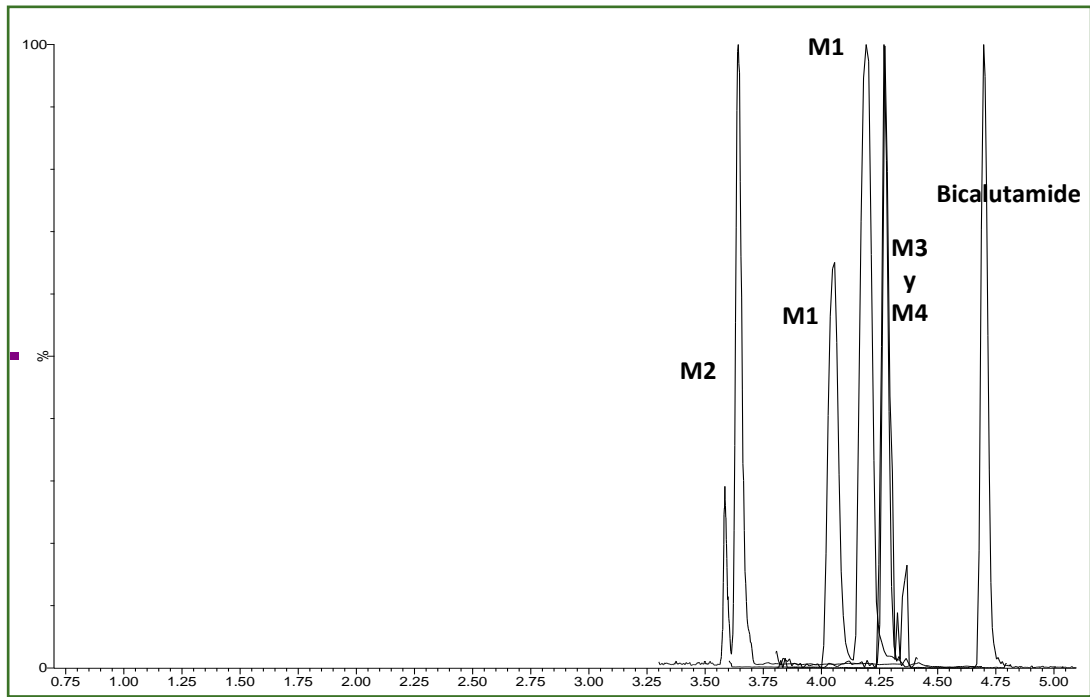


Figure 25. Composite chromatogram of the porcine after Casodex[®] administration.

(M1: 605>411; M2: 621>255; M3: 445> 255; M4: 509>255 y Bicalutamide: 429>255).

Andarine Metabolites

Table 19 shows the ions used for the identification of each metabolite found and the ions confirmed by SRM and MRM are marked with asterisks.

Table 19. Andarine metabolites found in the treated porcine.

	DM1	DM2	DM3	DM4	DM5	DM6	DM7	DM8	DM9	DM10	DM11	DM12
M-H	205	221	301	307	397	398	410	426	590	483	616	494
Ions (m/z)	175*	190*	221*	205*	221*	261*	150*	261*	572*	205*	465*	414*
	159*	175*	190*	234*	171*	205*	175	289*	261*	277*	205	289*
	155*	171*	171*	175*	205	175*	221	205	175	205	150*	261*
			155*	155		171		175	205	171	440*	205*
				277							261	175
											289	221

Table 19 presents 12 metabolites of Andarine, marking a big difference with Bicalutamide that presented only 4 metabolites in pigs (

Table 18). This result would indicate the intense metabolism of this drug in pigs as described in previous works by other authors and it is remarkable the short period of detection (48 hs) found as we will see [52] [65].

Figure 26 presents a composite chromatogram corresponding to samples of the treated pig. The Figure is constructed with SRM of the 12 metabolites identified as "DM" (DM1 to DM12). In order, it can be observed in minute 2.42 peak DM9; DM5 at 3.05 min.; in 3.37 min simultaneously three peaks corresponding to DM7, DM3 and DM2; peak DM6 in 3.56 min. and peak DM10 in 3.58 min; peaks DM1 and DM4 are together in 3.84 min.; together also peaks DM12 and DM11 in 3.94 min.; Andarine is in minute 4.50 and very close is DM8 in 4.51 min. Annex IX presents other graphs showing in detail the order of elution and the SRM used for the identification of the metabolites found. The presence of the metabolites found were previously described in works carried out by other authors in studies *in-vitro* and *in-vivo* [36, 37, 41, 45, 67].

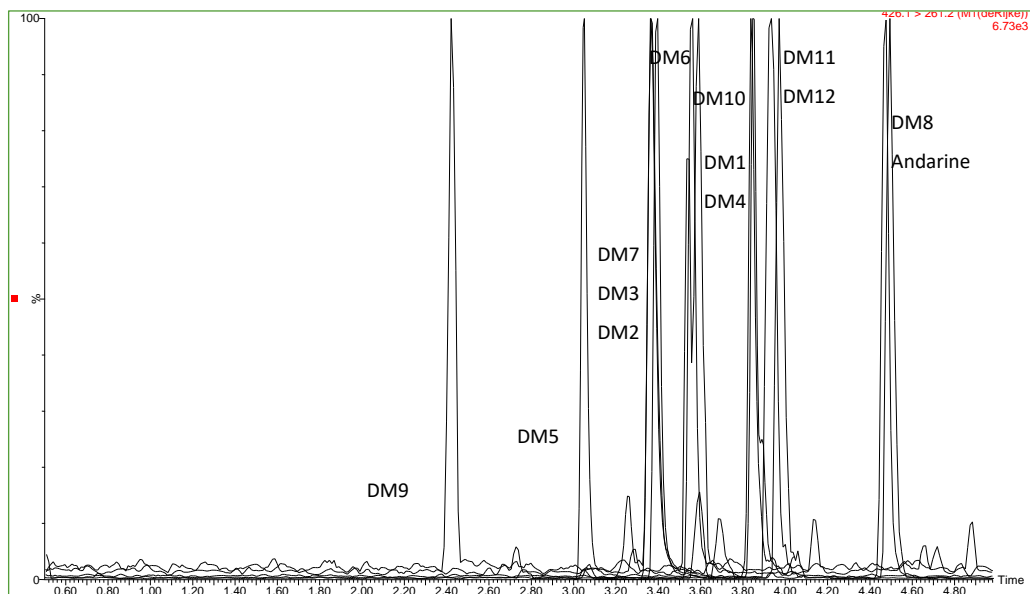


Figure 26. Composite chromatogram of the porcine treated with Andarine.

(DM1: 205>175; DM2: 221>175; DM3: 301>221; DM4: 307>205; DM5: 397>221; DM6: 398.1>205; DM7: 410.1>150; DM8: 426.1>261.2; DM9: 590>261; DM10: 483.1>205; DM11: 616.1>440.1; DM12: 494>414.1 y Andarine: 440.1>261).

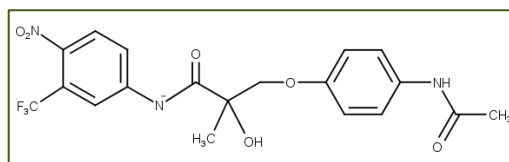


Figure 27. Chemical structure of Andarine ($m/z = 440$).

DM1: This metabolite would correspond to the deprotonated fragment coming from the rupture of the amide bond of the chain between rings of Andarine (Figure 27). Figure 28 shows the proposed chemical structure, consisting of prior studies [45] and according with $m/z = 175$ by loss of NO; $m/z = 159$ by loss of NO_2 and $m/z = 155$ by loss of HNOF. Table 19 presents the fragments found and Annex IX presents chromatographic details (page 143).

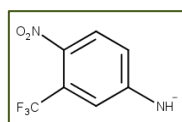


Figure 28. Chemical structure proposed for DM1 ($m/z = 205$).

DM2: This metabolite would correspond to DM1 hydroxylated. Figure 29 shows the proposed chemical structure that would explain the fragments found $m/z = 190$ by loss of HNO; $m/z = 175$ by loss of NO y $m/z = 171$ by loss of HNOF. Table 19 presents the fragments found and Annex IX presents chromatographic details (page 143). This metabolite was previously reported in urine from horses treated with Andarine [45].

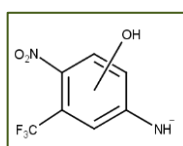


Figure 29. Chemical structure proposed for DM2 ($m/z = 221$).

DM3: This metabolite would correspond to the DM1 conjugated sulphate. Figure 30 shows the proposed chemical structure consisting with the fragment found $m/z = 221$ by loss of SO_3 ; $m/z = 190$ by loss of HNO and SO_3 ; $m/z = 171$ by loss of HNOF and SO_3 ; $m/z = 155$ by loss of HNO_2F and SO_3 . Table 19 presents the fragments found and Annex IX presents chromatographic details (page 143). This metabolite was previously reported in urine from horses treated with Andarine [45].

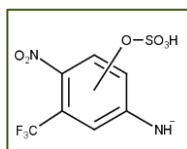


Figure 30. Chemical structure proposed for DM3 ($m/z = 301$).

DM4: The retention time and fragments found of this metabolite are consistent with a metabolite described in previous work [36-38, 41, 67]. As in previous works, it cannot propose a structure because of fragments size ($m/z = 307$) it could be the dephenylated Andarine, but the fragments ($m/z = 234$; $m/z = 205$; $m/z = 175$) observed with mass spectrometry do not match the structure of dephenylated Andarine.

DM5: This metabolite would correspond to the DM1 conjugated glucuronate. Figure 31 shows the proposed chemical structure consisting with the fragment found $m/z = 221$ by loss of glucuronic acid leaving the hydroxylated derivative and $m/z = 171$ by loss of HNOF. Table 19 presents the fragments found and Annex IX presents chromatographic details (page 143). This metabolite was previously reported in urine from horses treated with Andarine [45].

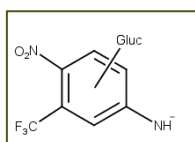


Figure 31. Chemical structure proposed for DM5 ($m/z: 397$).

DM6: This metabolite would correspond to Andarine deacetylated and deprotonated. Figure 32 shows the proposed chemical structure consisting with the fragment found, $m/z = 261$ is a characteristic fragment of Andarine that is generated by the loss of the amino-phenyl ring with a subsequent rearrangement [41]; $m/z = 205$ produced by rupture of the amide bond linking both rings, then $m/z = 175$ generated from $m/z = 205$ by loss of NO. Table 19 presents the fragments found and Annex IX presents chromatographic details (page 143).

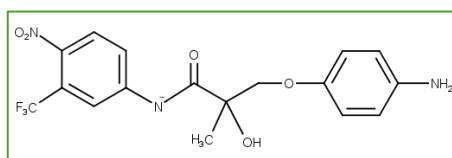


Figure 32. Chemical structure proposed for DM6 (m/z : 398).

DM7: This metabolite would correspond to deprotonated form generated from nitro-reduction of Andarine (Figure 27) with a reduction of 30 Da.

Figure 33 shows the proposed chemical structure consisting with m/z = 150 corresponding to phenyl-acetamide coming from rupture of ether bound. Table 19 presents the fragments found and Annex IX presents chromatographic details (page 143). This metabolite was previously reported in urine from horses treated with Andarine [45].

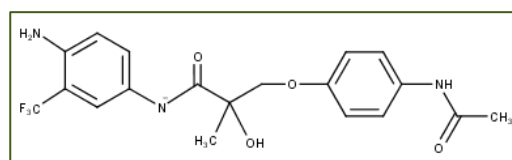


Figure 33. Chemical structure proposed for DM7 (m/z : 410).

DM8: This metabolite would correspond to hydroxylated DM7. There are several places where oxydril can enter in both rings. The presence of m/z = 261 (as describe for DM6) and m/z = 289 by loss of phenyl-acetamide group, indicates that the substituted trifluoromethyl ring does not receive oxydril (Figure 34). This metabolite was reported during an *in-vitro* trial with Andarine [38]. Table 19 presents the fragments found and Annex IX presents chromatographic details (page 143).

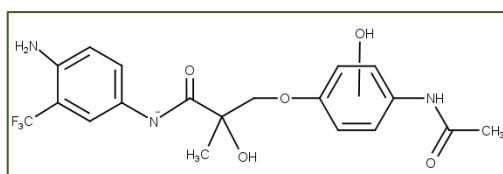


Figure 34. Chemical structure proposed for DM8 (m/z : 426).

DM9: It would correspond to the deprotonated form of Andarine and conjugated with glucuronic acid. The fragment m/z = 261 would indicate that the trifluoromethyl ring remains unchanged and the fragment m/z = 572 would

indicate loss of H₂O (Figure 35). This metabolite was reported during an *in-vitro* trial with Andarine [41]. Table 19 presents the fragments found and Annex IX presents chromatographic details (page 143).

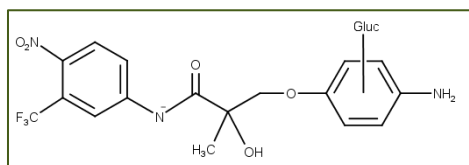


Figure 35. Chemical structure proposed for DM9 (m/z: 590).

DM10: The proposed chemical structure for this metabolite is shown in Figure 36. It would correspond to the conjugated derivative with glucuronic acid coming from the rupture of the ether bond in the chain that bound both rings. Fragment m/z = 205 would indicate absence of changes in the trifluoromethyl ring and fragment m/z = 277 is consistent with DM10 that loses glucuronic acid and a methyl group. This metabolite was reported during an *in-vitro* trial with Andarine [41]. Table 19 presents the fragments found and Annex IX presents chromatographic details (page 143).

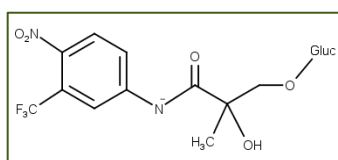


Figure 36. Chemical structure proposed for DM10 (m/z: 483).

DM11: This metabolite would correspond to Andarine conjugated with glucuronic acid in a deprotonated form. The fragments found would be consistent with the proposed structure (Figure 37) m/z = 440 come from the result of the loss of conjugated acid; m/z = 465 would show the result of removing the phenyl-acetamide ring (as a neutral loss) and m/z = 150 would be the deprotonated phenyl-acetamide ring. This metabolite was reported during an *in-vitro* trial with Andarine [41]. Table 19 presents the fragments found and Annex IX presents chromatographic details (page 143).

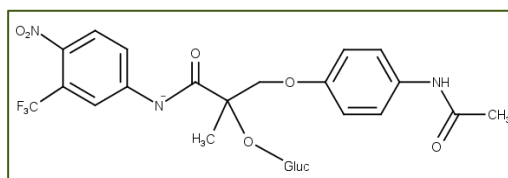


Figure 37. Chemical structure proposed for DM11 (m/z: 616).

DM12: This metabolite would correspond to Andarine sulfate conjugated in a deprotonated form. Figure 38 shows the proposed chemical structure that would explain the fragments found, as described before $m/z = 205$ and $m/z = 261$ would indicate trifluoromethylated ring unchanged; $m/z = 414$ by loss of SO_3 and $m/z = 289$ by loss of phenyl-acetamide group. This metabolite was reported during an *in-vitro* trial with Andarine [41]. Table 19 presents the fragments found and Annex IX presents chromatographic details (page 143).

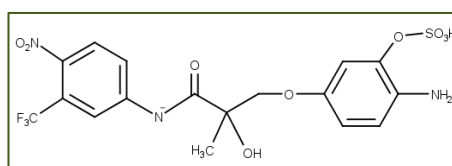


Figure 38. Chemical structure proposed for DM12 (m/z: 494).

Andarine and its metabolites in the excreta of the treated pig indicates its intestinal absorption. The appearance of 12 metabolites shows an intense metabolism in pigs as well as it was described by other authors for laboratory animals and in horses [45, 65].

Metabolites excretion

The study of the temporal window in the case of Bicalutamide was carried out with the transitions detailed in Table 14 (page 55) and in the case of Andarine metabolites are indicated in Table 20. The metabolite excretion profiles obtained from trial are presented below.

Table 20. Transitions MRM of Andarine metabolites.

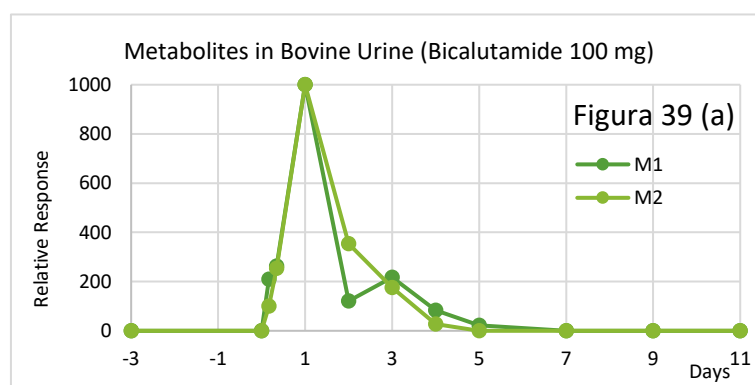
	[M-H]	MRM (m/z)		
M1	205	205>175	205>159	205>155
M2	221	221>190	221>175	221>171
M3	301	301>221	301>171	
M4	307	307>234	307>205	307>175
M5	397	397>221	397>171	
M6	398	398>175	398>205	398>261
M7	410	410>150		
M8	426	426>289		
M9	590	590>261		
M10	483	483>205		
M11	616	616>440	616>461	616>261
M12	494	494>414		

Figure 39 (a - p) show the results obtained for bovine (a - k) and porcine (m - p) treated with Casodex[®] and Figure 40 (a - k) correspond to the pig treated with Andarine.

The figures are constructed on an arbitrary basis, where the signal of each Figure is relative to the maximum signal obtained for each metabolite. Since there are not standards of each metabolite, the signal could not be transformed into concentration units (at the moment of the trial).

However, these figures are very important for analytical control in livestock practices, since they indicate which metabolites are characteristic of each matrix and also how long they remain detectable. Annex IX (page 135) presents tables with the values used for the construction of these figures.

Figure 39. Excretion profile of Bicalutamide metabolites.



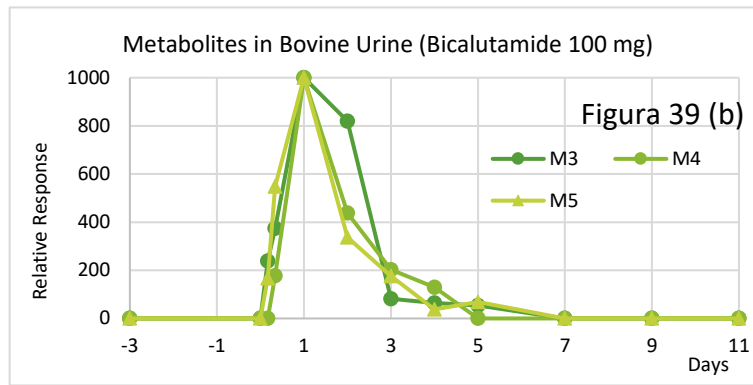
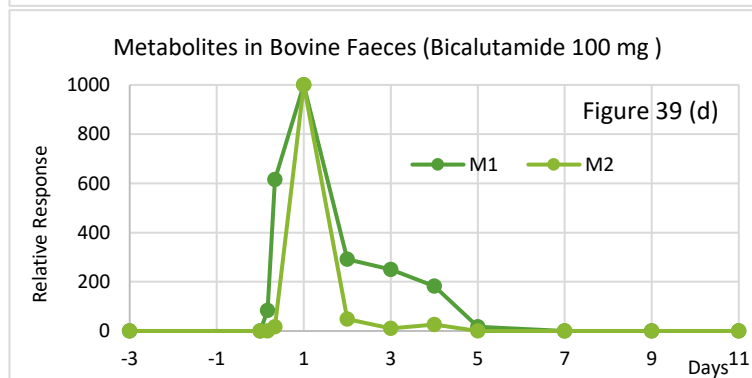
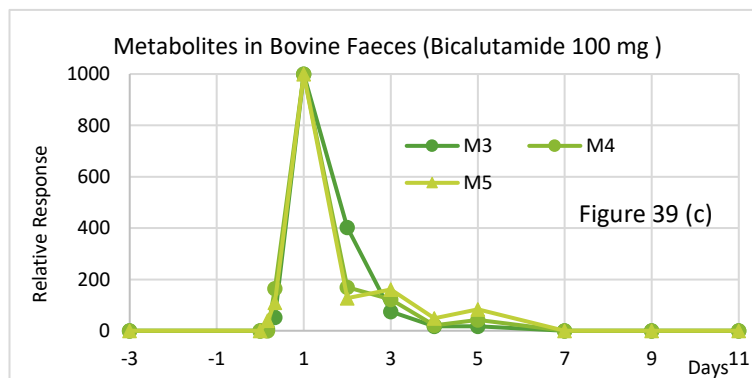


Figure 39 (a), (b), (d) and (c) show the elimination of Bicalutamide metabolites in urine and faeces of bovine animals treated with 100 mg Casodex®. It can be observed that the peak of the metabolites appears on day 1, there is a rapid increase and a slow decrease describing asymmetric curve.

Some metabolites were detected until day 5 (M1; M3 and M5) in urine and faeces, while the Bicalutamide unchanged was detected until day 11 in faeces and until day 7 in urine.



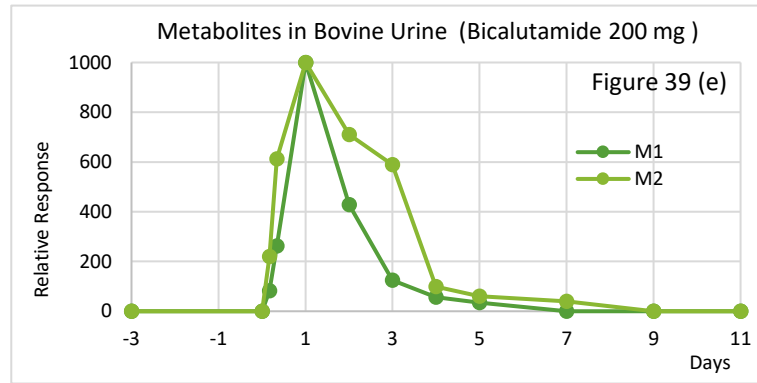
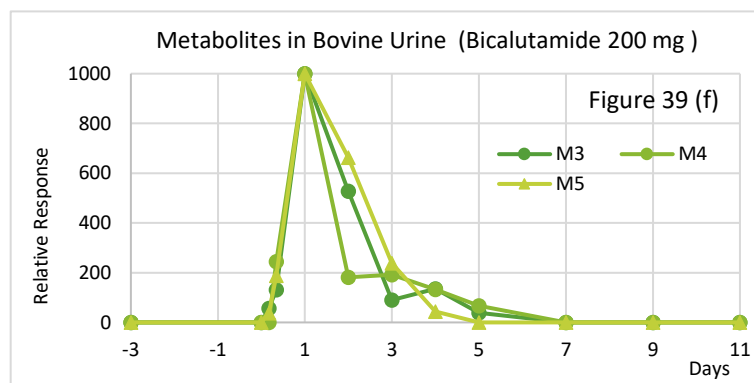


Figure 39 (e), (f), (g) and (h) show excretion of animals treated with 200 mg CDX. It can be observed that the concentrations of the metabolites increases rapidly at the beginning, until 8hs for M3 and day 1 and for the rest, then the decrease is slower, drawing asymmetric curves.

Metabolites that remain more detectable in faeces is M4 (until day 9) and in urine M2 (until day 7), while Bicalutamide unchanged remains detectable until day 11 in faeces and until day 9 in urine. This extension of the detection period of Bicalutamide compared to the bovine that received 100 mg could be related to the higher dose and due to the intestinal reabsorption of Bicalutamide (*entero-hepatic circulation*) [27]. On the other hand, the fact of detecting metabolites and Bicalutamide for longer periods of time in faeces than in urine could be due to the use of lyophilized faecal matter which has a concentration effect of non-volatile substances.



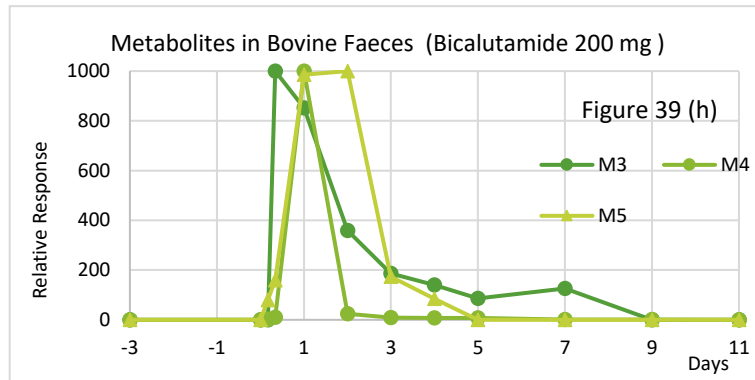
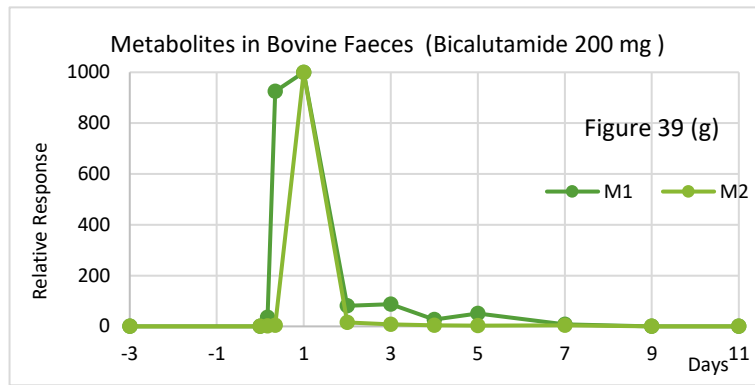
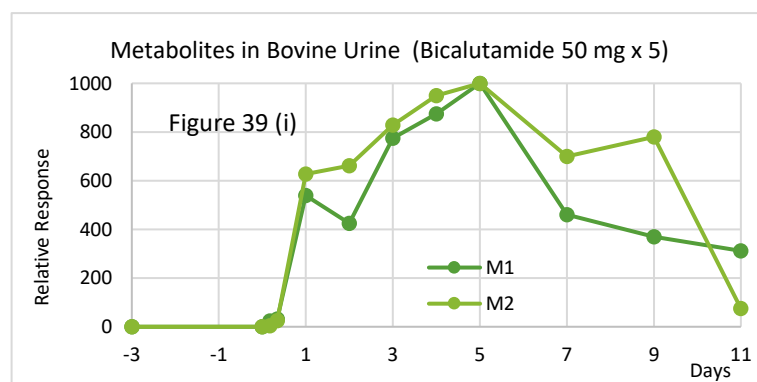
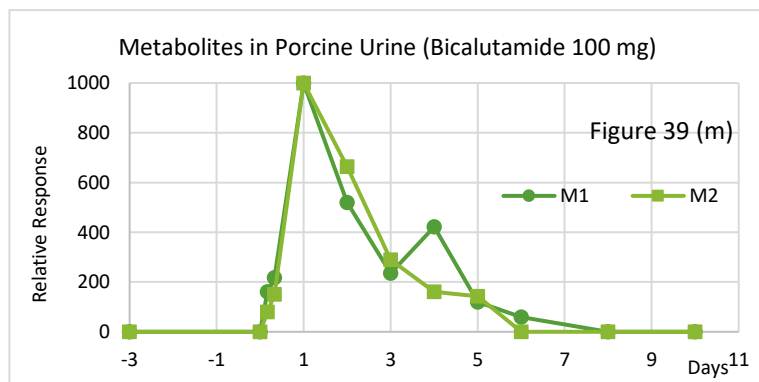
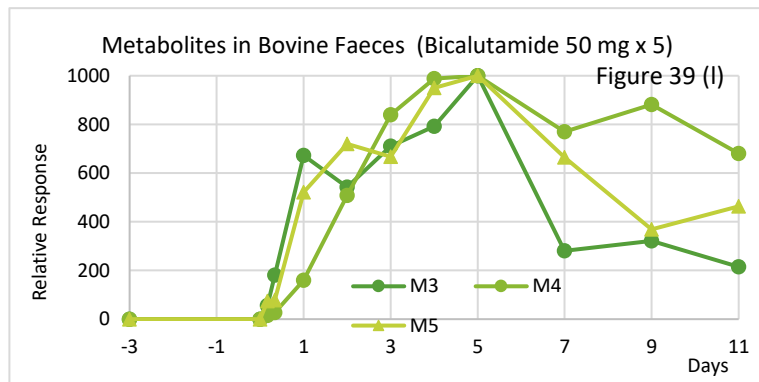
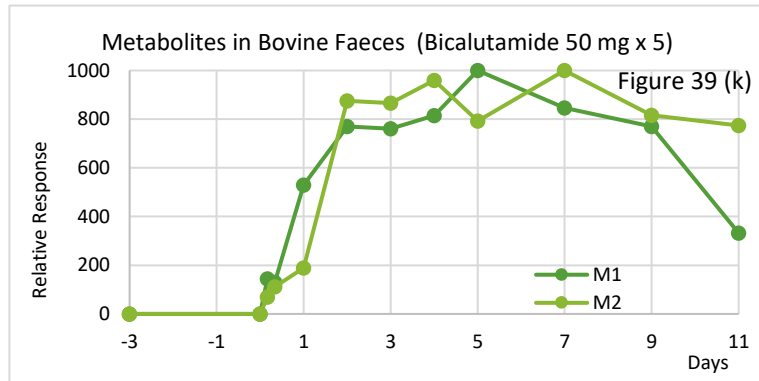
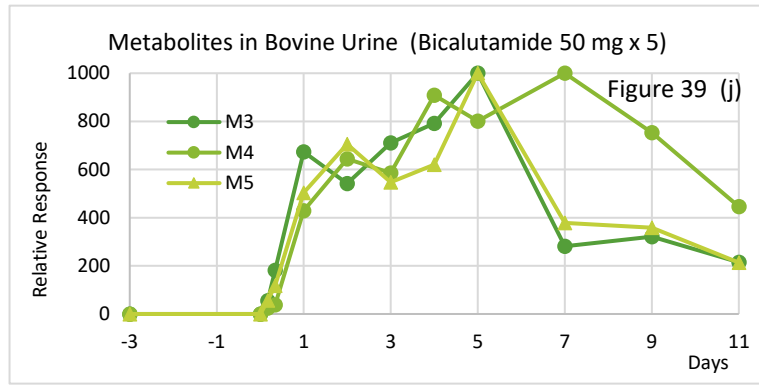


Figure 39 (i), (j), (k) and (l) show the variations in the relative signal of metabolites in urine and in faeces for the bovine that received the 5 daily doses of 50 mg. In urine, all metabolites can be seen to increase rapidly until day 1 and then a slowly increase; M4 continues to increase its signal until day 7 while the rest of the metabolites have their maximum on day 5; finally all metabolites signal decrease slowly and remain detectable until the end of the test. In faeces, the behaviour is very similar but in this matrix is M2 who increases its signal until day 7.





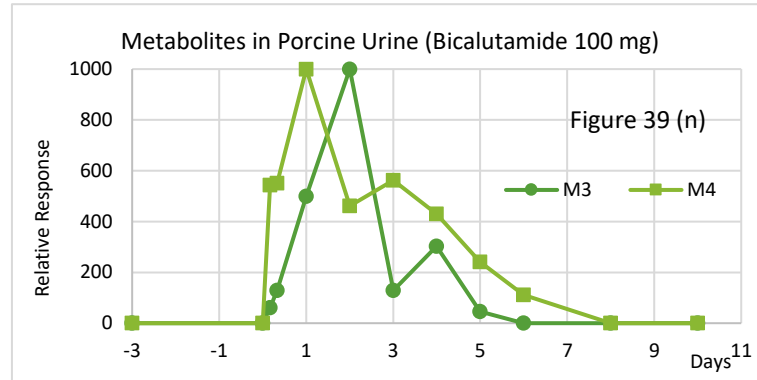


Figure 39 (m), (n), (o) and (p) show variations in the relative signals of metabolites found in urine and faeces of pigs treated with 100 mg CDX.

It is observed that after the administration of the drug (day 0) the increase of the signals is fast, showing the maximum on day 1 and only M3 in urine shows its maximum on day 2. Then the decrease is slow for all metabolites, describing asymmetrical curves. In urine, metabolites are detected until day 6 and in faeces until day 8, while Bicalutamide is detectable until the end of the test (day 10).

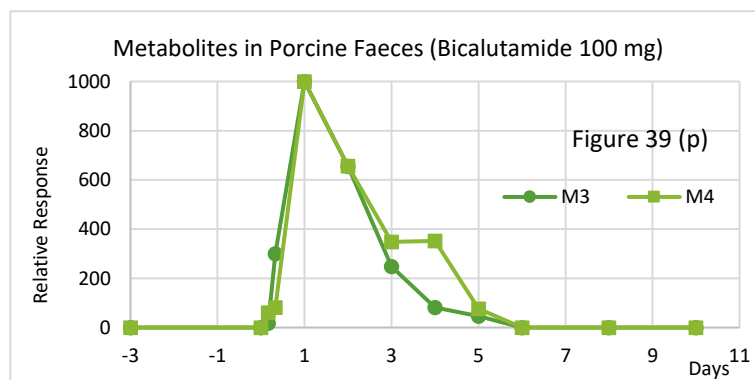
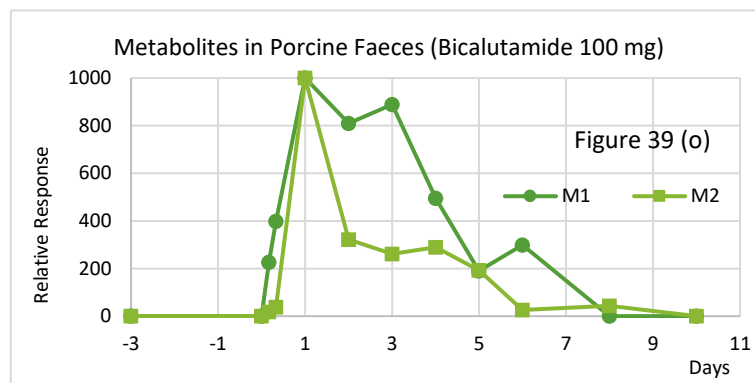


Figure 40. Excretion profile of Andarine metabolites.

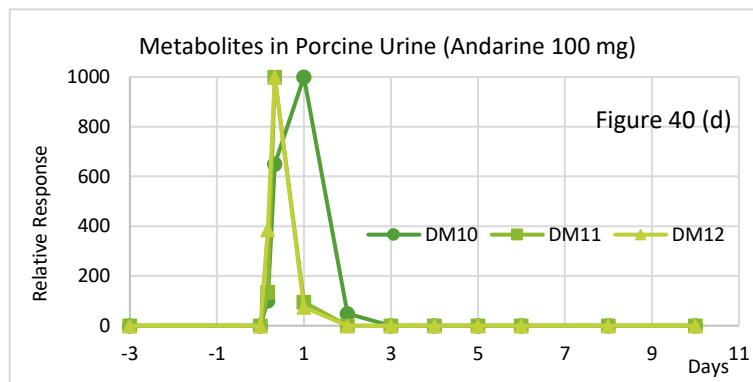
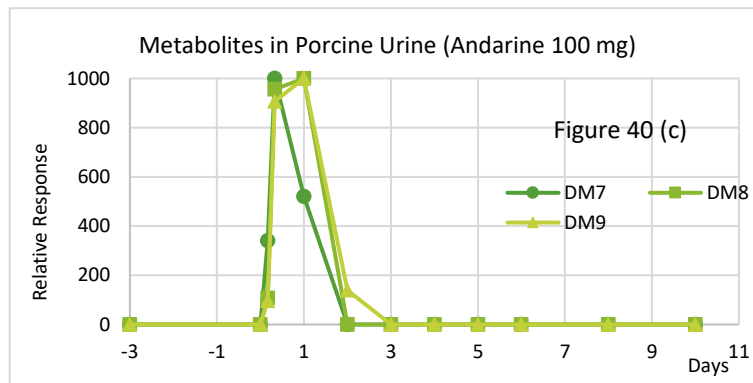
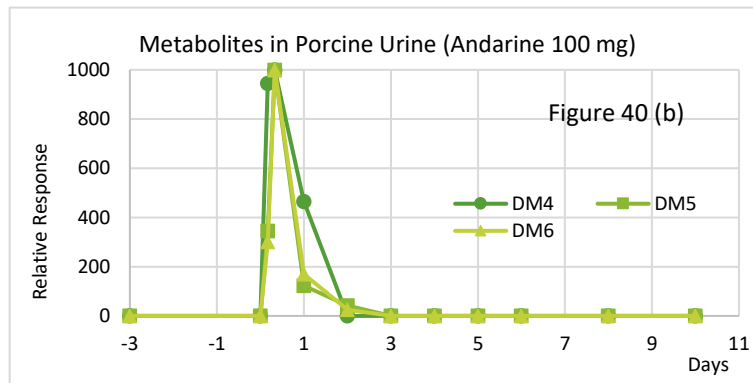
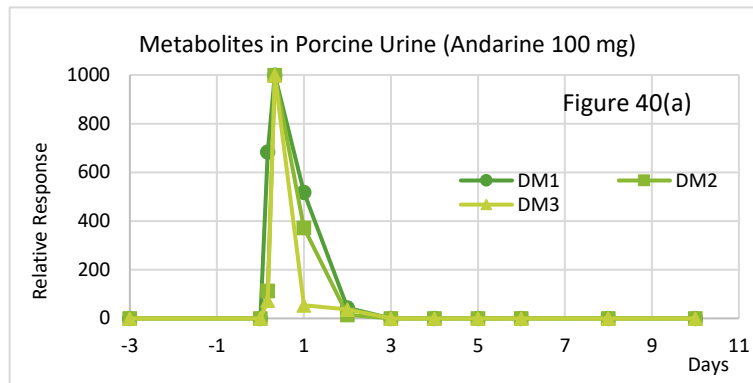


Figure 40 (a), (b), (c) and (d) show variations in the relative responses over time of metabolites found in urine of the porcine treated with Andarine. It can be seen that the increase of the signals is very fast as well as the decrease, it only takes a few hours to be undetectable. Only DM8, DM9 and DM10 have their maximum value on day 1, the other metabolites have their maximum at 8 hours post-administration. This fact could indicate that the maximum of Andarine and its metabolites would occur between 8 hs and 24 hs as it happens in other animals [45, 52].

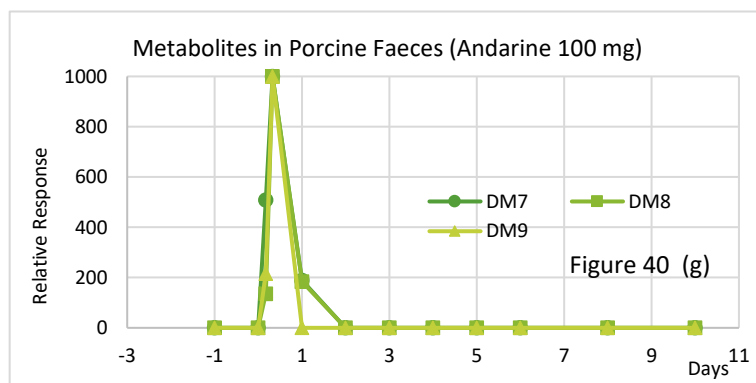
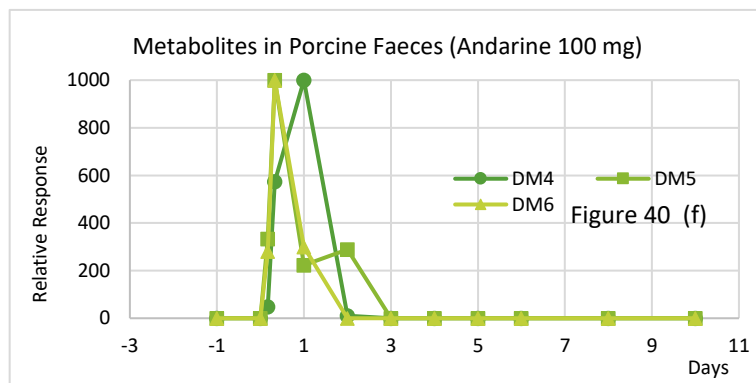
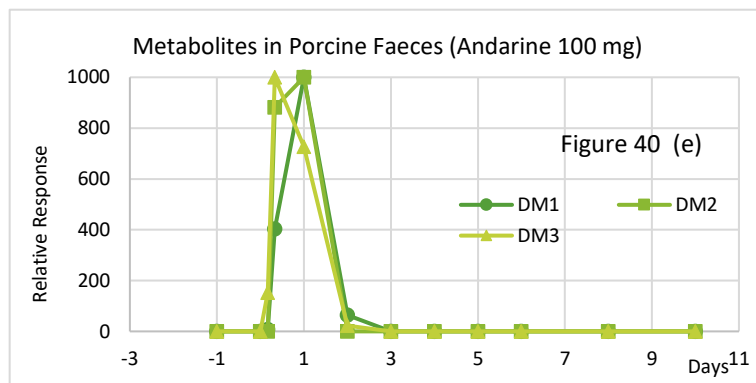
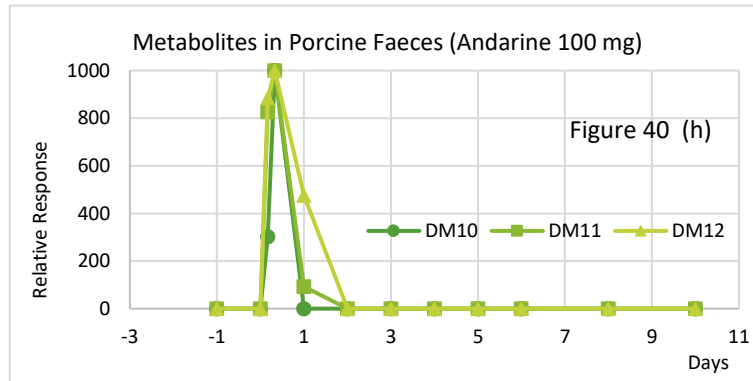


Figure 40 (e), (f), (g) y (h) present the variations of relative responses in the time of the metabolites found in faeces of the porcine treated with Andarine. In faeces the curves are similar to those described for metabolites in urine, you can see rapid increases and decreases that draw sharp peaks showing a rapid elimination of Andarine and its metabolites. Only DM1, DM2 and DM4 show their maximum signals at 24 hours post-administration and the rest of the metabolites show their maximum before (8 hs).



Partial Conclusions:

- A rapid method was developed for the determination of Bicalutamide and Andarine in serum, showing satisfactory results of Accuracy, Precision and linearity. The method allows great workflow and is ideal for routine analysis. Its limit of quantification was 2 ng/mL.
- The serum concentration of Bicalutamide was determined after the administration of an oral dose: presenting a maximum at 24 hours followed by a slow decrease with detectable concentrations until the last day of the test in pigs (day 10) and cattle (day 11).
- In the pig, Andarine has a maximum serum (478.1 ng/mL) between 4 to 8 hs and a rapid decrease that shows undetectable results on day 3.
- The faecal and urinary elimination profile was established for animals treated with Bicalutamide and Andarine. Phase I and Phase II metabolites from both drugs were found in the excreta of treated pigs and cattle. The information collected with chromatography and mass spectrometry detectors was used to

propose structures of the metabolites found for Bicalutamide and Andarine (except for DM 4).

- Bicalutamide metabolites described for Montbeliard bovine animals (M1-M5) are found in Angus bovine excreta. In the pig, the absence of metabolite M5 was observed.

- The pig treated with Casodex® presents detectable metabolites in urine until day 6 and in faeces until day 8.

- Cattle treated with Casodex® presents detectable metabolites with different periods of time: with 200 mg in urine until day 7 and in faeces until day 9; with 100 mg in urine until day 5 and in faeces until day 7 (for Angus breed); Montbeliard breed presents metabolites in both matrices until day 7; with 5 daily doses of 50 mg in urine and faeces until day 11. However, in all animals Bicalutamide's performance was better as a "marker analyte" of Casodex administration, in some animals staying longer and in others having a higher signal.

- In the porcine treated with Andarine, 12 metabolites were identified showing an intense metabolization. The urinary and faecal elimination profile was determined after oral administration of 100 mg.

- The metabolites of Andarine in the excreta, show a maximum before 24 hours followed by a fast decreasing, showing detectable concentrations in urine and faeces for 48 hours. This short stay poses a great analytical challenge for the control of this substance in livestock practices, at least for the studied matrices.

EVALUATION OF MARKERS METABOLITES FOR THE CONTROL OF LIVESTOCK PRACTICES

Analysing the metabolite excretion profiles previously discussed in Figure 18 (page 56), Figure 39 (page 82) and Figure 40 (page 88). The time window in which Andarine and Bicalutamide can be detected and identified metabolites can be determined. The absence of commercial standards is a limitation for the use of metabolites in the control of APA-SARMS. However, as current European and Argentine legislation prohibits the use of growth promoters in livestock practices, the presence of the drug or its metabolites indicate a violation of regulations.

In this work metabolites with different analytical behaviours (intensity and signal duration) have been found. For this reason and to evaluate the usefulness of each metabolite, comparative figures of "*relative abundances*" (chromatographic areas) were constructed for each metabolite excreted during all trials. (Figure 42 and Figure 43). These figures are intended to show the sensitivity of each metabolite by indicating the "intensity of the total chromatographic area" of each metabolite.

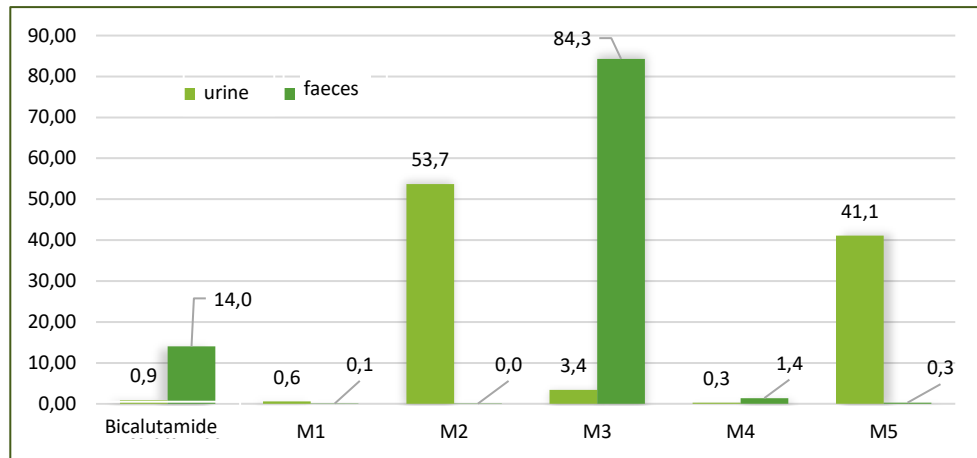


Figure 41. Relative abundances of Bicalutamide metabolites in excreta of bovine.

Figure 41 presents the *relative abundances* of Bicalutamide and its excreted metabolites (in faeces and urine) in cattle treated with different doses of Casodex[®]. This figure shows a marked difference between the *abundance* of some metabolites in urine and faeces. This "*differential excretion*" of each metabolite would allow to concentrate the analytical efforts according to the matrix. It is important to note since the doses administered in this work are high and assuming that the abuse is performed with lower doses, only looking for "*metabolites more detectable*" could make possible to detect the case.

In the case of faecal matter, the percentages of Bicalutamide (14.0 %) and M3 (84.0 %) are higher. In urine, the situation is different, the most abundant were M2 (53.7 %) and M5 (41.1 %).

Figure 42 presents the "*relative abundances*" obtained for Bicalutamide and its metabolites in the excreta of pigs treated with Casodex[®]. Bicalutamide is found to be more abundant in faeces (81,7 %) than in urine (72,6 %). In addition, in faeces, M3 (17,4 %) has the highest abundance; in urine, M2 (16,4 %) and M1 (10,2 %) predominate. Finally it is noted that M4 has a low "*abundance*"

Figure 43 presents the "*relative abundances*" for Andarine and its 12 metabolites found in porcine excreta treated with Andarine.

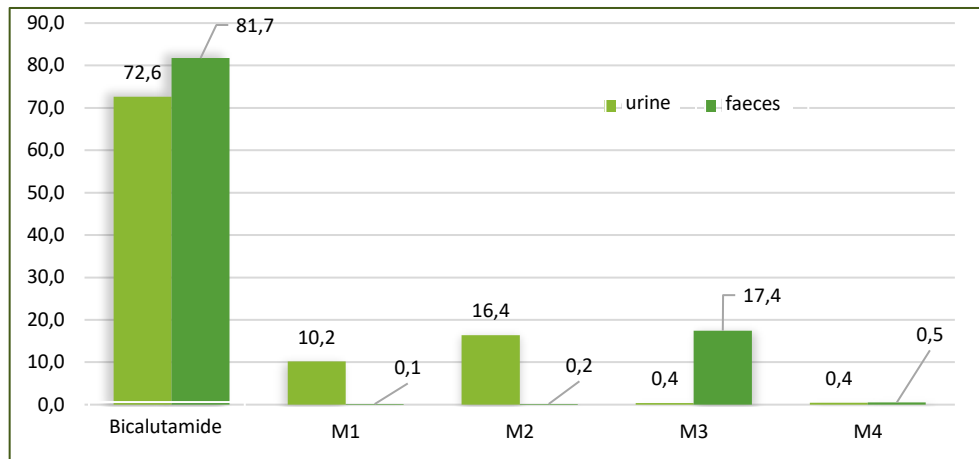


Figure 42. Relative abundances of Bicalutamide metabolites in excreta of porcine.

In faeces, Andarine (59.8 %) is the most *abundant* analyte follows by DM1 (7.8 %), DM2 (7.3 %), DM3 (7.7 %) and DM4 (6.0 %). In urine, Andarine (25.2 %) and DM3 (25.1 %) have the highest abundances; DM5 (13.4 %) and DM6 (10.5 %) and DM7 (6.7 %) have minor abundances.

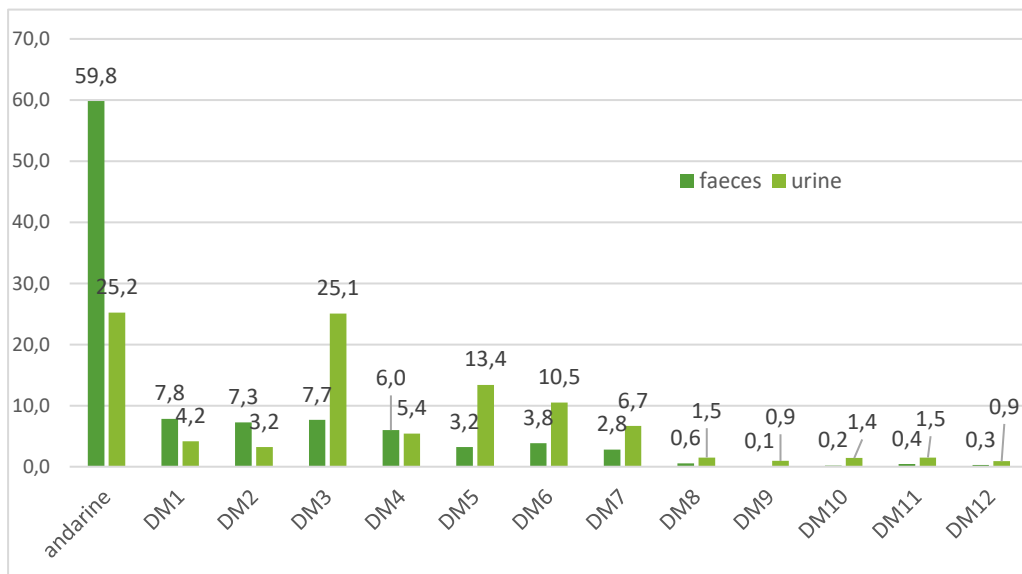


Figure 43. Relative abundances of Andarine metabolites in excreta of porcine.

Partial Conclusions

- In the case of cattle treated with Casodex[®], M3 was the "*most detectable*" metabolites in faeces followed by Bicalutamide. Meanwhile, M2 and M5 in urine were more detectable metabolites.

- In the case of pigs treated with Casodex[®], Bicalutamide is the "*most detectable*" in urine and faeces. In faeces, M3 could also be monitored, while in urine it could be monitored M1 and M2.

- In the case of pigs treated with Andarine, the drug unchanged is the "*most detectable*" in urine and faeces. Others abundant metabolites in faeces were DM1, DM2 and DM3. In urine, others abundant metabolites were DM3, DM5 and DM6.

- The lyophilized fecal matter showed its value as an analytical matrix for the control of administration of Bicalutamide and Andarine in livestock practices.

Conclusions

This work is the first study carried out with oral administration of Bicalutamide in food producing animals.

Analytical methods were developed and evaluated for the study of Enobosarm, Andarine, Bicalutamide and Hidroxyflutamide in urine and faeces. The methods showed the characteristics necessary for their routine use in control laboratories.

Analytical methods for the study of Andarine and Bicalutamide in serum were developed and evaluated. Achieving good analytical characteristics for the control of these drugs in pigs and cattle.

After oral administration of Casodex[®], Phase I and Phase II metabolites were detected in faeces and urine of four cattle and one pig. This is the first study in highlighting the usefulness of faecal matter as an important matrix for the control of Bicalutamide in livestock practices.

After oral administration of Andarine, metabolites of Phase I and Phase II were detected in faeces and urine of a pig.

Based on information obtained by liquid chromatography techniques coupled to mass spectrometry detectors chemical structures were proposed for 16 of the 17 metabolites corresponding to Bicalutamide and Andarine.

In the bovine excreta 5 metabolites of Bicalutamide were observed after Casodex[®] administration and 2 of them were reported for the first time in this work. The excretion profile of the 5 metabolites (faeces and urine) was established to obtain the respective temporary windows. Their intensity signal was evaluated to propose them as useful markers for the control in livestock practices. The selected ones were Bicalutamide unchanged and M3 in faeces; Bicalutamide unchanged, M2 and M5 in urine. In the case of Bicalutamide unchanged, its usefulness in urine is highlighted, despite the fact that it does not have a great signal but it is possible to quantify its concentration using a commercial pattern.

In porcine excreta treated with Casodex[®], it was observed 4 of the 5 metabolites found in treated bovine. Then excretion profiles were determined

for each metabolite. In addition, the temporal window and the magnitude of each signal were evaluated to propose the following candidates: in faeces M3 and Bicalutamide and in urine M1, M2 and Bicalutamide unchanged.

Bicalutamide serum concentration was determined in animal trials (cattle and pig).

After Andarine administration, 12 metabolites were found in pig excreta. Andarine unchanged was established as the recommended marker considering the temporal windows and its intensity of the signal. In this trial, Andarine unchanged abundance in faeces were followed by DM1, DM2 and DM3; in urine they were DM3, DM5 and DM6.

Bibliografía

1. Waltner-Toews, D. and S.A. McEwen, *Residues of hormonal substances in foods of animal origin: a risk assessment*. Preventive Veterinary Medicine, 1994. **20**(3): p. 235-247.
2. Bischoff, F., *Carcinogenic Effects of Steroids*, in *Advances in Lipid Research*, P. Rodolfo and K. David, Editors. 1969, Elsevier. p. 165-244.
3. Penot, M., *Développement méthodologique pour l'étude des cinétiques et du métabolisme d'un Modulateur Spécifique des Récepteurs Androgènes : l'ENOBOSARM*, in *Chimie des Molécules Bioactives Spécialité Stratégie et Qualité en Chimie Analytique*. 2014, ONIRIS: Laboratoire d'étude des résidus et contaminants dans les aliments - Nantes - France. p. 52.
4. Dikeman, M.E., *Effects of metabolic modifiers on carcass traits and meat quality*. Meat Science, 2007. **77**(1): p. 121-135.
5. Handelsman, D.J., *Androgen misuse and abuse*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2011. **25**(2): p. 377-389.
6. HALL, J.E., GUYTON, A.C., *Tratado de Fisiología Médica*. 13ra ed. 2016, Barcelona, España: Elsevier España.
7. Gao, W., J. Kim, and J.T. Dalton, *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Nonsteroidal Androgen Receptor Ligands*. Pharmaceutical research, 2006. **23**(8): p. 1641-1658.
8. Narayanan, R., et al., *Selective androgen receptor modulators in preclinical and clinical development*. Nuclear Receptor Signaling, 2008. **6**: p. e010.
9. Kicman, A.T., *Pharmacology of anabolic steroids*. British Journal of Pharmacology, 2008. **154**(3): p. 502-521.
10. Clark, A.S. and L.P. Henderson, *Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids*. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2003. **27**(5): p. 413-436.
11. Dotson, J.L. and R.T. Brown, *The History of the Development of Anabolic-Androgenic Steroids*. Pediatric Clinics of North America, 2007. **54**(4): p. 761-769.
12. Kanayama, G., et al., *Treatment of anabolic-androgenic steroid dependence: Emerging evidence and its implications*. Drug and Alcohol Dependence, 2010. **109**(1-3): p. 6-13.

13. Dalton, J.T., et al., *Discovery of Nonsteroidal Androgens*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998. **244**(1): p. 1-4.
14. Sydor, A.R.J., *Développement méthodologique associé à l'étude de la cinétique de l'enobosarm et de ses métabolites dans les fèces de veaux, in ECOLE NATIONALE VETERINAIRE, de l'AGROALIMENTAIRE ET DE L'ALIMENTATION*. 2015, ONIRIS NANTES ATLANTIQUE. p. 99.
15. Aikawa, K., et al., *Synthesis and biological evaluation of novel selective androgen receptor modulators (SARMS). Part I*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2015. **23**(10): p. 2568-2578.
16. Bhasin, S. and R. Jasuja, *Selective Androgen Receptor Modulators (SARMS) as Function Promoting Therapies*. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, 2009. **12**(3): p. 232-240.
17. Gao, W., C.E. Bohl, and J.T. Dalton, *Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor*. Chemical reviews, 2005. **105**(9): p. 3352-3370.
18. Boyle, G.W., et al., *Metabolism of Casodex in laboratory animals*. Xenobiotica, 1993. **23**(7): p. 781-798.
19. McKillop, D., et al., *Metabolism and enantioselective pharmacokinetics of Casodex in man*. Xenobiotica, 1993. **23**(11): p. 1241-1253.
20. Lunglmayr, G., *Casodex (ICI 176,334), A New, Non-Steroidal Anti-Androgen. Early Clinical Results*. Hormone Research in Paediatrics, 1989. **32**(suppl 1)(Suppl. 1): p. 77-81.
21. Tyrrell, C.J., et al., *Casodex 10-200 mg daily, used as monotherapy for the treatment of patients with advanced prostate cancer. An overview of the efficacy, tolerability and pharmacokinetics from three phase II dose-ranging studies*. Casodex Study Group. Eur Urol, 1998. **33**(1): p. 39-53.
22. Soloway, M.S., et al., *Bicalutamide in the Treatment of Advanced Prostatic Carcinoma: A Phase II Noncomparative Multicenter Trial Evaluating Safety, Efficacy and Long-Term Endocrine Effects of Monotherapy*. The Journal of Urology, 1995. **154**(6): p. 2110-2114.
23. Chodak, G., et al., *Single-agent therapy with bicalutamide: a comparison with medical or surgical castration in the treatment of advanced prostate carcinoma*. Urology, 1995. **46**(6): p. 849-55.
24. Mahler, C. and L. Denis, *Clinical profile of a new non-steroidal antiandrogen*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1990. **37**(6): p. 921-924.

25. Kennealey, G.T. and B.J. Furr, *Use of the nonsteroidal anti-androgen Casodex in advanced prostatic carcinoma*. Urol Clin North Am, 1991. **18**(1): p. 99-110.
26. Verhelst, J., et al., *Endocrine profiles during administration of the new non-steroidal anti-androgen Casodex in prostate cancer*. Clin Endocrinol (Oxf), 1994. **41**(4): p. 525-30.
27. Cockshott, I., *Bicalutamide*. Clinical Pharmacokinetics, 2004. **43**(13): p. 855-878.
28. Furr, B.J., "*Casodex*" (ICI 176,334)--a new, pure, peripherally-selective anti-androgen: preclinical studies. Horm. Res., 1989. **32**: p. 69-76.
29. Gao, W. and J.T. Dalton, *Expanding the therapeutic use of androgens via selective androgen receptor modulators (SARMs)*. Drug discovery today, 2007. **12**(5-6): p. 241-248.
30. Marhefka, C.A., et al., *Design, Synthesis, and Biological Characterization of Metabolically Stable Selective Androgen Receptor Modulators*. Journal of Medicinal Chemistry, 2004. **47**(4): p. 993-998.
31. Dalton, J.T., D.D. Miller, and J. Kearbey, *Sarms and method of use thereof*. 2011, Google Patents.
32. Chen, J., J. Kim, and J.T. Dalton, *Discovery AND Therapeutic Promise OF Selective Androgen Receptor Modulators*. Molecular interventions, 2005. **5**(3): p. 173-188.
33. Thevis, M., et al., *Ultrahigh pressure liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in human sports drug testing: Possibilities and limitations*. Journal of Chromatography A, 2013. **1292**(0): p. 38-50.
34. Thevis, M.S., Wilhelm, *Targeting new performance enhancing drugs in doping controls: Selective androgen receptor modulators (SARMs)*. Spectroscopy Europe, 2010. **22**(4): p. 6.
35. Gomez, C., et al., *Analytical strategies based on mass spectrometric techniques for the study of steroid metabolism*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2014. **53**(0): p. 106-116.
36. Kuuranne, T., et al., *Aryl-propionamide-derived selective androgen receptor modulators: liquid chromatography-tandem mass spectrometry characterization of the in-vitro synthesized metabolites for doping control purposes*. Drug Metab Dispos, 2008. **36**(3): p. 571-81.
37. Krug, O., et al., *Characterization of In-vitro Synthesized Equine Metabolites of the Selective Androgen Receptor Modulators S24 and S4*. Journal of Equine Veterinary Science, 2012. **32**(9): p. 562-568.

38. de Rijke, E., et al., *Selective androgen receptor modulators: in-vitro and in vivo metabolism and analysis*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2013. **30**(9): p. 1517-26.
39. Thevis, M., et al., *Characterization of in-vitro generated metabolites of the selective androgen receptor modulators S-22 and S-23 and in vivo comparison to post-administration canine urine specimens*. Drug Test Anal, 2010. **2**(11-12): p. 589-98.
40. Thevis, M. and W. Schänzer, *Analytical approaches for the detection of emerging therapeutics and non-approved drugs in human doping controls*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014. **101**(0): p. 66-83.
41. Thevis, M., et al., *Mass spectrometric characterization of urinary metabolites of the selective androgen receptor modulator andarine (S-4) for routine doping control purposes*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2010. **24**(15): p. 2245-2254.
42. Thevis, M., et al., *Detection of the arylpropionamide-derived selective androgen receptor modulator (SARM) S-4 (Andarine) in a black-market product*. Drug Test Anal, 2009. **1**(8): p. 387-92.
43. Thevis, M., et al., *Trafficking of drug candidates relevant for sports drug testing: Detection of non-approved therapeutics categorized as anabolic and gene doping agents in products distributed via the Internet*. Drug Testing and Analysis, 2011. **3**(5): p. 331-336.
44. Grata, E., et al., *SARM-S4 and metabolites detection in sports drug testing: A case report*. Forensic Science International. **213**(1): p. 104-108.
45. Hansson, A., et al., *Characterization of equine urinary metabolites of selective androgen receptor modulators (SARMs) S1, S4 and S22 for doping control purposes*. Drug Testing and Analysis, 2015. **7**(8): p. 673-683.
46. Kim, J., et al., *Absorption, distribution, metabolism and excretion of the novel SARM GTx-024 [(S)-N-(4-cyano-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-cyanophenoxy)-2-hydroxy-2-methylpropanamide] in rats*. Xenobiotica, 2013. **43**(11): p. 993-1009.
47. Thevis, M., M. Kamber, and W. Schänzer, *Screening for metabolically stable aryl-propionamide-derived selective androgen receptor modulators for doping control purposes*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006. **20**(5): p. 870-876.
48. Thevis, M., et al., *Mass spectrometric characterization of urinary metabolites of the selective androgen receptor modulator S-22 to identify*

- potential targets for routine doping controls*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2011. **25**(15): p. 2187-2195.
49. Grata, E., et al., *SARM-S4 and metabolites detection in sports drug testing: A case report*. Forensic Science International, 2011. **213**(1): p. 104-108.
 50. Virus, E.D., T.G. Sobolevsky, and G.M. Rodchenkov, *Introduction of HPLC/orbitrap mass spectrometry as screening method for doping control*. Journal of Mass Spectrometry, 2008. **43**(7): p. 949-957.
 51. Yin, D., et al., *Pharmacology, Pharmacokinetics, and Metabolism of Acetothiolutamide, a Novel Nonsteroidal Agonist for the Androgen Receptor*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2003. **304**(3): p. 1323.
 52. Perera, M.A., et al., *In Vivo Metabolism and Final Disposition of a Novel Nonsteroidal Androgen in Rats and Dogs*. Drug Metabolism and Disposition, 2006. **34**(10): p. 1713-1721.
 53. Yi, P., et al., *Disposition and Metabolism of LY2452473, a Selective Androgen Receptor Modulator, in Humans*. Drug Metabolism and Disposition, 2012. **40**(12): p. 2354-2364.
 54. Yang, J., Wu, Z., Wu, D., Darby, M. V., Hong, S. S., Miller, D. D., Dalton, J. , *"Pharmacokinetics, biodistribution and metabolism of a novel selective androgen receptor modulator designed for prostate cancer imaging"*. International Journal of Oncology, 2010. **36**(1): p. 213-222.
 55. Kim, B.S., J.; Lee, S.; Yu, K.; Hyun S., *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Determination of Bicalutamide in Human Plasma and Application to a Bioequivalence Study*. Journal of Bioanalysis & Biomedicine, 2011. **3**(5): p. 98-102.
 56. Wenqing Gao, B.S., *Pharmacology Of Selective Androgen Receptor Modulators (SARMS)*. 2004, The Ohio State University.
 57. Wu, D., et al., *PHARMACOKINETICS AND METABOLISM OF A SELECTIVE ANDROGEN RECEPTOR MODULATOR IN RATS: IMPLICATION OF MOLECULAR PROPERTIES AND INTENSIVE METABOLIC PROFILE TO INVESTIGATE IDEAL PHARMACOKINETIC CHARACTERISTICS OF A PROPANAMIDE IN PRECLINICAL STUDY*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2006. **34**(3): p. 483-494.
 58. Sharma, K., et al., *Development and validation of a highly sensitive LC-MS/MS-ESI method for the determination of bicalutamide in mouse plasma: application to a pharmacokinetic study*. Biomedical Chromatography, 2012. **26**(12): p. 1589-1595.

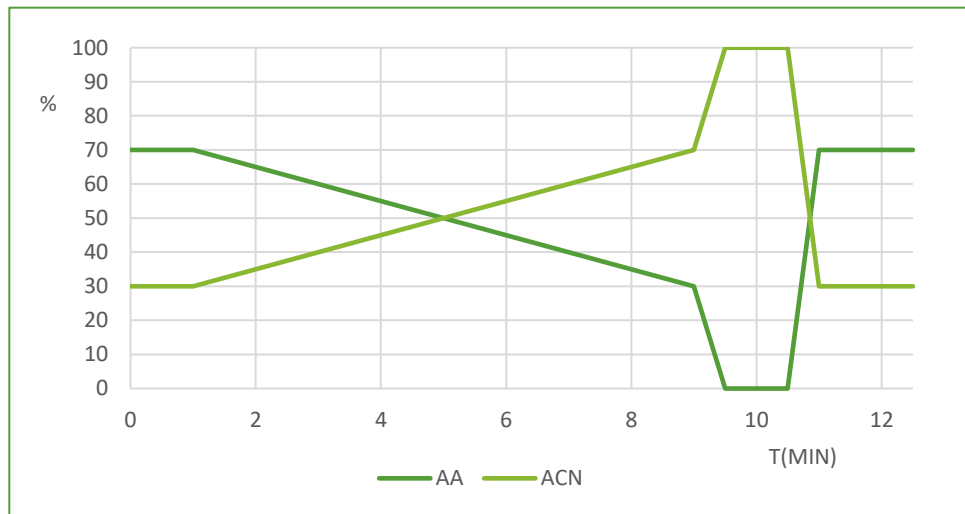
59. Zheng, H., et al., *Determination of 2-Hydroxyflutamide in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS): Application to a bioequivalence study on Chinese volunteers*. Journal of Chromatography B, 2010. **878**(19): p. 1611-1615.
60. Animal, O.-O.M.d.S., *Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres, (mamíferos, aves y abejas)*. 2004. **1**.
61. Lozano, A., et al., *Identification and measurement of veterinary drug residues in beehive products*. Food Chemistry, 2019. **274**: p. 61-70.
62. Anastassiades, M., K. Maštovská, and S.J. Lehotay, *Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides*. Journal of Chromatography A, 2003. **1015**(1): p. 163-184.
63. McKillop, D., et al., *Enantioselective metabolism and pharmacokinetics of Casodex in the male rat*. Xenobiotica, 1995. **25**(6): p. 623-633.
64. Gao, W., et al., *Interspecies differences in pharmacokinetics and metabolism of S-3-(4-acetylamino-phenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-N-(4-nitro-3-trifluoromethylphenyl)-propionamide: the role of N-acetyltransferase*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2006. **34**(2): p. 254-260.
65. Kearbey, J.D., et al., *Pharmacokinetics of S-3-(4-acetylamino-phenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-N-(4-nitro-3-trifluoromethyl-phenyl)-propionamide in rats, a non-steroidal selective androgen receptor modulator*. Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems, 2004. **34**(3): p. 273-280.
66. Garg, N., et al., *Structural elucidation of major selective androgen receptor modulator (SARM) metabolites for doping control*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2018. **16**(5): p. 698-702.
67. Rydevik, A., et al., *The fungus Cunninghamella elegans can produce human and equine metabolites of selective androgen receptor modulators (SARMs)*. Xenobiotica, 2013. **43**(5): p. 409-420.
68. Li, H., et al., *Modified metabolites mapping by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry using full scan/all ion fragmentation/neutral loss acquisition*. Journal of Chromatography A, 2018.
69. Araujo, P., et al., *A simple liquid extraction protocol for overcoming the ion suppression of triacylglycerols by phospholipids in liquid chromatography mass spectrometry studies*. Talanta, 2016. **148**: p. 463-471.

70. E. Salvat, A., et al., *Zearalenone content in animal fodder samples in relation to weather conditions in Colonia Benítez, northeastern Argentina*. Vol. 45. 2016.

Annex I

LABERCA CROMATOGRAPHIC SYSTEM

- Column ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μm ; 2.1 x 100 mm)
- Volume of Injection: 2 μL
- Mobil Phase: Acid Formic 0.1% (AA) / Acetonitrile (ACN)
- Flow: 0.6 mL/min



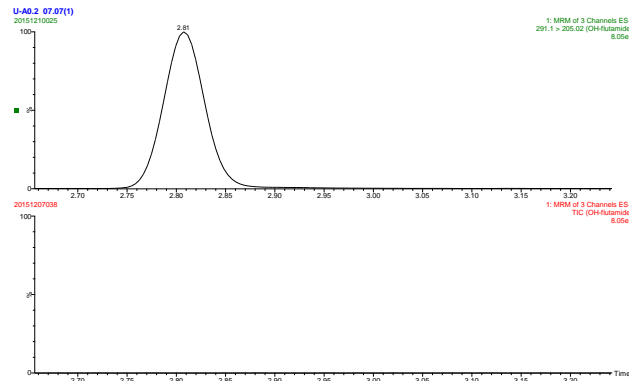
- Configuration of mass spectrometry detector

Parameter	
Ionization Electrospray	ESI -
Source Temperature	150 °C
Capillary voltage	- 2 kV
Source offset	30 V
Desolvation Temperature	450 °C
Cone Flow (nitrogen)	150 L/h
Desolvation Flow	650 L/h
Pressure de nebulization	7 Bar
Gas collision flow	0,15 L/min

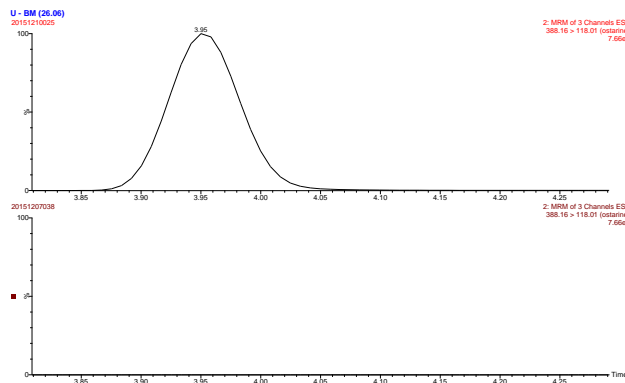
Chromatography

Chromatograms comparison are presented: extracted blank samples and spiked extract samples.

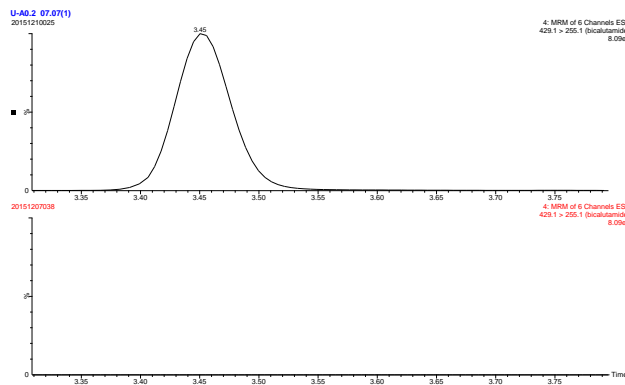
Chromatograms of 2 urine samples: below a Blank sample and above 0.2 ng/mL de **Hidroxyflutamide** (291.1>205.02).



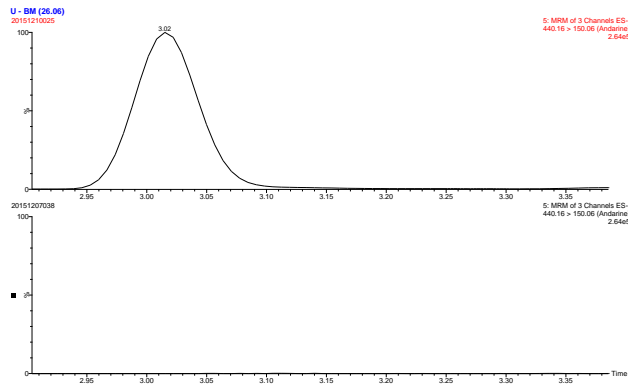
- **Enobosarm (388.16>118.01)**



- **Bicalutamide (429,1>255,1)**

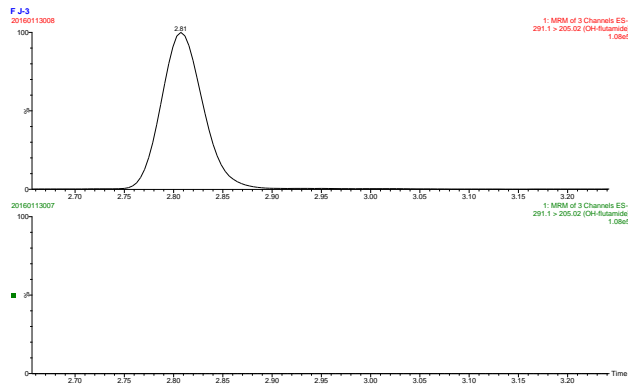


- **Andarine (440.16>150.06)**

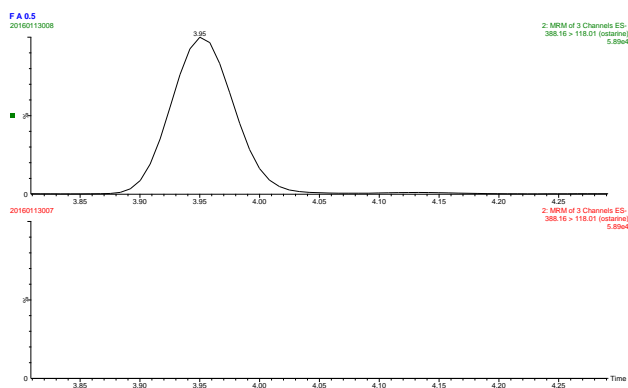


Chromatograms of faeces samples are presented below. The concentration used was 0.5 ng/g.

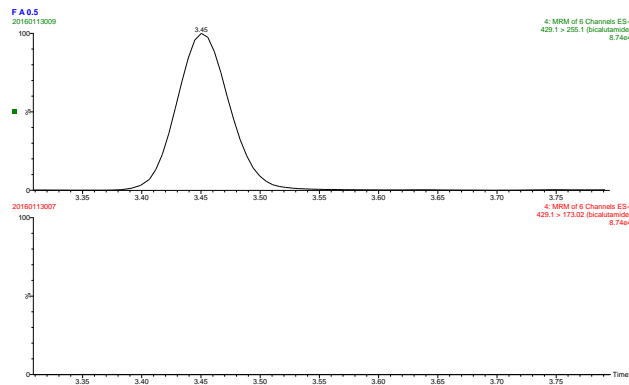
- **Hidroxyflutamide (291.1>205.02)**



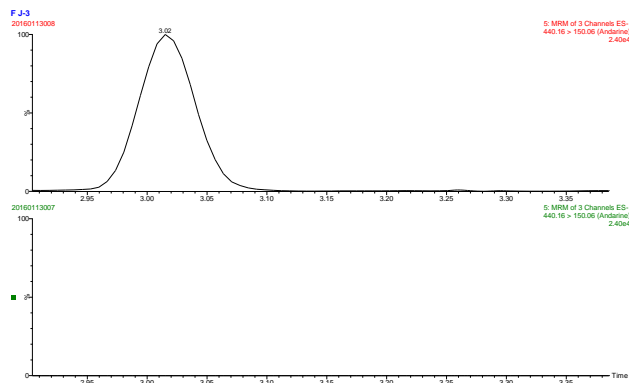
- **Enobosarm (388.16>118.01)**



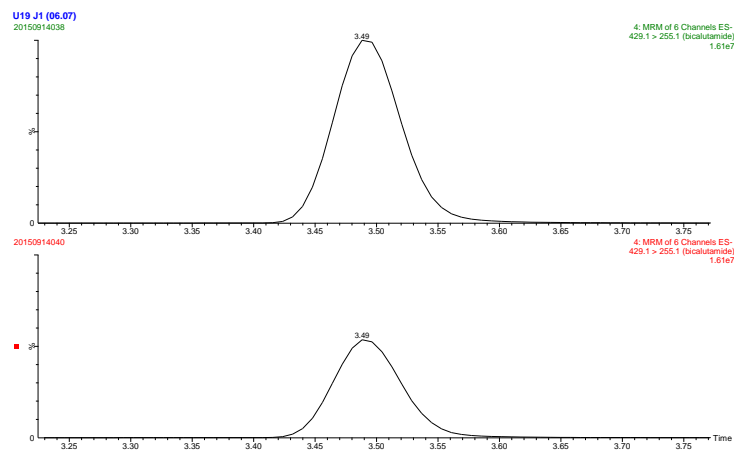
- **Bicalutamide (429.1>255.1)**



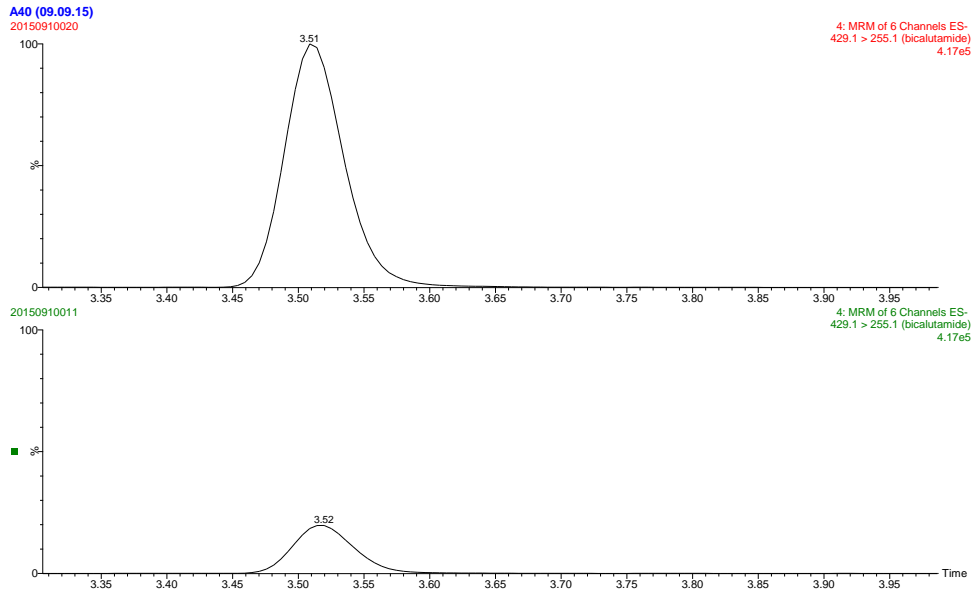
- **Andarine (440.16>150.06)**



Below chromatograms of a urine sample with the addition of Bicalutamide (above) and a urine sample of a treated animal (with 100 mg of Casodex®).



Below chromatograms of a faeces sample with the addition of Bicalutamide (above) and a urine sample of a treated animal (with 100 mg of Casodex[®]).



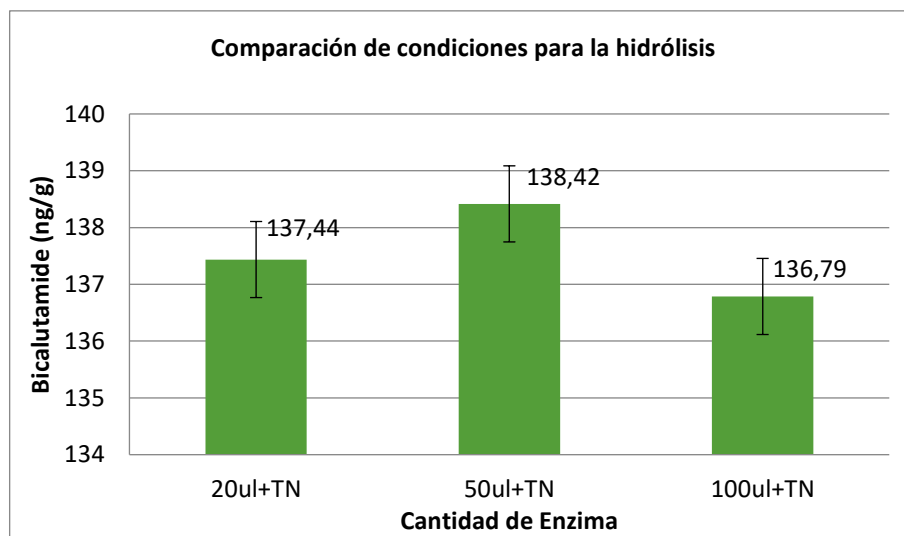
Annex II

HYDROLYSIS STUDIES AND STABILITY OF BICALUTAMIDE

Enzymatic Hydrolysis

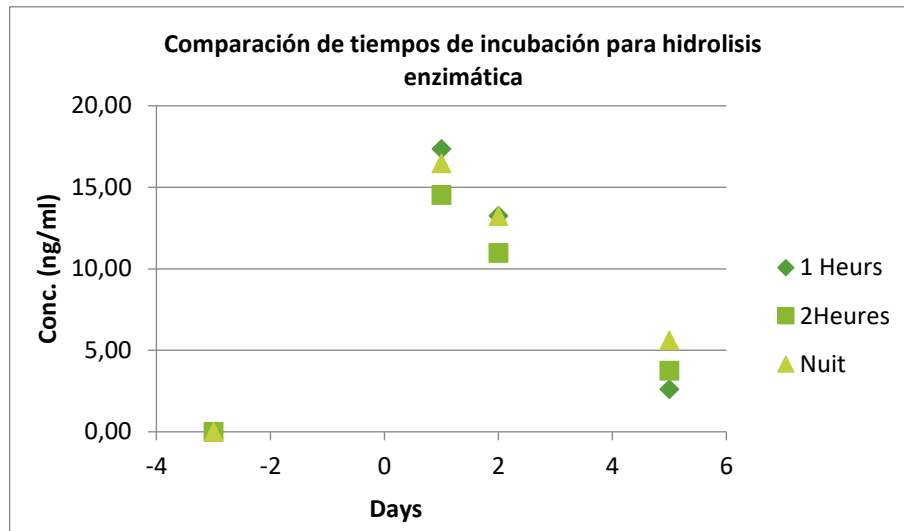
It was worked with urine samples and faeces of the treated animal. Different conditions (enzymes amount and incubation time) were tested to study the hydrolysis of conjugated Bicalutamide (Phase II metabolites).

The following Figure shows the results obtained using different amounts of enzymes (expressed in Volume: 20 μ l; 50 μ l; and 100 μ l) for the analysis of the same faeces sample (incubating overnight at 50°C). The vertical lines of each bar represent the standard deviation found from the test (0.67 ng/g).



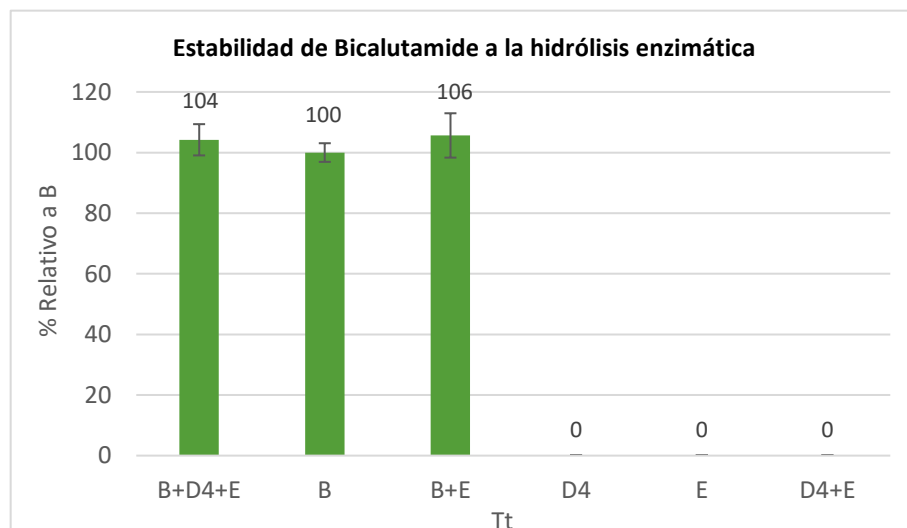
The results show that 20 μ l of enzyme are equivalent to 50 μ l and do not increase using 100 μ l. There is no trend and the concentrations obtained with 20 μ l or 50 μ l do not show significant differences as the standard deviations overlap.

The following Figure shows the concentrations of Bicalutamide in urine from different days for different incubation times: one hour (1 Heures), two hours (2 Heures) and overnight (Nuit).



No marked differences or trends were observed between the trials in order to be able to select “the best condition” according to the concentration of Bicalutamide released. For operational reasons, overnight incubation was chosen (50°C).

Bicalutamide stability was tested for enzymatic action: it was studied to know if the enzymatic activity alters (increases/decreases) the Bicalutamide concentration. For this purpose, 5 tubes were incubated with the following mixtures: Bicalutamide + Bicalutamide-D4 + Enzyme (B+D4+E); Bicalutamide (B); Bicalutamide + Enzyme (B+E); Bicalutamide-D4 (D4) and Enzyme (E). After overnight incubation (10 hours) the concentrations of Bicalutamide were determined. Since the Bicalutamide amounts in each mixture were the same, the following figure was constructed by expressing Bicalutamide concentrations in relative percentages to tube B (100 %).



Little difference can be observed in the percentages (standard deviation) obtained between tubes with Bicalutamide and absence in tubes where it was not added. These results support the stability of Bicalutamide to enzymatic action.

Chemical Hydrolysis

The aim was to free Bicalutamide conjugated (Phase II metabolites) by testing 3 hydrolysis methods described in the literature consulted {Gomez, 2014 #91}{Kaabia, 2014 #138}.

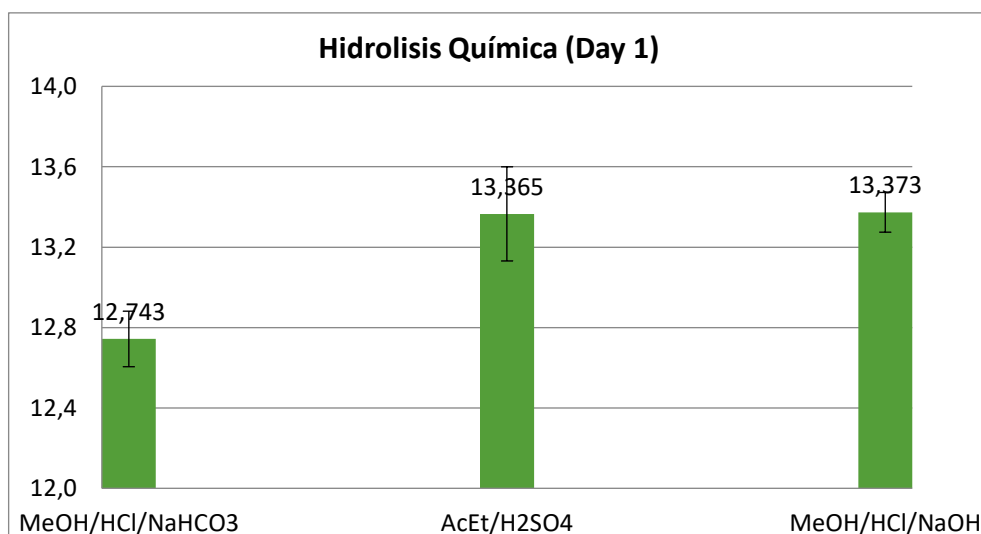
In this test it was worked with day 1 urine to obtain comparable results and each method was performed 2 to 5 times.

1) Method 1 (MeOH/HCl/NaOH): The urine sample was treated with the same SPE method (See Urines, page 41). The modification to perform the chemical hydrolysis was carried out after evaporating the 4 mL of methanol (elute), the residues were treated with hydrochloric acid (HCl) in methanol (MeOH), to stop the reaction sodium hydroxide (NaOH) was used.

2) Method 2 (MeOH/HCl/NaHCO₃): Method 1 was applied, but Sodium Hydrogen Carbonate (NaHCO₃) was added to stop the reaction.

3) Method 3 (AcEt/H₂SO₄): for hydrolysis a mixture of ethyl acetate (Acet) with sulphuric acid (H₂SO₄) was used and stopped with NaOH.

Comparation de las concentracions promedio de Bicalutamide determinadas en Urine del day 1.



Results obtained with chemical hydrolysis methods did not reach the values of the enzyme method (17.36 ng/mL).

In order to determine the absence of degradation of Bicalutamide/Bicalutamide-D4 (ISTD) to chemical agents, Bicalutamide and Bicalutamide-D4 were subjected to the conditions of chemical hydrolysis. Tubes with mixtures containing the same amount of Bicalutamide were prepared, similar to the Bicalutamide stability test for enzymatic activity. No alterations in the concentration of Bicalutamide (increase/decrease) were observed in any of the cases. Data from these trials are not included since the rest of the work was done by enzymatic hydrolysis.

The conclusions of these trials showed that Bicalutamide is resistant to the enzymatic action tested. It was established that enzymatic hydrolysis has a better performance, Volume of enzymatic extract and incubation time were set.

Annex III

METHOD EVALUATION

The following table show the signal (S) obtained after adding the analytes to *blank samples* (untreated animals). These data were used for the construction of *calibration curves*.

Urines

Calibration curves:

	Hidroxyflutamide	Enobosarm	Bicalutamide	Andarine
Concentration (ng/mL)	S (A/IS)	S (A/IS)	S (A/IS)	S (A/IS)
0.25	0.452	0.240	0.329	0.125
0.5	0.762	0.720	0.532	0.302
1	1.490	1.060	1.154	0.470
3	4.386	2.871	2.921	1.079
10	13.230	9.496	10.957	4.264
30	40.991	29.122	29.450	11.635

S (A/IS): is the relationship between the area of the analyte (A) and the area of the internal standard (IS).

	Hidroxyflutamide	Enobosarm	Bicalutamide	Andarine
Concentration (ng/mL)	S (A/IS)	S (A/IS)	S (A/IS)	S (A/IS)
0.25	0.521	0.331	0.316	0.198
1	0.826	0.546	0.515	0.265
0.5	1.530	0.916	1.077	0.292
3	4.120	3.476	2.540	0.830
10	13.923	11.028	10.499	3.399
30	48.213	28.156	28.824	10.058

	Hidroxyflutamide	Enobosarm	Bicalutamide	Andarine
Concentration (ng/mL)	S (A/IS)	S (A/IS)	S (A/IS)	S (A/IS)
0.25	0.673	0.392	0.360	0.138
0.5	0.784	0.484	0.688	0.299
1	1.835	1.176	1.150	0.369
3	5.051	2.720	3.296	1.284
10	15.794	9.298	8.721	3.281
30	38.928	31.276	28.351	10.796

Recovery test: were performed to calculate recovery (*accuracy*), variability (*Precision*) and limit of quantification (*sensitivity*).

Hidroxyflutamide			
Conc_Nom (ng/mL)	C1	C2	C3
0.25	0.252	0.293	0.255
0.5	0.540	0.538	0.554
1	1.151	1.015	1.041
3	3.555	2.953	2.899
10	9.711	9.810	9.811
30	34.567	29.629	29.182

Enobosarm			
Conc_Nom (ng/mL)	C1	C2	C3
0.25	0.194	0.183	0.194
0.5	0.539	0.581	0.541
1	1.016	1.081	1.115
3	3.199	3.177	3.059
10	11.840	10.677	10.494
30	29.352	33.623	30.420

Bicalutamide			
Conc_Nom (ng/mL)	C1	C2	C3
0.25	0.244	0.270	0.239
0.5	0.520	0.499	0.535
1	1.033	1.063	1.098
3	3.246	3.345	3.063
10	10.281	10.821	10.287
30	30.341	31.137	30.102

Andarine			
Conc_Nom (ng/mL)	C1	C2	C3
0.25	0.179	0.257	0.225
0.5	0.489	0.502	0.391
1	0.809	0.832	1.015
3	3.059	3.203	2.935
10	10.697	10.033	8.203
30	26.509	31.300	27.277

The results are summarised in the table Table 12 (page 46)

Faeces

Calibration curves: Since the concentrations found in faeces varied in a wide range, the slope of the curves changes and for this reason more than one curve was built for each analyte.

Hidroxyflutamide			
Concentration (ng/mL)	S1 (A/IS)	S2 (A/IS)	S3 (A/IS)
0.5	0.803	0.843	0.883
1	1.580	1.772	1.413
3	4.697	5.032	5.242
10	16.214	16.454	16.734
30	45.851	48.598	45.527
50	75.525	71.865	77.501

Concentration (ng/mL)	S1 (A/IS)	S2 (A/IS)	S3 (A/IS)
100	1.313	1.332	1.283
200	1.696	1.764	1.831
300	2.089	2.159	2.298
500	2.911	2.886	3.162
800	3.996	3.919	4.358
1000	5.185	5.361	5.096
1300	5.975	5.863	6.086
1600	7.006	7.208	7.410

Enobosarm			
Concentration (ng/mL)	S1 (A/IS)	S2 (A/IS)	S3 (A/IS)
0.5	0.511	0.501	0.524
1	1.079	1.112	1.0116
3	3.012	3.171	3.047
10	14.201	14.113	13.919
30	37.728	37.477	37.594
50	56.210	57.299	58.666

Concentration (ng/mL)	S1 (A/IS)	S2 (A/IS)	S3 (A/IS)
100	0.065	0.066	0.068
200	0.109	0.113	0.102
300	0.161	0.153	0.169
500	0.261	0.286	0.218
800	0.399	0.402	0.406
1000	0.484	0.464	0.475
1300	0.609	0.615	0.536
1600	0.787	0.691	0.765

Bicalutamide			
Concentration (ng/mL)	S1 (A/IS)	S2 (A/IS)	S3 (A/IS)
0.5	0.6411	0.6357	0.6144
1	1.3367	1.3867	1.3292
3	4.0577	4.1266	4.1212
10	13.5737	14.2111	15.1293
30	34.7732	40.8141	38.7106
50	60.4741	63.3234	58.3000

Concentration (ng/mL)	S1 (A/IS)	S2 (A/IS)	S3 (A/IS)
100	0.2426	0.2735	0.2513
200	0.4319	0.4596	0.4681
300	0.6530	0.6389	0.6451
500	0.9776	1.0022	0.9236
800	1.4252	1.3900	1.4965
1000	1.7101	1.8105	1.8021
1300	2.3373	2.3578	2.3474
1600	2.8973	2.7809	2.5733

Andarine			
Concentration (ng/mL)	S1 (A/IS)	S2 (A/IS)	S3 (A/IS)
0.5	0.1317	0.1064	0.1472
1	0.3814	0.2882	0.3856
3	1.4317	1.4309	1.4170
10	5.2128	5.6285	5.3778
30	13.0808	13.1015	13.4488
50	21.0125	21.0398	21.0182

Concentration (ng/mL)	S1 (A/IS)	S2 (A/IS)	S3 (A/IS)
100	0.0656	0.0675	0.0586
200	0.1040	0.1040	0.0940
300	0.1421	0.1392	0.1243
500	0.2184	0.2047	0.1953
800	0.2760	0.3069	0.2521
1000	0.3286	0.3479	0.3231
1300	0.4458	0.4497	0.4181
1600	0.5500	0.5279	0.4885

Recovery Test:

Hidroxyflutamide			
Concentration (ng/mL)	C1	C2	C3
0.5	0.542	0.563	0.495
1	1.085	0.985	0.900
3	3.294	2.936	3.194
10	9.293	10.100	9.837
30	31.498	29.400	34.500
50	53.796	54.000	51.000
100	96.770	93.000	97.000
200	175.610	184.000	214.000
300	333.709	318.000	291.000
500	502.273	480.000	545.000
800	758.659	776.000	752.000
1000	1010.911	900.000	1120.000
1300	1281.476	1248.000	1287.000
1600	1597.087	1520.000	1456.000

Enobosarm			
Concentration (ng/mL)	C1	C2	C3
0.5	0.584	0.498	0.501
1	0.998	1.045	1.087
3	2.871	3.077	2.957
10	9.777	9.185	10.560
30	30.708	26.835	26.793
50	50.290	46.240	51.280
100	111.809	97.684	84.532
200	206.246	199.367	220.841
300	277.474	262.004	306.068
500	507.487	581.649	478.725
800	785.680	795.520	753.920
1000	903.100	983.100	1023.700
1300	1250.600	1369.940	1200.680
1600	1509.280	1685.760	1621.920

Bicalutamide			
Concentration (ng/mL)	C1	C2	C3
0.5	0.486	0.428	0.489
1	1.006	0.984	1.094
3	2.977	3.185	3.214
10	9.412	9.827	10.813
30	25.293	31.239	27.957
50	43.555	49.600	49.630
100	82.651	93.657	102.817
200	191.595	205.869	204.540
300	309.746	304.899	298.260
500	421.100	496.010	440.850
800	811.120	737.440	842.960
1000	932.600	913.300	941.900
1300	1227.590	1158.560	1201.460
1600	1429.760	1558.240	1653.440

Andarine			
Concentration (ng/mL)	C1	C2	C3
0.5	0.470	0.457	0.460
1	1.012	0.930	0.872
3	2.737	3.193	2.650
10	9.526	9.820	8.432
30	27.702	27.732	27.423
50	42.695	45.085	49.620
100	73.555	104.216	100.366
200	216.000	199.915	184.563
300	294.922	316.800	293.474
500	396.650	496.800	406.100
800	746.560	642.400	672.880
1000	941.700	904.100	802.200
1300	1110.070	1174.420	1044.290
1600	1426.240	1317.600	1362.720

Annex IV

FIRST ANIMAL TRIAL

Elimination profiles

The values of concentration, SD (standard deviation) and RSD were calculated by the determination per quintuplicate of each day.

Urines

Bicalutamide in urines (breed *Montbeliard*):

Day	Free		Total	
	Conc(ng/mL)	SD (ng/mL)	Conc(ng/mL)	RSD %
-3	ND	ND	ND	-
0	ND	ND	ND	-
0.17	2.82	0.06	2.84	2
0.33	5.50	0.65	8.79	12
1	13.15	0.42	17.36	3
2	9.62	1.56	13.25	16
3	6.95	0.25	11.06	4
4	1.74	0.08	4.55	5
5	2.32	0.17	2.61	7
6	0.95	0.01	1.72	2
7	0.72	0.02	1.24	3

Faeces

Bicalutamide in faeces (breed *Montbeliard*):

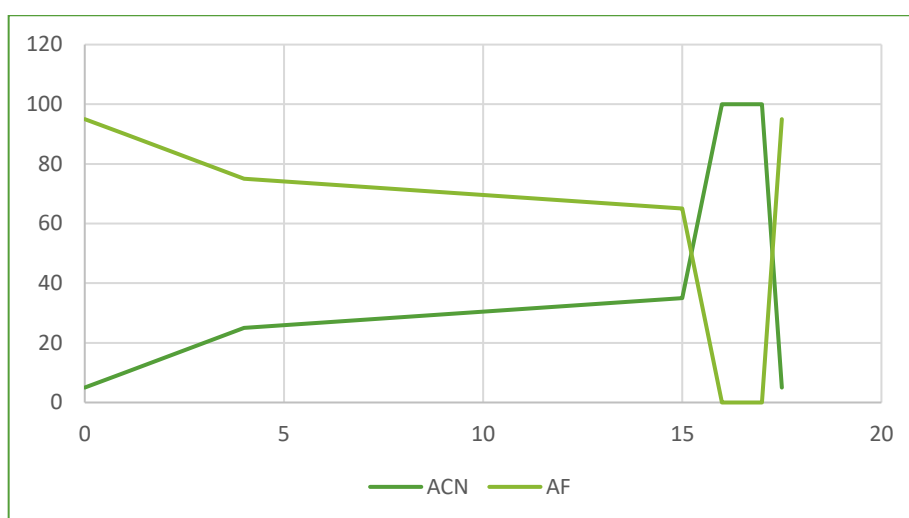
Day	Free		Total	
	Conc (ng/mL)	SD (ng/mL)	Conc(ng/mL)	RSD %
-3	ND	ND	ND	-
0	ND	ND	ND	-
0.17	7.10	0.33	2.83	5
0.34	119.07	3.08	130.33	3
1	1254.11	73.32	1346.66	6
2	776.58	10.12	966.56	1
3	471.25	40.29	491.76	9
4	213.52	22.24	247.92	10
5	112.32	2.55	117.69	2
6	82.00	3.59	60.70	4
7	52.90	1.43	37.35	3

Annex V

FIRST ANIMAL TRIAL: METABOLITES

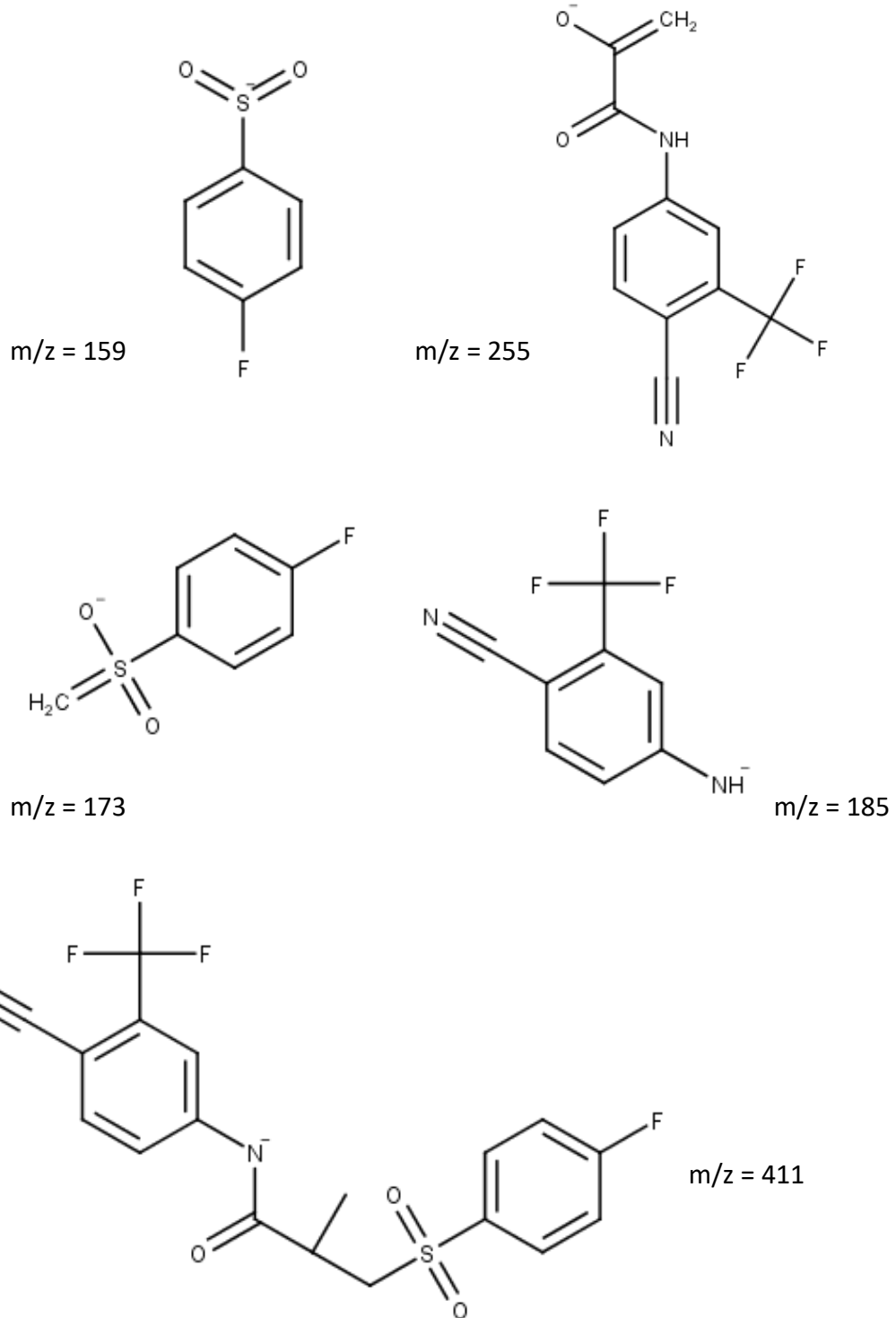
Chromatographic System

- Column ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μm ; 2.1 x 100 mm)
- Volume de Injection: 2 μL
- Mobil Phase: Acid Formic 0.1% (AF) / Acetonitrile (ACN)
- Flow: 0.4mL/min



Characteristic fragments of Bicalutamide

Based on previous studies of other authors it was possible identified the following fragments as characteristic for Bicalutamide [18, 19, 38, 63]:



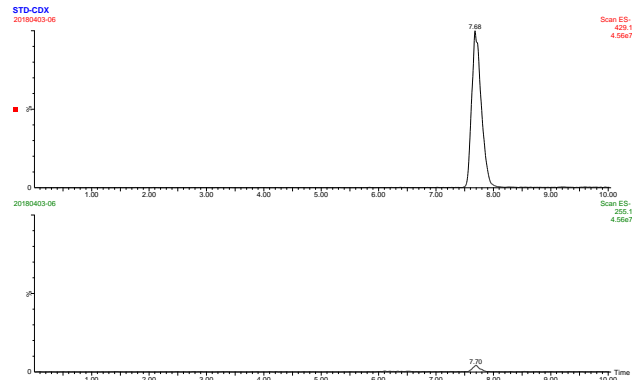
Annex VI

ADJUSTE OF CONE ENERGY

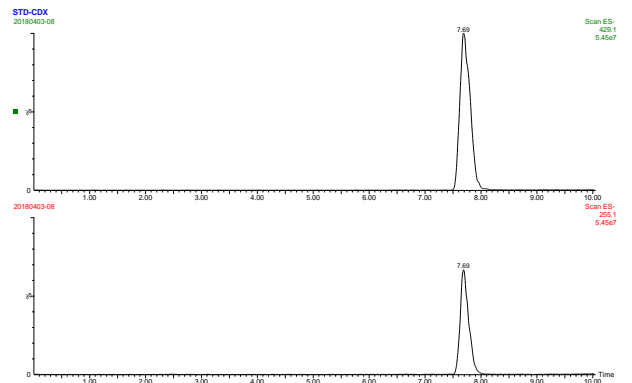
The following figures present the mass spectrometry responses in order to obtain the major response in single quadrupole mass spectrometry detector - Waters SQD (Laboratorio de contaminantes quimicos – INTA Castelar). It was used for the profile excretion of Bicalutamide and Andarine using Hidroxyflutamide as ISTD.

Bicalutamide (above $m/z = 429$ and below $m/z = 255$)

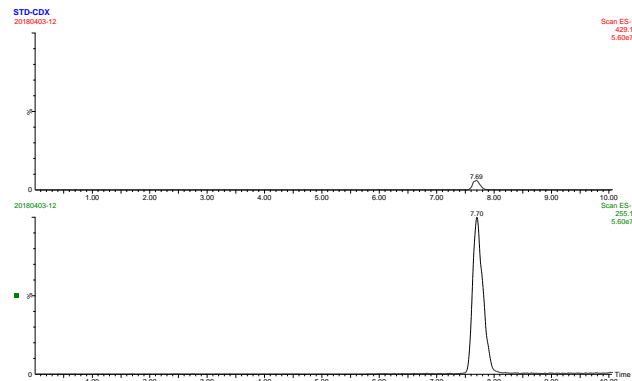
Cone energy: - 15 v

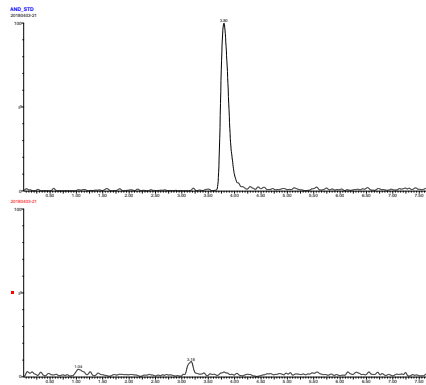
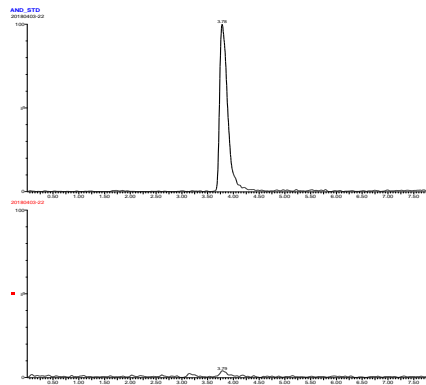
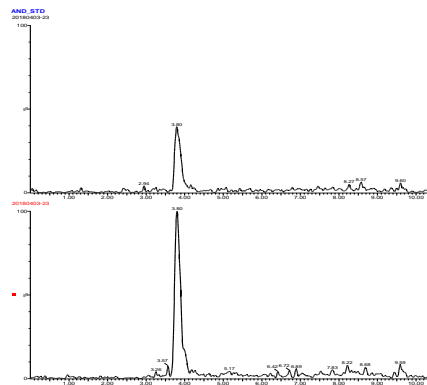


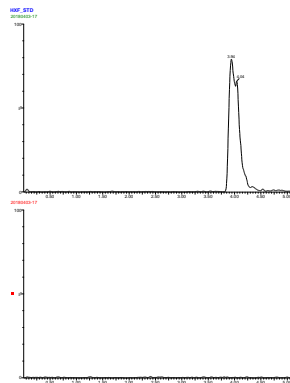
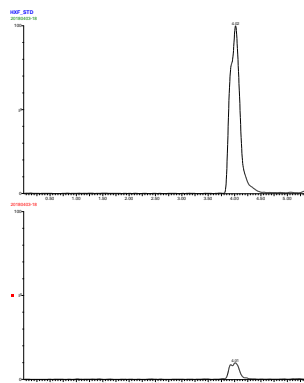
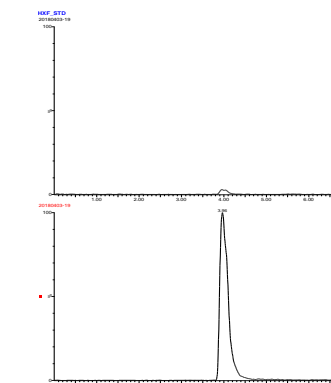
Cone energy: - 30 v



Cone energy: - 60 v



Andarine (above $m/z = 440$ and below $m/z = 261$)*Cone energy: - 15 v**Cone energy: - 30 v**Cone energy: - 60 v*

Hidroxyflutamide (above $m/z = 291$ and below $m/z = 205$)*Cone energy: - 15 v**Cone energy: - 30 v**Cone energy: - 60 v*

Based on this graphic information and others mass spectrometry tests in order to obtain the major signal for each compound the final cone energy established Bicalutamide 60 v; Andarine 40 v and Hidroxyflutamide 40 v (see Table 15, page 63).

Annex VII

METHOD EVALUATION

Calibration curves

It were used to determine Bicalutamide and Andarine concentrations and Hidroxyflutamide as ISTD.

The calibration curves were constructed several times (S1; S2; S3; etc.) because it were processed with samples. It were constructed to cover a wide range of concentrations.

Urines

<i>Bicalutamide</i>					
<i>Conc. (ng/ml)</i>	<i>S1</i>	<i>S2</i>	<i>S3</i>	<i>S4</i>	<i>S5</i>
0.25	0.181	0.159	0.152	0.178	0.107
0.5	0.341	0.312	0.313	0.307	0.289
1	0.691	0.585	0.574	0.629	0.622
3	1.954	2.007	1.718	1.754	1.623
5	3.318	3.189	3.134	3.363	3.645
10	6.755	6.068	6.186	6.331	7.897
20	13.515	13.543	11.899	11.660	13.244
30	17.519	18.410	18.459		
50	30.726	26.018	27.880		
100	56.158	48.922	49.338		
120	73.724	67.022	71.395		
150	85.006	72.998	77.441		
200	119.179	106.962	105.096		

Andarine					
Conc. (ng/ml)	S1	S2	S3	S4	S5
0.25	0.0697	0.0654	0.0619	0.0635	0.0672
0.5	0.1201	0.1245	0.1106	0.1143	0.0962
1	0.2652	0.2333	0.2070	0.2461	0.2244
3	0.7521	0.6504	0.6525	0.7164	0.6249
5	1.1807	1.0562	1.0925	1.1741	1.0743
10	2.3461	2.1699	2.0335	2.2069	2.3032
20	4.6167	4.5403	3.7836	4.0998	3.9200
30	6.4883	6.4516	6.452		
50	10.7944	10.4010	9.977		
100	20.9080	20.1136	18.171		
120	26.1530	22.3141	21.475		
150	32.0452	31.4926	30.084		
200	39.8037	36.3122	34.532		

Faeces

Bicalutamide				
conc (ng/g)	S1	S2	S3	S4
1	0.425	0.484	0.469	0.380
2	0.861	0.777	0.792	0.849
5	2.088	2.363	2.009	1.961
10	4.083	4.427	4.735	3.871
15	6.115	6.087	6.483	5.337
20	8.392	9.799	9.484	7.974
50	20.592	23.001	20.060	
100	38.756	40.872	42.544	
150	59.950	70.665	58.626	
200	79.057	79.673	78.491	
300	120.845	128.518	113.353	
600	234.865	228.418	237.497	
1000	391.275	400.793	329.587	
1500	447.762	465.150	492.783	
2000	579.789	585.529	627.470	
2500	732.506	740.058	754.859	
3000	897.140	972.877	993.145	
3500	1004.574	1077.979	1201.122	

Andarine				
conc (ng/g)	S1	S2	S3	S4
1	0.185	0.193	0.165	0.178
2	0.368	0.394	0.368	0.376
5	0.909	1.017	0.912	0.896
10	1.706	1.753	1.853	1.468
15	2.573	2.915	2.538	2.379
20	3.768	3.808	3.437	3.173
50	8.392	9.375	9.041	
100	17.641	17.924	18.427	
150	23.896	28.028	27.872	
200	37.510	36.323	35.795	
300	48.713	58.020	50.854	
600	101.355	102.557	91.779	
1000	171.281	174.899	145.516	
1500	186.179	203.450	213.314	
2000	259.771	270.944	278.896	
2500	333.849	340.841	344.391	
3000	413.268	434.793	434.699	
3500	442.740	470.897	524.969	

Serum

conc (ng/ml)	Bicalutamide			Andarine		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3
1	0.247	0.239	0.235	0.0769	0.0800	0.0741
2	0.467	0.479	0.477	0.1394	0.1556	0.1481
5	1.192	1.262	1.157	0.3404	0.3432	0.3481
10	2.498	3.119	2.752	0.6839	0.7406	0.6649
15	3.636	4.107	3.803	1.0533	1.0836	1.0012
20	4.652	5.687	5.124	1.3051	1.3842	1.4038
50	9.431	8.663	8.582	3.0670	2.848	2.608
100	18.854	18.015	18.063	6.0707	6.052	5.494
150	28.580	26.642	26.634	9.1951	8.472	7.902
200	40.009	34.610	34.922	11.8530	10.152	9.467
300	58.209	49.865	49.413	16.8940	14.906	14.629
600	117.867	111.527	110.559	36.3668	33.846	29.781
1000	190.426	168.023	156.844	58.2987	54.834	47.741

Linearity

It were evaluated as *determination coefficient* (r^2) from the calibration curves. The following tables present only the averages:

Bicalutamide			
	Urine	Faeces	Serum
a	0,617	0,392	0,229
b	0,125	4,231	0,313
r²	0,9951 ± 0,0051	0,9941 ± 0,0057	0,9971 ± 0,002

Andarine			
	Urine	Faeces	Serum
a	0,205	0,165	0,053
b	0,382	0,162	0,053
r²	0,9951 ± 0,0058	0,9955 ± 0,0054	0,9982 ± 0,0006

Accuracy

The accuracy was calculated as percentage recovery (R%) in the range of concentration found during the second animal trial.

Urine

Bicalutamide						
conc (ng/ml)	x1	x2	x3	R1	R2	R3
0.5	0.47	0.48	0.42	93.2	96.4	84.4
1	1.13	1.11	1.00	112.5	110.6	99.9
5	5.09	4.74	4.61	101.9	94.8	92.1
10	10.32	11.03	9.77	103.2	110.3	97.7
50	45.58	48.16	43.43	91.2	96.3	86.9
100	106.83	112.76	99.90	106.8	112.8	99.9
200	184.18	206.06	201.88	92.1	103.0	100.9

Andarine						
conc (ng/ml)	x1	x2	x3	R1	R2	R3
0.5	0.42	0.49	0.42	84.0	97.3	84.9
1	1.08	1.04	0.97	108.1	104.4	97.0
5	4.54	4.03	4.11	90.8	80.6	82.2
10	9.27	8.62	8.13	92.7	86.2	81.3
50	53.06	49.70	51.47	106.1	99.4	102.9
100	106.17	98.34	101.14	106.2	98.3	101.1
200	185.07	210.30	195.67	92.5	105.2	97.8

Faeces

Bicalutamide						
conc (ng/g)	x1	x2	x3	R1	R2	R3
2	1.89	2.02	1.79	94.3	101.2	89.6
5	4.74	4.99	4.28	94.7	99.8	85.5
10	10.11	10.82	10.31	101.1	108.2	103.1
50	51.89	53.73	47.76	103.8	107.5	95.5
100	105.08	102.93	101.15	105.1	102.9	101.1
1000	1028.47	1107.65	1021.46	102.8	110.8	102.1
2500	2620.69	2271.53	2521.14	104.8	90.9	100.8
3500	3692.47	3382.18	3258.06	105.5	96.6	93.1

Andarine						
conc (ng/g)	x1	x2	x3	R1	R2	R3
2	1.64	1.63	1.76	81.8	81.4	88.2
5	5.00	5.34	5.08	100.1	106.8	101.6
10	9.93	10.60	10.12	99.3	106.0	101.2
50	50.72	45.79	53.21	101.4	91.6	106.4
100	103.46	102.80	98.04	103.5	102.8	98.0
1000	1054.79	990.02	936.36	105.5	99.0	93.6
2500	2505.63	2331.33	2265.96	100.2	93.3	90.6
3500	3671.07	2844.28	3447.62	104.9	81.3	98.5

Serum

Bicalutamide						
Conc_N (ng/ml)	x1	x2	x3	R1	R2	R3
2	2.17	1.98	1.96	108.3	98.9	97.8
5	5.42	5.28	4.91	108.4	105.6	98.1
10	9.26	8.24	8.62	92.6	82.4	86.2
50	48.47	51.50	43.71	96.9	103.0	87.4
100	110.57	92.37	93.57	110.6	92.4	93.6
200	218.94	209.70	194.31	109.5	104.8	97.2
1000	1060.06	907.34	970.22	106.0	90.7	97.0

Andarine						
Conc_N (ng/ml)	x1	x2	x3	R1	R2	R3
2	1.99	2.26	2.01	99.6	112.9	100.6
5	4.22	4.74	4.02	84.4	94.7	80.5
10	10.46	10.43	9.87	104.6	104.3	98.7
50	53.79	45.66	48.82	107.6	91.3	97.6
100	106.79	92.37	100.40	106.8	92.4	100.4
200	213.90	200.60	216.06	106.9	100.3	108.0
1000	1041.04	912.06	1013.40	104.1	91.2	101.3

The following table presents R% and RSD% as ranges:

	<i>Urine</i>		<i>Faeces</i>		<i>Serum</i>	
	<i>Bicalutamide</i>	<i>Andarine</i>	<i>Bicalutamide</i>	<i>Andarine</i>	<i>Bicalutamide</i>	<i>Andarine</i>
R %	84.4 - 112.8	80.6 - 108.1	85.5 - 110.8	81.3 - 106.8	82.4 - 110.6	80.5 - 112.9
RSD %	5.2 - 6.8	3.3 - 8.3	1.9 - 7.7	2.9 - 12.9	5.1 - 10.3	3.2 - 8.5

Precision

The followings tables presents concentrations obtained for spiked samples. The analysis were made triplicated and at different concentration Urines: 0.25, 0.5, 1, 3 and 10 ng/mL; serum and faeces 1, 2, 5, 10 and 20 ppb (serum: ng/mL and faeces: ng/g).

Urines

<i>Conc_Nom</i>	<i>Bicalutamide (ng/mL)</i>			<i>RSD%</i>
	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	
0.25	0.20	0.23	0.27	13.4
0.5	0.46	0.51	0.53	6.6
1	0.95	0.98	1.04	4.6
3	2.71	2.94	3.26	9.3
10	9.73	9.76	10.34	3.5

<i>Conc_Nom</i>	<i>Andarine (ng/mL)</i>			<i>RSD%</i>
	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	
0.25	0.23	0.24	0.28	12.0
0.5	0.45	0.49	0.54	8.5
1	0.93	0.99	1.07	7.1
3	2.79	3.01	3.18	6.5
10	9.54	10.32	10.47	4.9

Faeces

Bicalutamide (ng/g)				
<i>Conc_Nom</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	RSD%
1	0.89	1.09	1.12	12.1
2	1.86	1.97	2.16	7.6
5	4.72	5.27	5.35	6.7
10	9.30	10.65	10.71	7.8
20	19.13	20.67	21.20	5.3

Andarine (ng/g)				
<i>Conc_Nom</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	RSD%
1	0.79	0.86	0.97	10.7
2	1.79	1.96	2.14	8.9
5	4.68	4.85	5.26	6.0
10	9.31	9.89	10.42	5.6
20	18.72	19.65	21.22	6.4

Serum

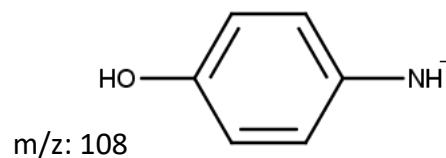
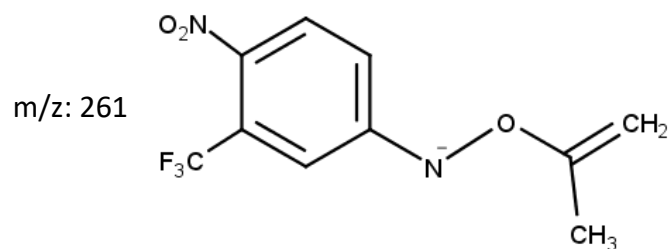
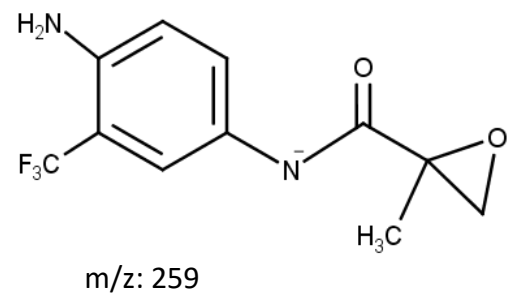
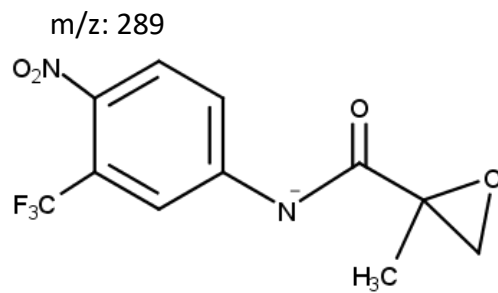
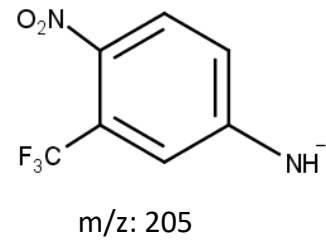
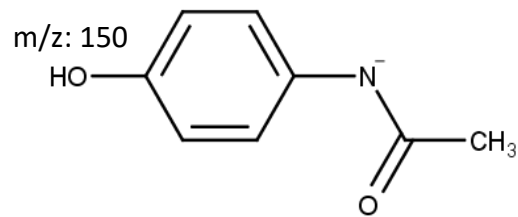
Bicalutamide (ng/mL)				
<i>Conc_Nom</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	RSD%
1	0.92	0.93	1.13	11.9
2	1.92	2.06	2.13	5.3
5	4.63	5.25	5.35	7.7
10	9.35	9.47	10.77	8.0
20	18.40	20.29	22.21	9.4

Andarine (ng/mL)				
<i>Conc_Nom</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	RSD%
1	0.92	0.94	1.12	11.3
2	1.86	2.04	2.17	7.7
5	4.35	4.56	5.35	11.1
10	9.32	10.68	10.71	7.8
20	18.22	20.64	21.40	8.3

Annex VIII

CHARACTERISTIC FRAGMENTS OF ANDARINE

The following chemical structures are based on previous studies made by others authors [36, 38, 45, 52, 65].



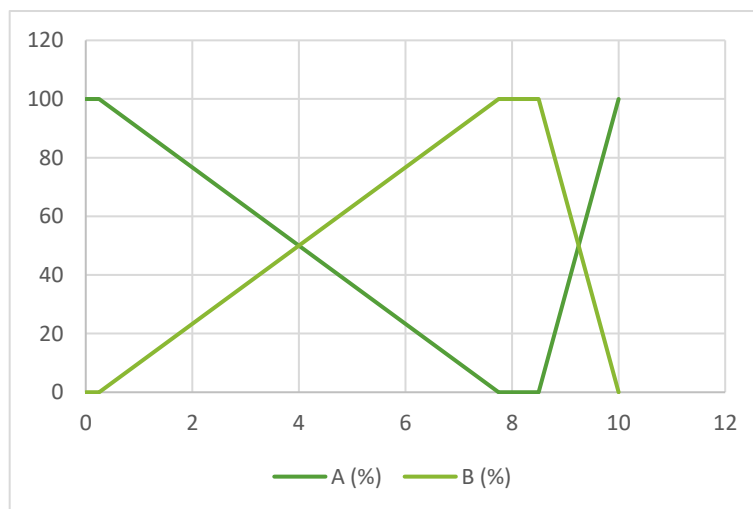
Annex IX

METABOLITES STUDY (2ND ANIMAL TRIAL)

Chromatographic System

- Column ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μ m; 2.1 x 100 mm)
- Volume de Injection: 2 μ L
- Mobil Phase:
 - Solution A: Acid Formic 0.1% + Acetonitrile 10 %
 - Solution B: Acetonitrile
- Flow: 0.45 mL/min

T(min)	A (%)	B (%)
0	100	0
0,25	100	0
7,75	0	100
8,5	0	100
10	100	0



SARMS CONCENTRATIONS

Steer N° 443-Casodex 100 mg					
	Bicalutamide Free	Bicalutamide Total	Bicalutamide Free	Bicalutamide Total	Bicalutamide
Day	Urine (ng/mL)	Urine (ng/mL)	Faeces (ng/g)	Faeces (ng/g)	Serum (ng/mL)
-1	ND	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND	ND
0.17	1.30	1.50	8.38	26.52	259.18
0.33	10.66	8.27	327.74	376.06	392.20
1	12.67	14.76	1830.85	2050.67	384.64
2	8.06	11.47	671.80	1387.17	340.22
3	6.32	8.93	248.89	471.09	330.94
4	3.36	2.47	132.17	131.07	262.67
5	1.83	1.90	52.22	61.26	231.77
7	0.67	1.65	28.61	27.30	232.63
9	0.70	0.87	3.04	8.84	116.66
11	0.81	0.68	2.25	2.60	71.12

Steer N° 421-Casodex 200 mg					
	Bicalutamide Free	Bicalutamide Total	Bicalutamide Free	Bicalutamide Total	Bicalutamide
Day	Urine (ng/mL)	Urine (ng/mL)	Faeces (ng/g)	Faeces (ng/g)	Serum (ng/mL)
-1	ND	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND	ND
0.17	2.52	2.54	9.48	22.68	284.95
0.33	4.80	5.85	2236.76	2394.51	762.94
1	17.74	24.48	1917.96	2244.41	757.13
2	9.79	16.49	466.39	528.35	748.95
3	7.05	7.66	232.63	299.16	623.15
4	5.77	8.59	181.44	224.11	455.21
5	2.38	3.94	129.09	160.48	442.18
7	1.35	2.16	61.44	59.45	325.53
9	0.64	1.01	43.75	37.10	189.87
11	0.63	0.72	11.07	11.48	126.68

Porcine N° 330-Andarine 100 mg					
	Andarine Free	Andarine Total	Andarine Free	Andarine Total	Andarine
Day	Urine (ng/mL)	Urine (ng/mL)	Faeces (ng/g)	Faeces (ng/g)	Serum (ng/mL)
-1	ND	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND	ND
0.17	17.26	21.51	563.65	602.26	47.81
0.33	43.36	46.81	1598.24	1612.92	39.27
1	18.35	21.47	1512.96	1595.68	15.39
2	3.86	5.91	189.14	228.15	3.61
3	ND	ND	ND	4.60	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND	ND	ND

Steer N° 379-Casodex 50 mg during 5 days					
	Bicalutamide Free	Bicalutamide Total	Bicalutamide Free	Bicalutamide Total	Bicalutamide
Day	Urine (ng/mL)	Urine (ng/mL)	Faeces (ng/g)	Faeces (ng/g)	Serum (ng/mL)
-1	ND	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND	ND
0.17	1.13	0.82	14.98	13.67	143.48
0.33	2.13	1.31	856.68	947.68	327.42
1	10.59	12.05	770.52	1177.22	335.17
2	9.61	12.85	1142.03	1459.46	582.29
3	17.87	15.02	1703.29	1992.08	723.10
4	20.29	25.81	2362.77	2880.20	898.79
5	23.48	28.13	1820.46	1877.54	1081.86
7	16.43	13.04	1040.22	901.32	871.36
9	13.03	17.41	507.59	838.75	804.78
11	5.34	4.92	187.09	267.62	683.23

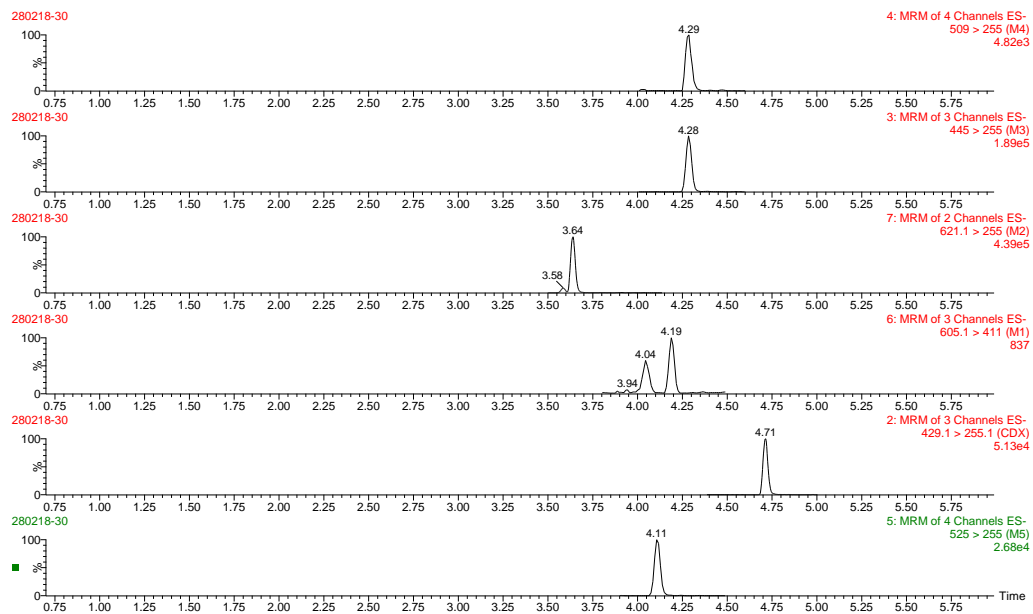
Porcine N° 334 - Casodex 100 mg					
	Bicalutamide Free	Bicalutamide Total	Bicalutamide Free	Bicalutamide Total	Bicalutamide
Days	Urine (ng/mL)	Urine (ng/mL)	Faeces (ng/g)	Faeces (ng/g)	Serum (ng/mL)
-1	ND	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND	ND
0.17	40.04	37.52	13.91	14.06	448.16
0.33	77.17	84.24	115.33	174.92	691.99
1	86.16	82.57	1035.64	1387.37	873.21
2	69.09	78.29	409.10	533.86	812.59
3	64.84	67.87	329.85	320.95	806.49
4	22.80	34.25	313.34	342.09	724.56
5	16.64	27.34	137.07	144.66	583.04
6	10.45	11.84	111.10	123.32	344.19
8	7.54	6.21	49.51	57.99	282.05
10	2.73	3.16	29.85	35.57	81.34

METABOLITES DE BICALUTAMIDE

This study was performed using a triple quadrupole mass detector XEVO TQ-D (Waters, Milford, MA, USA).

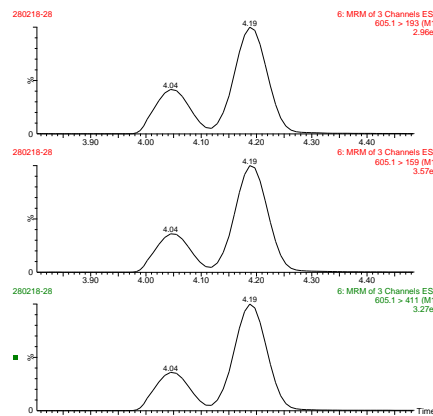
Bovines

The following chromatograms were obtained during the 2nd animal trial and are presented as an example. It shows the first metabolite is M2 follows by M3, M4, M5 and M1.

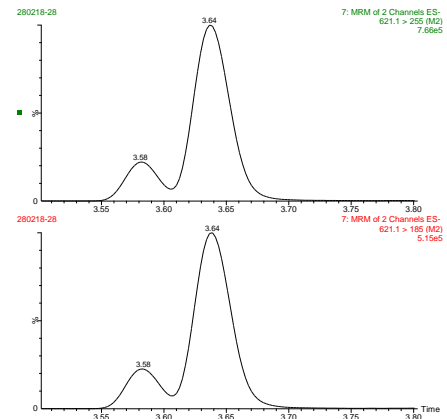


The following figures present the SRM used for the confirmation of each metabolites found:

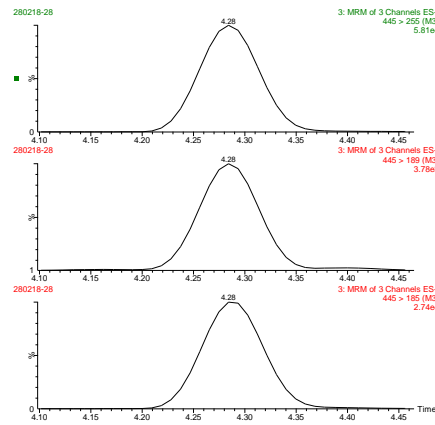
M1:



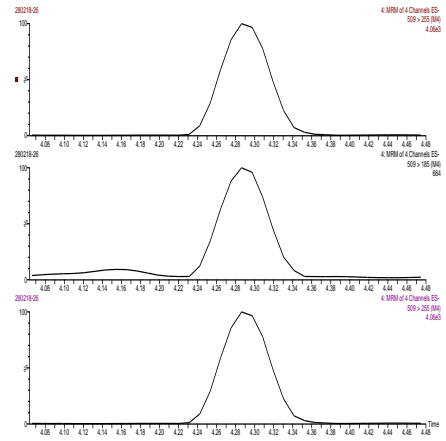
M2:



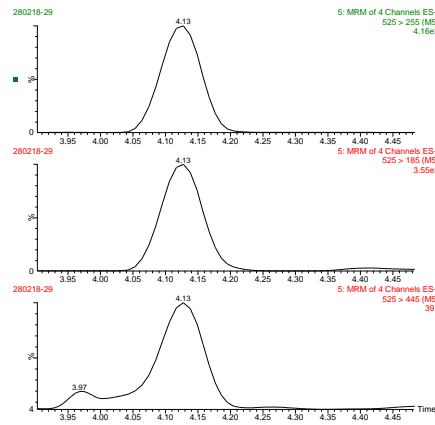
M3:



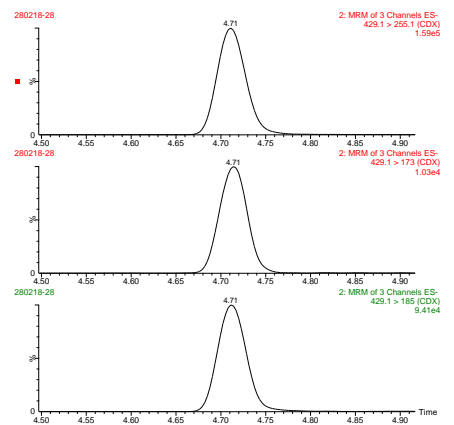
M4:



M5:

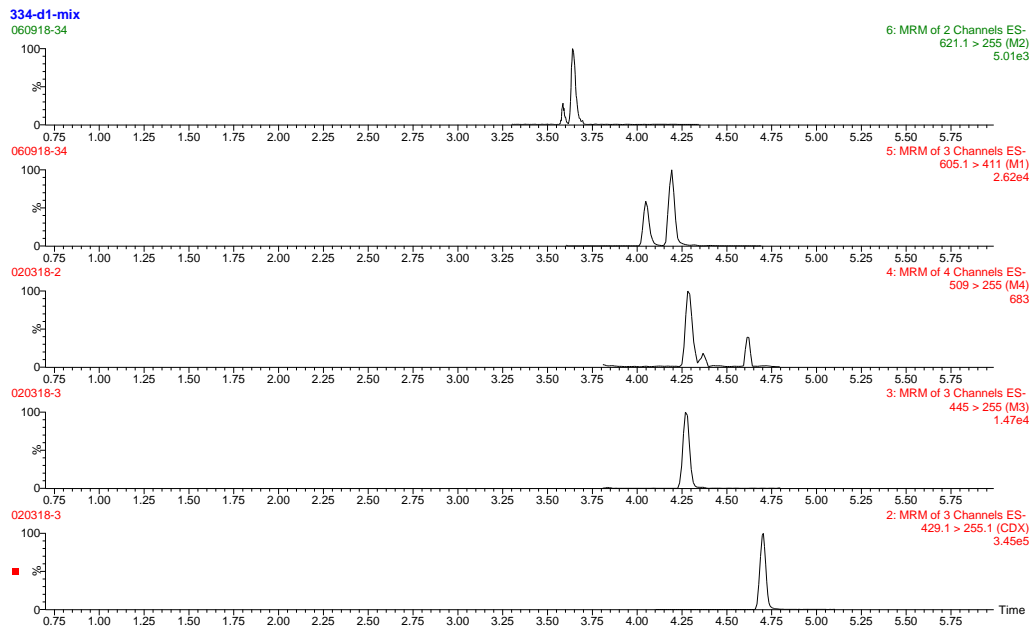


Bicalutamide



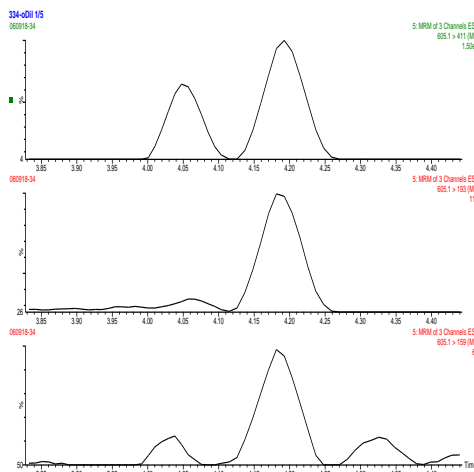
Porcine

The following chromatogram presents the metabolites found at the porcine treated with Casodex[®]. It shows the metabolites found M1, M2, M3 y M4.

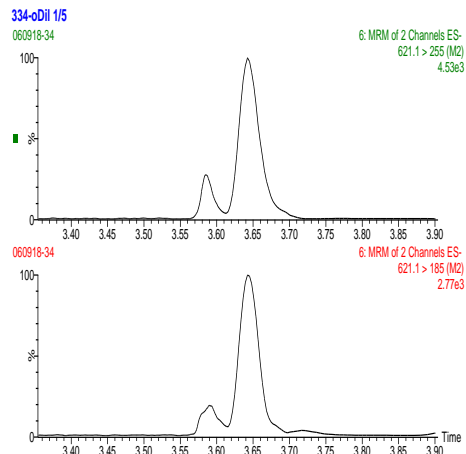


The following figures present the SRM used for the confirmation of each metabolites found:

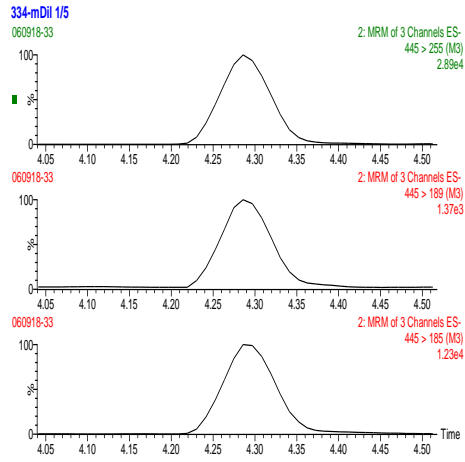
M1:



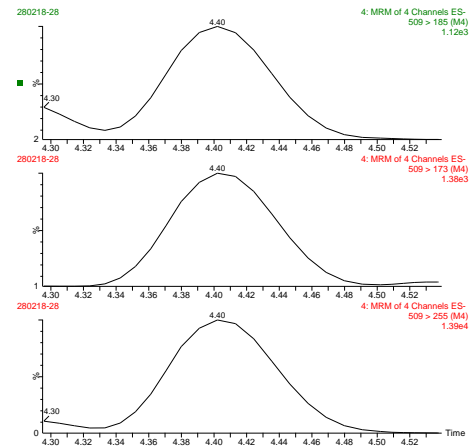
M2:



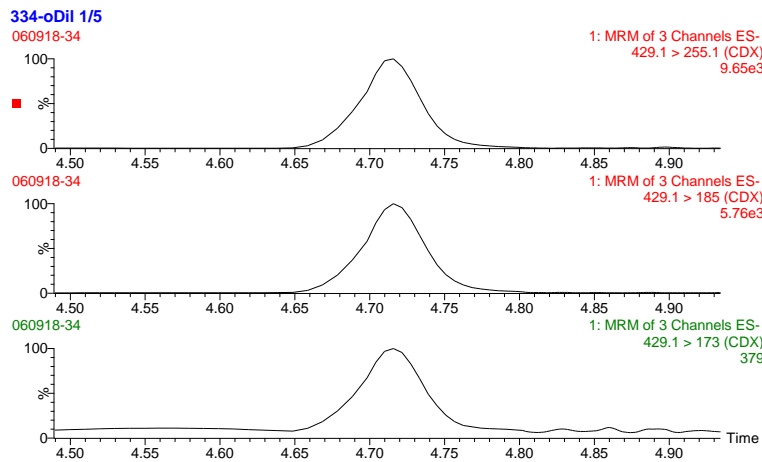
M3:



M4:

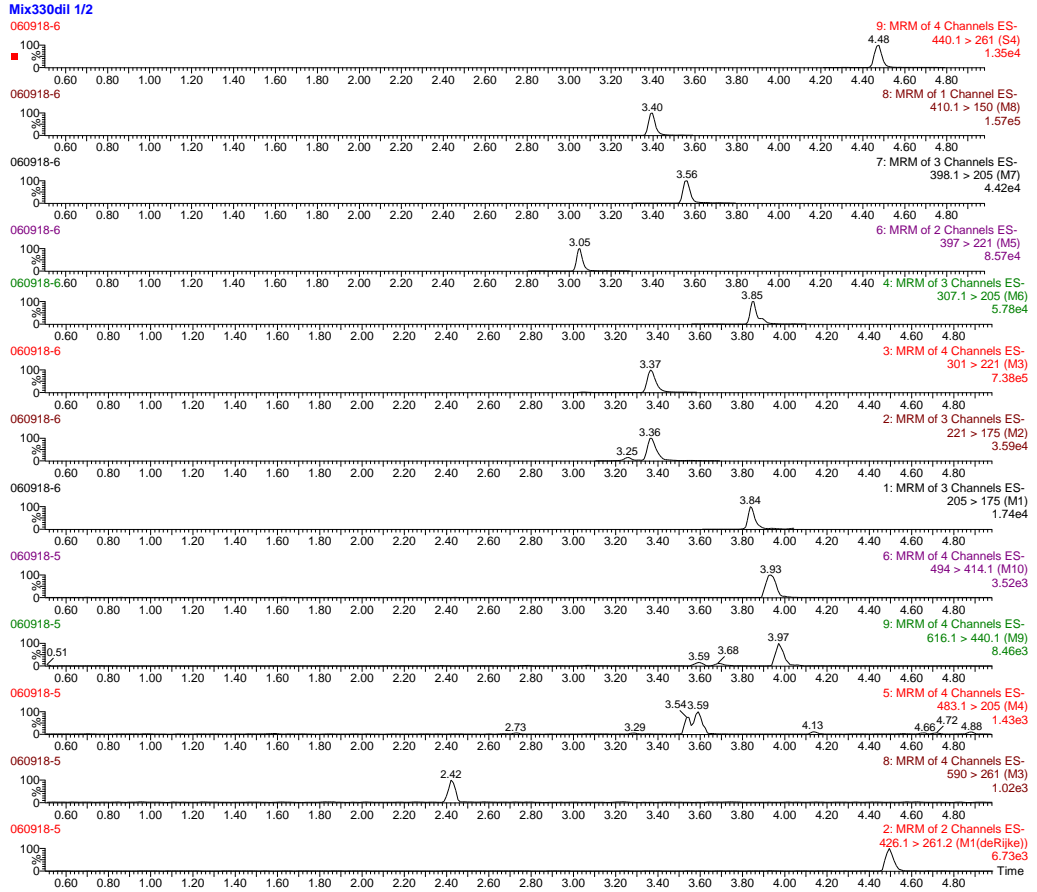


Bicalutamide

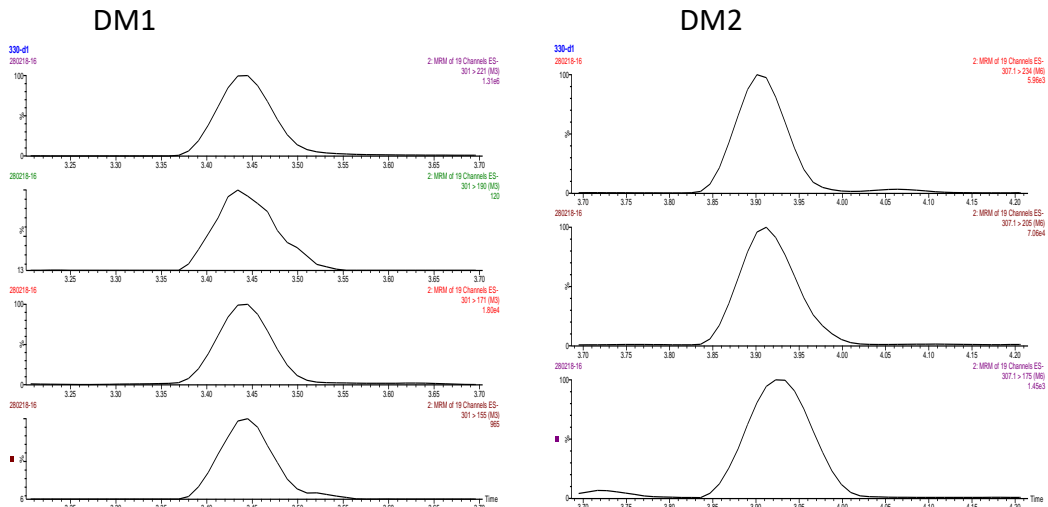


PORCINE METABOLITES OF ANDARINE

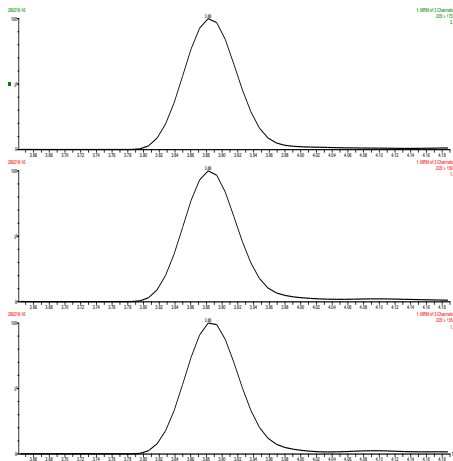
The following chromatogram presents the metabolites found at the porcine treated with Andarine. It shows the 12 metabolites found.



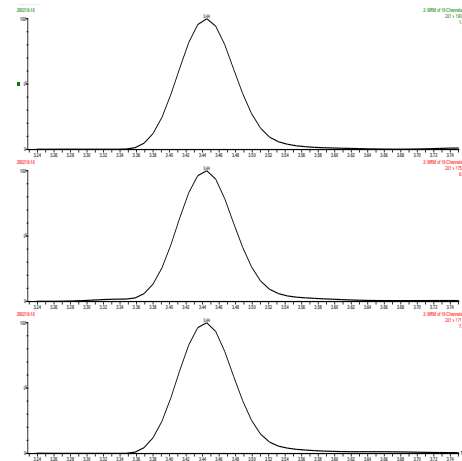
The following figures present the SRM used for the confirmation of each metabolites found:



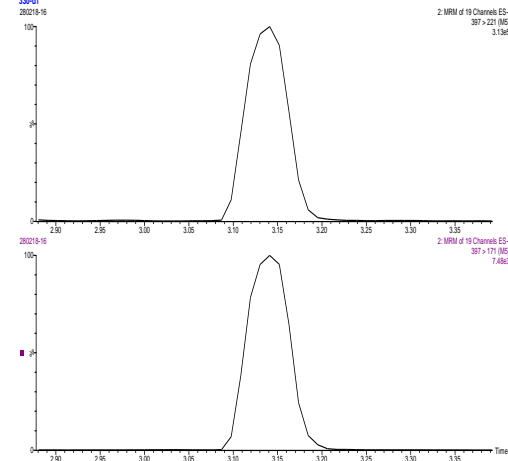
DM3



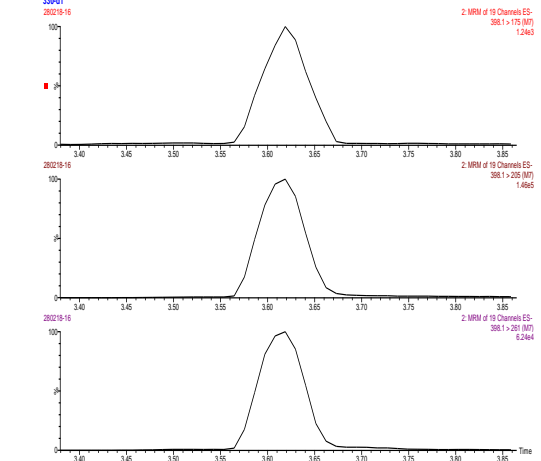
DM4



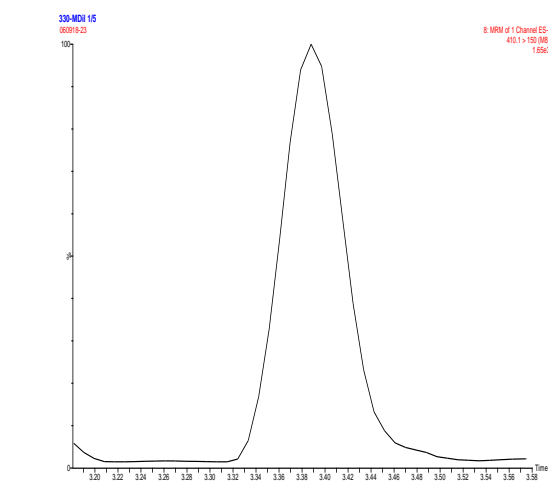
DM5



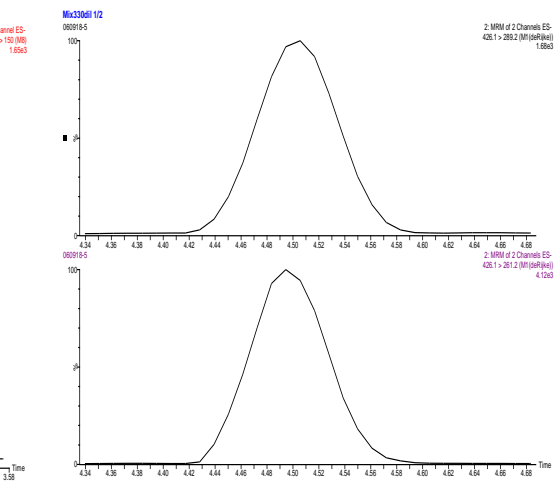
DM6

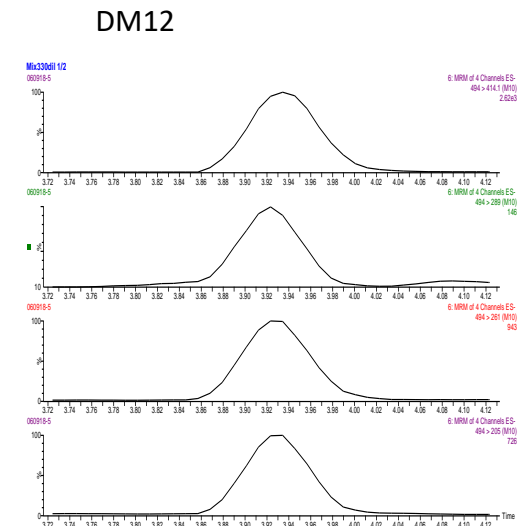
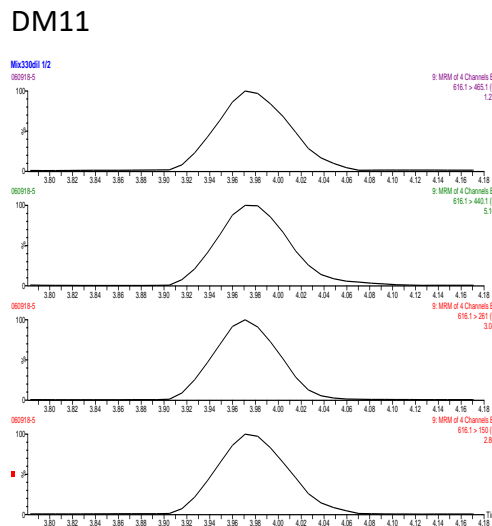
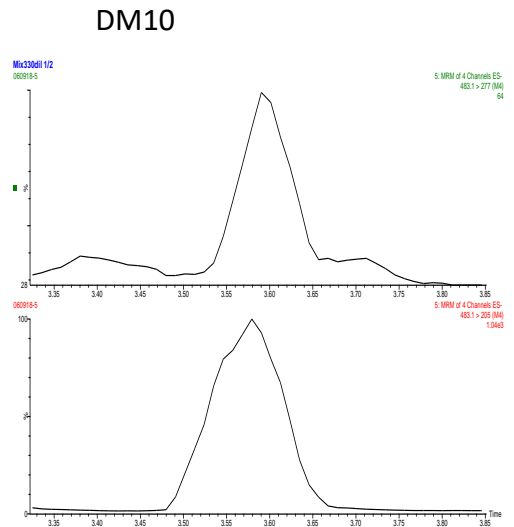
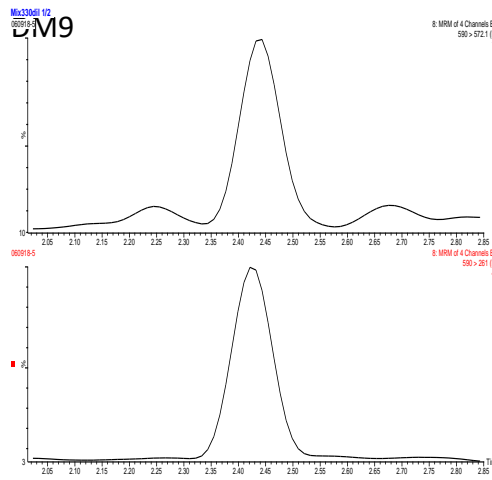


DM7

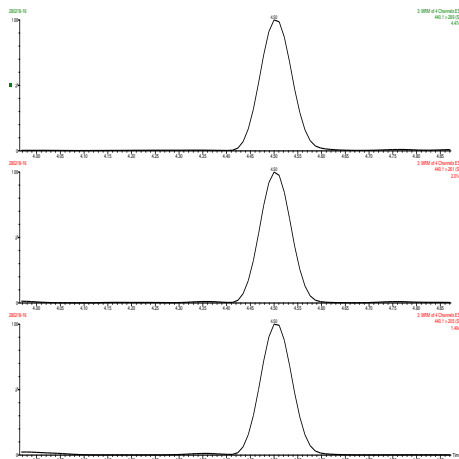


DM8





Andarine



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Veterinarias

Tesis

ESTUDIO DEL METABOLISMO DE SARM
EN PRÁCTICAS GANADERAS PARA EL
CONTROL DE RESIDUOS

Autor: Dante Emanuel ROJAS

Directora: Dr. Andrea CALZETTA RESIO

Directora: Dr. Gaud DERVILLY-PINEL

Año: 2019

Lugar de realización:

- Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) - Oniris, LUNAM Université (Nantes-Francia).
- Laboratorio de Contaminantes Químicos – Instituto Tecnología de los Alimentos – INTA (Buenos Aires – Argentina).
- Estación Experimental Agropecuaria Anguil – INTA (La Pampa – Argentina).
- Estación Experimental Agropecuaria Concordia – INTA (Entre Ríos – Argentina).

Dedicatoria

A Vivi, a mi madre y a mi padre por su amor, compañía y aliento...

Agradecimientos

A mi familia y a mis compañeros de trabajo (de INTA, de la Facultad de Ciencias Veterinaria de la UBA y de LabERCA).

Agradecimientos especiales por su ayuda a Andrea Calzetta, Gaud Dervilly, Ariel Miranda, Mariana Galicio, Maria Juana Ruiz, Alba Castro, Susana Rojas, Diego Cristos, Diego Fernandez, Gaston Pelissier, Martin Paladino, Alexis Sosa, Alexander Sydor, Zied Kaabia, Gerome Laparre, Tao Peng, Berenger Marais, Kristine Hennig, Margarida Cardoso, Natalia Pesquero, Gabriela Denoya, Juan Manuel Rojas, Geronimo Ortigosa, Fernanda Martinez, Juan Carlos Fernandez, Claudia Gonzalez y Sergio Vaudagna.

Índice General

Dedicatoria	3
Índice General	5
Índice de figuras	9
Índice de tablas.....	12
Abreviaturas	14
Resumen	16
Abstract	20
Hipótesis y objetivos	24
Hipótesis	24
Objetivos Generales.....	24
Objetivos Específicos	24
Introducción	25
Anabolizantes en producción animal	26
Sustancias con actividad hormonal.....	27
β -Agonistas.....	28
Hormona de crecimiento (GH).....	29
Andrógenos y sus receptores	29
Receptores de Andrógenos.....	32
Moduladores Selectivos de Receptores de Andrógenos (SARMs)	36
Seguridad Química de los Alimentos	40
Legislación Argentina	42
Legislación de la Unión Europea	44
Otros países.....	45
Control de Residuos en Producción Animal	46
Norma ISO/IEC 17025: 2005	47
Cromatografía	48
Espectrometría de Masas	50
Fuentes de ionización	51
Analizadores de masas.....	54
Materiales y Métodos	56

Desarrollo de un método para el control del uso de SARM	57
Soluciones y Reactivos	64
Instrumentación 1°Ensayo con animales (LabERCA, ONIRIS)	64
Preparación de las muestras.....	65
Evaluación del método.....	65
Estudio de metabolitos de Bicalutamida y Andarina con propósito de control en prácticas de producción animal.....	67
Primer Ensayo animal	67
Segundo Ensayo animal (INTA – Anguil)	69
Resultados y discusión.....	78
Desarrollo de un método para el control del uso de SARMS	78
Orinas	78
Heces.....	80
Evaluación de la performance del método.....	82
Conclusiones Parciales:	85
Estudio de metabolitos de Bicalutamida y Andarina	86
Primer ensayo con animales (Bicalutamida).....	86
Cuantificación de Bicalutamida en orina y heces	86
Conclusiones parciales:	100
Segundo ensayo con animales	102
Estudio de concentraciones de Bicalutamida y Andarina.....	105
Metabolitos de Bicalutamida	114
Conclusiones parciales:	138
Evaluación de Metabolitos Candidatos para el control de prácticas ganaderas	140
Conclusiones Parciales	143
Conclusiones Generales	144
Bibliografía.....	146
Anexo I.....	156
Método Cromatográfico	156
Cromatografía	157
Anexo II.....	163
Extracción en fase sólida (SPE)	163

Consideraciones para el procesamiento de Heces.....	165
Esquema de liofilización de heces	165
Anexo III.....	168
Estudios de Hidrólisis (química y enzimática) y estabilidad de Bicalutamida	168
Hidrólisis Enzimática	168
Hidrólisis Química	170
Anexo IV.....	172
Evaluación del método	172
Ensayos con Orina	172
Ensayos con Heces	174
Anexo V.....	179
Primer ensayo con animales.....	179
Perfiles de eliminación	179
Anexo VI.....	181
Primer Ensayo Animal: Análisis de Metabolitos	181
Sistema cromatográfico	181
Fragmentos característicos de Bicalutamida	182
Anexo VII.....	184
Ajuste de la energía de cono	184
Bicalutamida.....	184
Andarina	187
Hidroxi flutamida	190
Anexo VIII.....	194
Evaluación del método	194
Curvas de Calibración.....	194
Linealidad	197
Exactitud.....	197
Precisión	199
Anexo IX.....	204
Fragmentos característicos de Andarina	204
Anexo X.....	206

Estudio de Metabolitos (2do ensayo con animales)	206
Concentraciones de SARMS	207
Metabolitos de Bicalutamida.....	209
Bovinos.....	209
Porcino	211
Metabolitos de Andarina en porcino.....	213
Anexo XI.....	217
Cálculo de parámetros séricos.....	217
Perfil de eliminación de metabolitos.....	219
Bicalutamida.....	219
Andarina	224
Anexo XII.....	226
Publicaciones	226

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de los andrógenos esteroideos endógenos: Testosterona y Dihidrotestosterona.....	30
Figura 2. Células intersticiales de Leydig	31
Figura 3. Efectos destacados de los andrógenos usados en producción animal. .	32
Figura 4. Estructura de Receptor Andrógeno humano.....	33
Figura 5. Mecanismo de acción del receptor de andrógeno	35
Figura 6. Efectos de la <i>Testosterona</i> en los tejidos.	35
Figura 7. Estructura química de Bicalutamida; Andarina; Ostarina; Hidroxiflutamida.	39
Figura 8. Esquema de cromatógrafo.....	49
Figura 9. Esquema de cromatograma.....	49
Figura 10. Esquema simplificado de un espectrómetro de masas.....	50
Figura 11. Representación de un espectro de masas.	52
Figura 12. Ternero utilizado para el estudio de eliminación de Bicalutamida.	68
Figura 13. Novillos tratados con dosis de Casodex [®]	70
Figura 14. Método desarrollado para orinas.	79
Figura 15. Método desarrollado para heces.....	81
Figura 16. Cromatogramas SRM para cuantificación de SARMS.	84
Figura 17. Perfil de excreción de Bicalutamida en heces y orina	87
Figura 18. Cromatograma compuesto construido por los TICs para Bicalutamida (1° Ensayo).....	90
Figura 19. Estructura de propuesta para los metabolitos M1.....	91
Figura 20. Estructura de propuesta para los metabolitos M2.....	92
Figura 21. Estructura de propuesta para M3.....	93
Figura 22. Estructura de propuesta para M4.....	93
Figura 23. Estructura química propuesta para M5	94
Figura 24. Perfiles de excreción urinaria y fecal de metabolitos de Bicalutamida.	96

Figura 25. Cromatogramas SIM: de solución estándar, muestras blanco y muestras fortificadas.	104
Figura 26. Concentraciones de Bicalutamida en orina.	106
Figura 27. Concentraciones de Bicalutamida en heces.	107
Figura 28. Concentraciones Séricas de Bicalutamida.	108
Figura 29. Concentraciones de Andarina en orina, heces y suero porcino.	110
Figura 30. Relación dosis de Casodex [®] y Bicalutamida en Orina (24 h.).	112
Figura 31. Relación dosis de Casodex [®] y Bicalutamida en heces (24 h.).....	112
Figura 32. Relación dosis de Casodex [®] y Bicalutamida en suero (24 h.).....	112
Figura 33. Cromatograma compuesto de bovino con dosis de 200 mg Casodex.	115
Figura 34. Cromatograma compuesto de muestras de orina y heces porcino tratado con Casodex [®]	117
Figura 35. Cromatograma compuesto correspondiente a muestras de orina y heces del porcino tratado con Andarina.....	119
Figura 36. Estructura química de Andarina	120
Figura 37. Estructura química propuesta para el metabolito DM1.....	120
Figura 38. Estructura química propuesta para el metabolito DM2.....	121
Figura 39. Estructura química propuesta para el metabolito DM3.....	121
Figura 40. Estructura química propuesta para el metabolito DM5.....	122
Figura 41. Estructura química propuesta para el metabolito DM6.....	123
Figura 42. Estructura química propuesta para el metabolito DM7.....	123
Figura 43. Estructura química propuesta para el metabolito DM8.....	124
Figura 44. Estructura química propuesta para el metabolito DM9.....	124
Figura 45. Estructura química propuesta para el metabolito DM10.....	125
Figura 46. Estructura química propuesta para el metabolito DM11.....	126
Figura 47. Estructura química propuesta para el metabolito DM12.....	126
Figura 48. Perfiles de excreción de metabolitos de Bicalutamida.	128
Figura 49. Perfiles de excreción de metabolitos de Andarina.....	135

Figura 50. Abundancias relativas de los metabolitos bovinos de Bicalutamida obtenidos en excretas.....141

Figura 51. Abundancia relativa de los metabolitos porcinos de Bicalutamida obtenidos en excretas.....142

Figura 52. Abundancia relativa de los metabolitos porcinos de Andarina en excretas.....142

Índice de tablas

Tabla 1. Familias de SARMs no esteroideos	38
Tabla 2. Moléculas consideradas para el desarrollo de los métodos de análisis.....	58
Tabla 3. Métodos considerados para el análisis de SARMs derivados de APA en orina.	59
Tabla 4. Protocolos considerados para el análisis de SARMs derivados de APA en heces.	60
Tabla 5. Protocolos considerados para el análisis de SARMs derivados de APA en sangre.....	61
Tabla 6. Condiciones cromatográficas utilizadas en otros estudios de SARMs derivados de APA.	62
Tabla 7. Parámetros de detectores de espectrometría de masas utilizados en estudios.....	63
Tabla 8. Tolerancias máximas permitidas para las abundancias relativas de iones.....	67
Tabla 9. Administración de dosis orales realizadas en bovinos y porcinos.	70
Tabla 10. Detalles de la preparación de las dosis	71
Tabla 11. Esquema del muestreo realizado.	71
Tabla 12. Parámetros de Masa empleados para la determinación de analitos.	74
Tabla 13. Parámetros usados para identificación y cuantificación de SARMs.	82
Tabla 14. Parámetros obtenidos para la evaluación del método.	83
Tabla 15. Metabolitos de Bicalutamida encontrados en el bovino tratado con Casodex [®]	89
Tabla 16. Transiciones empleadas para la construcción de los perfiles de excreción en orina y heces.....	95
Tabla 17. Parámetros analíticos calculados para evaluar la confiabilidad del método aplicado.	103

Tabla18. Parámetros de espectrometría de masas usados para identificación y cuantificación de SARMs (2° ensayo).....	105
Tabla 19. Metabolitos de Bicalutamida encontrados en los bovinos tratados con Casodex [®]	115
Tabla 20. Metabolitos de Bicalutamida encontrados en el porcino tratado con Casodex [®]	117
Tabla 21. Metabolitos de Andarina encontrados en porcino.	118
Tabla 22. Transiciones MRM de los metabolitos de Andarina.....	127

Abreviaturas

SARMs: Selective Androgenic Receptor Modulator

APA: Arilpropionamidas

AES: Anabólicos Esteroides Androgénicos

GH: Growth Hormone

IGF-1: Insulin Growth Factor-1

AR: Androgen Receptors

ACh: acetic acid

ACN: acetonitrile

ADR: Adverse Drug Reaction

APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization

API: Atmospheric Pressure Ionization

APPI: Atmospheric Pressure Photoionization

CYP: Cytochrome P450 Enzyme

DMSO: Dimetil Sulfoxide

ECVAM: European Centre for the Validation of Alternative Methods

EMS: Enhanced Full Mass Scan

EPI: Enhanced Product Ion Scan

ER: Enhanced Resolution Scan

ESI: Electrospray Ionization

FA: formic acid

TBME: Metil t-butil éter

FWHM: Full Width at Half Maximum

GC: gas chromatography

GSH: Glutathione (forma reducida)

GST: Glutathione S-transferase

HLH: Human Liver Homogenate

HLM: Human Liver Microsomes

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

HRMS: High-Resolution Mass Spectrometry

IADR: Idiosyncratic Adverse Drug Reaction

IDA: Information Dependent Acquisition

IT: Ion Trap

KCN: Potassium Cyanide

LC: Liquid Chromatography

LLE: Liquid-Liquid Extraction

MDF: Mass Defect Filter

MeOH: methanol

MRM: Multiple Reaction Monitoring

MS: Mass Spectrometry

MS/MS: Tandem Mass Spectrometry

m/z: mass-to-charge ratio

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (forma reducida)

SRM: Single Reaction Monitoring

STD: estándar

ISTD: estándar interno

SPE: extracción en fase sólida

AA: acetato de amonio

AF: ácido fórmico

AcH: ácido acético

FA: formiato de amonio.

Resumen

Actualmente, la industria química produce sustancias que son empleadas en la producción ganadera para el cuidado de la salud animal o para mejorar aspectos zootécnicos que aumentan el rendimiento de producción. Sin embargo, el mal uso de estas sustancias puede generar residuos que podrían permanecer en los alimentos derivados de animales tratados. Finalmente, estos residuos químicos podrían ser ingeridos por el consumidor humano y eventualmente causar algún efecto negativo en su salud.

Debido a la toxicidad o el riesgo de estos residuos en alimentos las drogas veterinarias se encuentren reguladas mediante normativas de aplicación voluntarias o legislaciones de cumplimiento obligatorio. Estas regulaciones pueden cambiar según los criterios considerados por cada país y en consecuencia el comercio internacional de alimentos puede verse afectado por esta diferencia en las tolerancias a los residuos entre los países.

Los *promotores de crecimiento* son sustancias que ingeridas, inyectadas o implantadas en animales mejoran el rendimiento de la producción. Existe un gran número de sustancias que aumentan la ganancia de peso, la eficiencia de la alimentación y el porcentaje proteico en la canal. El mecanismo de acción de estas sustancias para ganar peso puede ir desde medicamentos que eliminan parásitos favoreciendo la correcta asimilación de los nutrientes ingeridos hasta productos químicos con mecanismo de acción a nivel celular del músculo esquelético que estimulan la síntesis proteica. En ganadería, los promotores de crecimiento tradicionalmente usados son los *Anabólicos Esteroides Androgénicos*, los *β 2-agonistas* y la *hormona de crecimiento* (Growth Hormone, GH). Otras sustancias anabolizantes usadas son el *Zeranol*, los *antimicrobianos anabolizantes*, los *estilbenos* y los *tirostáticos*. Entre las prácticas anabolizantes emergentes podríamos mencionar a los secretagogos de GH, los análogos de IGF-1 (Insulin Growth Factor-1) y los Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs).

Los Moduladores Selectivos de Receptores de Andrógenos son una nueva familia de sustancias no esteroideas, que tiene la capacidad de unión a receptores de andrógenos (AR). Idealmente presentan selectividad en su efecto dependiendo del tejido, separando el efecto anabolizante del androgénico, tienen baja toxicidad (hepática, cardiovascular, etc.) y poseen propiedades farmacológicas favorables como alta absorción digestiva facilitando la administración oral y muestran un largo tiempo vida media. Por estas razones, ya se comercializan en internet y se han detectados casos en el deporte (animal y humano). Con estos antecedentes es de esperar que los SARMs recorran el mismo camino que otros anabolizantes hasta llegar a la producción animal.

Bicalutamida, bloquea los AR y es usado como anti-andrógeno, pero en el hombre produce el aumento de los niveles hormonales de testosterona, estradiol, hormona luteinizante y en menor medida la hormona folículo estimulante. En cambio, Andarina tiene una actividad anabolizante probada en animales de laboratorio y ha sido detectada en casos deportivos recientes.

En Argentina desde el año 1961, las sustancias con efecto anabolizante se encuentran reguladas y con el correr del tiempo aumentaron las restricciones. Estableciendo la importancia de asegurar la calidad de los alimentos y fortalecer el comercio internacional.

En Europa, como comunidad económica, desde 1981 comenzó el control y la restricción para el empleo de agentes anabolizantes en ganadería. En la actualidad el empleo de *promotores de crecimiento* se encuentra prohibido en animales productores de alimentos.

El estudio del metabolismo de estas sustancias químicas es fundamental cuando se quiere realizar el control en prácticas ganaderas. Esto se debe a que luego de su administración, una sustancia sufre reacciones metabólicas dentro del organismo. En consecuencia, la concentración de la droga administrada disminuye a expensas del aumento de los productos (*metabolitos*) de estas reacciones metabólicas. En consecuencia, algunos metabolitos podrían permanecer como indicadores del uso de la sustancia en concentraciones mayores y por períodos de tiempos más prolongados que la droga administrada.

El presente trabajo plantea como objetivo general aportar herramientas para el control de los SARMs en producción ganadera, desarrollando métodos analíticos y generando información acerca de su metabolismo en animales productores de alimentos. En el estudio se trabajó con cromatografía líquida acoplada a detectores de masas, que facilitan el análisis y aportan datos estructurales de las sustancias desconocidas.

Se estudiaron trabajó con Enobosarm, Andarina, Bicalutamida y Hidroxyflutamida en diferentes etapas a causa de la accesibilidad para conseguir cada una de ellas.

Los métodos analíticos desarrollados para los SARMs fueron evaluados para satisfacer criterios normativos argentinos y europeos. Se logró un método para Enobosarm, Andarina, Bicalutamida y Hidroxyflutamida en orina y heces, mientras que para suero se desarrolló un método para Bicalutamida y Andarina.

Se realizaron dos ensayos con animales para conocer aspectos metabólicos de estas sustancias. El primero con administración de Bicalutamida a un bovino (raza *Montbeliard*), tomando orina y heces. En el segundo ensayo se empleó bovinos (raza *Angus*) y porcino (raza *Chetapuy*), se trabajó de la siguiente manera: 6 bovinos en 2 grupos de 3 animales: tratados con Bicalutamida y control (sin tratamiento); 3 porcinos en tres grupos: tratado con Bicalutamida, tratado con Andarina y control (sin tratamiento). Luego de la administración se recolectó orina, heces y sangre, por ser muestras de fácil acceso para el trabajo rutinario. Se establecieron los perfiles de eliminación y las curvas de niveles séricos correspondientes.

Se observó que Bicalutamida tiene una rápida absorción y una lenta eliminación, con concentraciones detectables en excretas durante más de una semana (9 – 11 días). En cambio, Andarina mostró una rápida eliminación (48 h.) junto a una rápida absorción.

En las excretas de los animales se encontraron metabolitos de provenientes de *fase I* y *fase II*. Los resultados mostraron 5 metabolitos en bovinos tratados con Bicalutamida y solo 4 en porcinos tratados con la misma sustancia. En cambio, el porcino tratado con Andarina presentó 12 metabolitos.

Basados en la información aportada por la espectrometría de masas se pudo proponer la estructura química de 16 metabolitos encontrados quedando solo un metabolito de Andarina sin estructura.

Luego de analizar los resultados en bovinos tratados con una única dosis de Bicalutamida se puede concluir que la materia fecal liofilizada es la mejor matriz para control. Los marcadores que mostraron las mayores señales fueron M3 seguido de Bicalutamida y en orina el mejor marcador fue M2 seguido por M5. A pesar de la gran señal obtenida para estos metabolitos, Bicalutamida (sin modificación) fue la sustancia que permaneció más tiempo detectable, 7 días en orina y 11 en materia fecal. Para el control de Bicalutamida en porcino con una única dosis se seleccionó Bicalutamida en ambas matrices intensidad y duración de señal. El control de Andarina en porcino plantea una dificultad que radica en el corto periodo que permanece detectables, la droga y sus metabolitos.

Este trabajo constituye el primer estudio científico realizado con administración oral de Bicalutamida en animales productores de alimentos. Es el primer trabajo realizado con Andarina en cerdos de raza *Chetapuy*. Además, es el primer trabajo en reportar 2 de los 5 metabolitos de Bicalutamida propuestos.

Abstract

At present, the chemical industry produces veterinary drugs that are used in livestock production for animal health care or to improve zootechnical aspects that increase production yield. However, the misuse of these substances may lead to residues that may remain in food derived from treated animals. Finally, these chemical residues could be ingested by the human consumer and it could eventually cause some negative effect on their health.

Depending on the toxicity of such residues in food, veterinary drugs are regulated by voluntary implementing regulations or mandatory legislation. These regulations may change according to the criteria considered by each country and consequently international food trade may be affected by these differences in tolerances for waste between countries.

Growth promoters are substances that are ingested, injected or implanted in animals that improve production performance. There are a large number of substances that increase weight gain, feed efficiency and protein percentage in the carcass. The mechanism of action of these substances to gain weight can go from medicines that eliminate parasites favoring the correct assimilation of the ingested nutrients to chemicals with mechanism of action at the cellular level of the skeletal muscle that stimulate protein synthesis.

In livestock, the growth promoters traditionally used are anabolic androgenic steroids, β -agonists and Growth hormone (GH). Other anabolic substances used include zeranol, anabolic antimicrobials, stylobens and thyrostatics substances.

Emerging anabolic practices include GH secretagogues, IGF-1 analogues (Insulin Growth Factor-1) and Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs).

Selective modulators of androgen receptors are a new family of non-steroids substances, which has the ability to bind to androgen receptors (AR). Ideally they have selectivity in their effect (anabolic or androgenic) depending on the tissue, they have low toxicity (hepatic, cardiovascular, etc.) and they possess favorable pharmacological properties such as high digestive absorption

facilitating oral administration and show a long average life. For these reasons, they have been already sold on the Internet and cases have been detected in sport (animal and human). With this background, it is to be hoped that the SARMs will follow the same path as other anabolic compounds until they reach animal production.

In Argentina since 1961, substances with anabolic effect have been regulated and restrictions have increased over time. Establishing the importance of ensuring food quality and strengthening international trade.

In Europe, as economic community, control and restriction for the use of anabolic agents in livestock farming began in 1981. The employment of growth promoters is currently prohibited in food producing animals.

The study of the metabolism of these chemicals is essential when controlling livestock practices. This is because after administration, a substance suffers metabolic reactions within the body. Thus, the concentration of the administered drug decreases at the expense of the increase of the products of these metabolic reactions (metabolites). Therefore, some metabolites could remain as indicators of the use of the substance in higher concentrations and for longer periods of time than the administered drug.

The general objective of this paper is to provide tools for the control of SARMs in livestock production, developing analytical methods and generating information about their metabolism in food producing animals. In the study liquid chromatography coupled to mass detectors was applied, which is a confirmation method and provide structural data for unknown substances.

Enobosarm, Andarine, Bicalutamide and Hidroxyflutamide were studied in different stages of this work because of the accessibility to get each of them.

The analytical methods developed for the SARMs were evaluated to fulfill Argentine and European normative criteria. A method was achieved for the control of Enobosarm, Andarine, Bicalutamide and Hidroxyflutamide in urine and faeces, while for serum a method was developed for Bicalutamide and Andarine.

Two animal trials were conducted to learn about metabolic aspects of these substances. The first with Bicalutamide administration to a bovine

(Montbeliard breed), taking urine and faeces. In the second test cattle (Angus breed) and pigs (Chetapuy breed) were used, worked as follows: 6 cattle in 2 groups of 3 animals: treated with Bicalutamide and control (untreated); 3 pigs in three groups: treated with Bicalutamide, treated with Andarine and control (no treatment). Urine, faeces and blood were collected after administration, as they were easily accessible for routine work. The urinary and fecal elimination profiles with the corresponding serum level curves were established.

Bicalutamide was found to have rapid absorption and slow elimination, with detectable concentrations in excreta for more than one week (9 – 11 days). In contrast, Andarine showed rapid elimination (48 h.) together with rapid absorption.

Phase I and Phase II metabolites were found in animal excreta. The results showed 5 metabolites in cattle treated with Bicalutamide but only 4 of them in the pig treated with the same substance. In contrast, the porcine treated with Andarine presented 12 metabolites. Based on the information provided by the mass spectrometry it was possible to propose the chemical structure of 16 metabolites found, leaving only one metabolite of Andarine without structure proposed.

After analysing the results in cattle treated with a single dose of Bicalutamide, it can be concluded that the lyophilized fecal matter is the best matrix for control. The markers in faeces that showed the highest signal were M3 followed by Bicalutamide (without modification). In urine the best marker was M2 followed by M5. Despite the large signal obtained for these metabolites, Bicalutamide (without modification) was the substance that remained most detectable, 7 days in urine and 11 days in faeces. For the control of Bicalutamide in pigs with a single dose, Bicalutamide was selected in both matrices based on intensity and signal duration. The control of Andarine and its metabolites in pigs poses a difficulty that lies in the short period that remains detectable.

This work is the first scientific study carried out with oral administration of Bicalutamide in food producing animals. It is the first work done with

Andarine in pigs of Chetapuy breed. In addition, it is the first work to report 2 of the 5 proposed Bicalutamide metabolites.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

- El estudio del metabolismo de los SARMs derivados de APA es necesario para el desarrollo de métodos analíticos de control de prácticas ganaderas.
- Se puede determinar SARMs derivados de APA y sus metabolitos utilizando muestras de fácil obtención (orina y heces) para controlar el uso en prácticas ganaderas.

Objetivos Generales

- Estudiar los niveles de SARMs derivados de APA en orina, heces y sangre, en animales de producción.
- Identificar analitos que puedan emplearse como residuos de SARMs derivados de APA en muestras biológicas de fácil obtención (Orina, Heces y Sangre).
- Desarrollar herramientas de química analítica para el monitoreo de residuos para implementar el control de SARMs derivados de APA en animales de producción.

Objetivos Específicos

- Desarrollar métodos de análisis para los SARMs derivados de APA en matrices biológicas basado en Cromatografía Líquida acoplada a detector de espectrometría de masas.
- Evaluar la performance de las metodologías desarrolladas con parámetros analíticos objetivos.
- Estudiar la variación de concentración de los SARMs derivados de APA en orina, heces y suero.
- Estudiar la variación de concentración de los metabolitos de los SARMs derivados de APA en orina y heces.

Introducción

La producción animal es una actividad que se ocupa de la cría de animales empleando y desarrollando distintas alternativas para alcanzar el mayor rendimiento, en cantidad y calidad en el menor tiempo posible. En la producción animal con destino de alimentos, se trabaja con razas precoces con capacidad de engorde rápido para alcanzar la mayor eficiencia.

La industria química desarrolla sustancias químicas para uso veterinario. Estas sustancias se emplean para proteger la salud de los animales y también con fines técnicos, de forma de mejorar la actividad ganadera. Sin embargo, el mal uso de estas sustancias puede dejar residuos que podrían permanecer en los alimentos derivados. Finalmente, estos residuos químicos podrían ser ingeridos por el consumidor final y eventualmente causar algún efecto negativo en su salud [1-4]. Los procedimientos de trabajo, denominados Buenas Prácticas de Manejo o Pecuarias detallan el control sanitario y la adecuada alimentación. Basados en estudios científicos, describen el uso racional y adecuado de sustancias químicas, utilizando dosis mínimas necesarias, indicando los tiempos de espera que permitan la disminución de los niveles de residuos en el animal antes de su empleo para alimentación humana (ordeño, sacrificio, etc.) [5-8].

Los *productos* químicos utilizados con fines *zootécnicos* son muchos y podemos encontrar *prebióticos, probióticos, hormonas, ionóforos, antimicrobianos, modificadores metabólicos, tirostáticos, etc.* [5, 9-11].

Los *promotores de crecimiento* son sustancias que ingeridas, inyectadas o implantadas en animales mejoran el rendimiento de la producción. Existe un gran número de sustancias que aumentan la ganancia de peso, la eficiencia de la alimentación y el porcentaje proteico en la canal [10]. El mecanismo de acción de estas sustancias para ganar peso va desde medicamentos que eliminan parásitos favoreciendo la correcta asimilación de los nutrientes ingeridos hasta productos químicos con mecanismo de acción más complejos, que actúan a nivel del músculo esquelético (celular) acelerando la síntesis proteica [3].

Los *agentes anabólicos* utilizados en la producción animal son sustancias con capacidad para favorecer procesos de síntesis (anabolismo). En este sentido, mejoran considerablemente el balance de nitrógeno con aumento de proteínas en el animal, acortando el período de producción y con una menor proporción de tejido graso [12].

En ganadería, las principales sustancias utilizadas son los *Anabólicos Esteroides Androgénicos* (AES), estrógenos, Acetato de *Trembolona*, Acetato de *Melengestrol* y corticoesteroides); los β_2 -agonistas (*Clembuterol*, *Ractopamina*, *Salbutamol*, etc.) y la hormona de crecimiento (Growth Hormone, GH).

Otras sustancias anabolizantes usadas son el *Zeranol*, los antimicrobianos anabolizantes, los estilbenos y los tirostáticos.

Entre las prácticas anabolizantes emergentes podemos encontrar a los secretagogos de GH, los análogos del IGF-1 (Insulin Growth Factor-1), y los Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs).

Anabolizantes en producción animal

En la producción animal, numerosas sustancias son utilizadas con propósito terapéutico (clínico) y otras, con el fin de aumentar los márgenes de ganancias económicas del productor. Estas últimas, idealmente, deberían producir una tasa de crecimiento mayor que el natural (sin la utilización del agente), aumentar la proporción de carne magra con disminución de tejidos grasos, mejorar características organolépticas (sabor, ternesa, *marbling*, etc.) en un corto plazo de tiempo y con el menor consumo de alimentos. Generalmente son administradas por vía oral (como aditivos en los piensos) o por vía parenteral (inyectadas o en forma de implantes).

En general, se emplean sustancias sintéticas que pueden recibir nombres como Promotores de Crecimiento o Modificadores Metabólicos, según el autor o implicancias legales consideradas. Estas sustancias pueden dividirse en 2 grandes grupos, el primero constituido por *Sustancias con Actividad Hormonal* (donde se incluyen hormonas y agentes con actividad similar a las hormonas). El segundo grupo tiene impacto beneficioso en la producción o la calidad del producto (por ejemplo, antimicrobianos, vitaminas, prebióticos, etc.), que

puede ir desde ganancia de peso hasta un aumento de la palatabilidad, la terneza, etc.

Aunque la bibliografía consultada describe un gran número de sustancias utilizadas, por sus propiedades anabolizantes con fines no terapéuticos, en este trabajo se propone una breve presentación de algunos de ellos, seleccionando aquellos relacionados con los objetivos del estudio.

Sustancias con actividad hormonal

En esta categoría, encontramos agentes con actividad similar a las hormonas naturales que logran aumentar la eficacia de conversión de piensos por modificación del metabolismo (por ejemplo, estimulando la síntesis proteica, incrementando los depósitos minerales en tejido óseo, etc.).

Las hormonas producidas por el hombre o los animales se llaman endógenas a diferencia de aquellos compuestos sintéticos (que reproducen el efecto hormonal) denominados hormonas xenobióticas o sintéticas. Ambos tipos de hormonas tienen capacidad de producir ganancia de peso en los animales y por este motivo, desde hace décadas, son usadas en las diferentes etapas del crecimiento animal (lactancia, recría, engorde y finalización).

En muchos países, es ampliamente utilizado el implante de *sustancias hormonales (depot capsule)*, en la cría de ganado productor de carne [3, 13]. Normalmente, se colocan detrás de las orejas en forma de cápsulas que van liberando las *sustancias hormonales* lentamente. Las sustancias hormonales más empleadas son seis, tres hormonas endógenas (*17-β-Estradiol*, *Testosterona* y *Progesterona*) y tres hormonas xenobióticas (*Melengestrol*, *Trembolona* y *Zeranol*).

Estradiol es sintetizado en ovario, glándulas adrenales y en testículos. Ha sido usado en producción aviar para castrar aves jóvenes y en acuicultura, pero ya no son prácticas comerciales actuales [13]. Actuaría mediante la estimulación del apetito con aumento de eficiencia de conversión y aumento del peso de la canal. Sin embargo, algunos parámetros de calidad se reportan afectados (disminución de terneza y jugosidad con flavor intenso) [14].

Testosterona tiene acción andrógena (por ejemplo, responsable de masculinización); *17-β-Estradiol* es estrogénica (principalmente producida en ovario y responsable del desarrollo de características sexuales de la hembra, entre otras funciones) y *Progesterona*, tiene acción gestacional (por ejemplo, manteniendo la preñez). La *Trembolona* imita los efectos de la *Testosterona*, *Melengestrol* tiene efectos similares a la *Progesterona* mientras que *Zeranol* tiene acción estrógena [13, 14].

Acetato de Melengestrol (*Melengestrol acetate*, MGA) es un esteroide con gran afinidad por el receptor de *Progesterona*. También presenta activación de receptores de estrógenos y aumento de la secreción de prolactina.

Acetato de Trembolona (*Trenbolone Acetate*, TBA) es un esteroide inyectable cinco veces más activo que la *Testosterona* en cuanto a la tasa de ganancia de peso del animal. Su forma activa es *17-β-Trembolona* (un metabolito de la *Trembolona*). Es capaz de activar receptores de *Progesterona* [13, 14].

Zeranol es un derivado de la micotoxina natural con actividad estrogénica Zearalenona. Es un potente activador de receptores de estrógeno y su acción es similar a la de *17-β-Estradiol* [13].

β-Agonistas

Son un grupo de sustancias capaces de estimular los receptores β_2 adrenérgicos. Químicamente son similares a las catecolaminas endógenas (Adrenalina y Nor-adrenalina). Son administrados por vía oral. En producción animal, se emplean por su capacidad de producir cambios de composición corporal con disminución del tenor graso y aumento de tejido magro. *Clembuterol*, sustancia utilizada originalmente en afecciones pulmonares de caballos con efecto anti-catabolizante de acción rápida y prolongada. *Salbutamol*, broncodilatador que usado en altas dosis es capaz de regular el aumento muscular. *Ractopamina*, es otro compuesto perteneciente a este grupo de amplio uso.

Hormona de crecimiento (GH)

Es una proteína sintetizada y secretada por la adenohipófisis. Actúa a diferentes niveles del metabolismo celular (especialmente, crecimiento y reproducción celular) y estimula la liberación del Factor de Crecimiento Insulínico tipo 1 (Insuline Growth Factor I, IGF-I). En producción animal es usada por una fuerte disminución de tejido adiposo con un leve aumento de músculo magro.

Andrógenos y sus receptores

Los andrógenos son sustancias conocidas por desarrollar y mantener las características sexuales masculinas. Además, para ser considerados andrógenos deben ser capaces de unirse y activar los receptores de andrógenos [12].

Haciendo una breve reseña histórica, podemos mencionar como antecedentes destacados que, en 1848, un investigador alemán (Berthold) demuestra la relación entre las gónadas y el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios en gallos. En 1889, un médico francés (Brown-Sequard) reporta la actividad “androgénica” de extractos de testículo de animales. En 1931, se obtiene la primera hormona andrógena en estado puro “androsterona”. En 1935, se identificó la *Testosterona* como la hormona sexual masculina de mamíferos, responsable del desarrollo de características de fertilidad, virilización y funciones sexuales. Inmediatamente después se empezaron los estudios clínicos y farmacológicos para su utilización dada su fuerte efecto muscular, en el aumento del tamaño y la fuerza [12].

Los andrógenos son producidos en diferentes lugares de un organismo. La *Testosterona* es un andrógeno producido en testículo y en otros órganos (por ejemplo, glándulas suprarrenales) [15]. Por cantidad, la más importante es la *Testosterona* (T) junto con *Dihidrotestosterona* y *Androstenodiona*. Sin embargo, gran cantidad de *Testosterona* es convertida en *Dihidrotestosterona* (DHT) en los tejidos y este metabolito tiene mayor actividad que la *Testosterona* (Figura 1). En los testículos la síntesis de *Testosterona* se produce en células que

se conocen con el nombre de células intersticiales de Leydig (Figura 2). La vía natural de síntesis se realiza a partir de colesterol o acetil coenzima A [15].

Luego de su síntesis y secreción fuera de las células de Leydig, cerca del 97% de T viaja unida a la albúmina plasmática o a la proteína denominada Globulina Fijadora de Hormonas sexuales. Permanece en plasma de 30 minutos a varias horas, período en el que la *Testosterona* alcanza los tejidos o se transforma a sustancias inactivas para ser excretadas. [15].

Tras ingresar a las células de los tejidos diana, una parte de la *Testosterona* es transformada en DHT, en especial en órganos como la próstata y los genitales. Algunas funciones dependen de esta transformación, es decir dependen de los niveles de DHT. Las funciones intracelulares y su relación con los receptores de andrógenos (AR) se describen más adelante. [15].

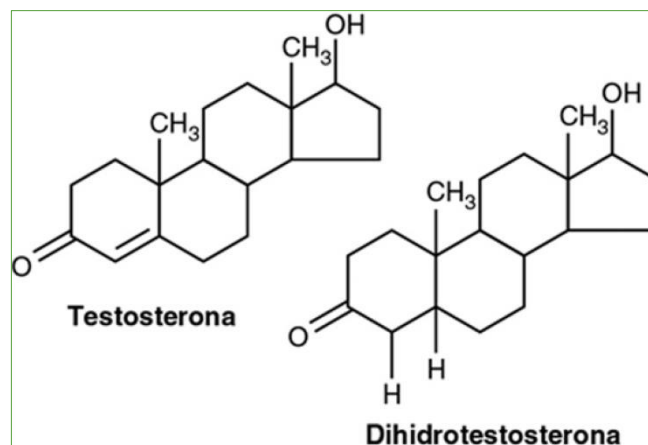


Figura 1. Estructura química de los andrógenos esteroideos endógenos: Testosterona y Dihidrotestosterona. [15]

El hígado es el órgano principal de metabolización de los andrógenos, convirtiendo rápidamente la *Testosterona* que no se fijó en androsterona y deshidroepiandrosterona. Además, se pueden conjugar para dar metabolitos derivados, los glucurónidos o sulfatos (principalmente glucurónidos) previamente a su eliminación con bilis al intestino o en orina por los riñones [15]. La administración oral de *Testosterona* tiene una vida media en plasma de 30 minutos y el 90 % es metabolizada antes de alcanzar la circulación sistémica [16].

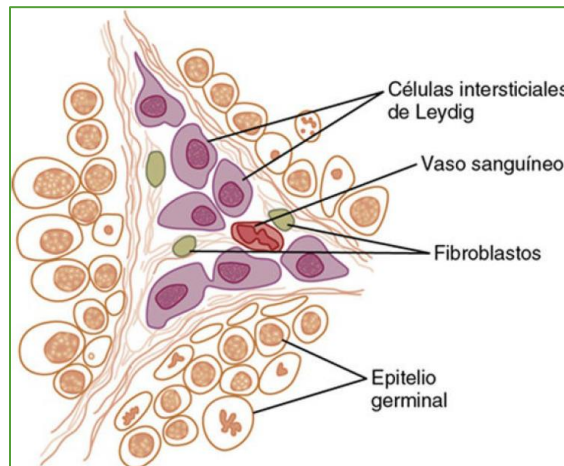


Figura 2. Células intersticiales de Leydig [15].

En testículo, responsables de la síntesis de *Testosterona*, *Dihidrotestosterona* y *Androstenodiona*.

En general, la *Testosterona* y los *esteroides androgénicos* son los responsables de las características distintivas del macho. Sin embargo, otras funciones son independientes del sexo. Entre los efectos reconocidos, se encuentran desarrollo fetal, desarrollo de caracteres sexuales primarios y secundarios (regulación de crecimiento de piel, pelos, músculo, huesos, equilibrio hidrolítico, modificaciones en laringe, etc.). El mecanismo intracelular básico del efecto anabolizante es atribuido al aumento de la síntesis proteica en la célula diana (Ver *Receptores de Andrógenos*, pág. 32). Los efectos más importantes de los andrógenos en producción animal, se mencionan en la Figura 3.

En los mamíferos, el sistema endocrino y el sistema nervioso se encargan de regular la alimentación y el metabolismo, la homeostasis del medio interno, el crecimiento del organismo, los mecanismos de reproducción, la adaptación y las respuestas a su medio ambiente. La regulación implica respuestas neurológicas y mecanismos de retroalimentación endocrinos.



Figura 3. Efectos destacados de los andrógenos usados en producción animal [15].

La regulación fisiológica de los andrógenos inicia con la secreción de Hormona Liberadora de Gonadotropina (GnRH, Gonadotropin Release Hormone). Esta hormona es producida y liberada por el hipotálamo. En la adenohipófisis, GnRH estimula la producción y la secreción de otras 2 hormonas denominadas Luteinizante (LH, Luteinizing Hormone) y Foliculoestimulante (FSH, Follicle-stimulating Hormone). A su vez, la LH estimula la secreción de *Testosterona* por los testículos y la FSH estimula la espermatogénesis. [15]. La regulación se lleva a cabo por medio de la acción directa de T, secretada por los testículos en respuesta a LH, a nivel de hipotálamo con inhibición de secreción de GnRH, con lo cual se reduce la liberación de LH y FSH, en adenohipófisis [15]. En el caso contrario, baja concentración de T en sangre, desencadena la liberación de GnRH con la consecuente liberación de LH y FSH que estimula la nueva liberación de T.

Receptores de Andrógenos

El receptor de andrógeno (AR, Androgen Receptor) es miembro de la súper familia de receptores nucleares de esteroides. Se trata de una proteína

soluble, que funciona como factor intracelular de transcripción. Como puede verse en la Figura 4, estructuralmente, está constituido por tres regiones con funciones diferentes, Dominio de Unión al ADN (DNA-Binding Domain, DBD), Dominio de Unión al Ligando (Ligand Binding Domain (LBD) y Dominio N-terminal (N-terminal domain, NTD). Un ligando agonista desencadena cambios conformacionales en el receptor [16].

Los AR están expresados en los órganos diana como músculo esquelético, hígado, sistema nervioso central y principalmente en próstata, glándula suprarrenal y epidídimo.

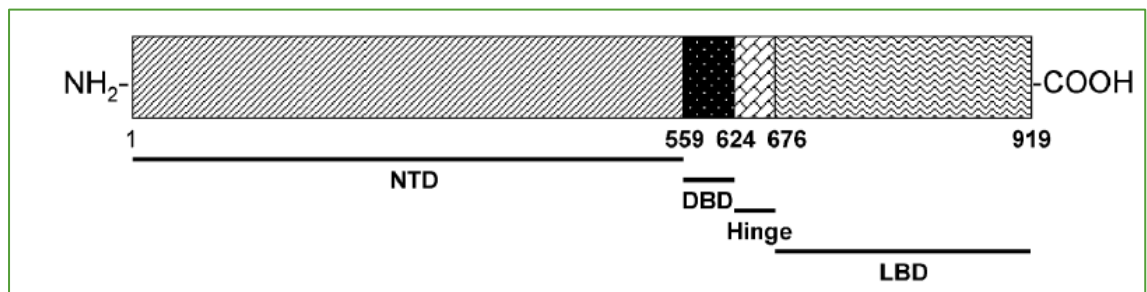


Figura 4. Estructura de Receptor Andrógeno humano [16]

En ausencia de *ligando* el AR permanece en el citoplasma unido a *chaperonas* o *proteínas de choque térmico* HSP 70 y HSP 90 (Heat Shock Protein, HSP). Sin embargo, en presencia de ligando agonista (incluyendo T o DHT), interactúa con la región LBD produciendo un cambio conformacional que elimina las proteínas HSPs, ocurre la dimerización de AR, fosforilación, translocación al núcleo y unión con elementos de respuesta a andrógenos (androgen response element, AREs). Por esta razón se convocan cofactores y maquinaria transcripcional de forma de activar los genes dependientes de AR bajo estímulo de ligandos agonistas (Figura 5). Así se desencadenan las acciones antes mencionadas, por ejemplo aquellas presentadas en la Figura 3.

Los efectos producidos en tejidos reproductivos (próstata, testículos, vesícula seminal y estructuras accesorias) se conocen con el nombre de *Efectos Androgénicos* mientras que los efectos en músculos y huesos reciben el nombre de *Efectos Anabólicos* [16].

En la última década se realizaron avances sobre el mecanismo de acción de la T en los distintos tejidos. Existen tres tipos de acciones: primero T puede activar AR de manera directa donde la *5 α -reductasa* no se expresa; en segundo lugar, T se transforma a DHT antes de activar a AR (5 % a 10 %); y en tercer lugar, cerca de un 0,2 % de T es atacada por una *Aromatasa* que transforma a T en *Estrógeno* activando *Receptores de Estrógeno* [14, 16].

La formación de DHT es importante debido a que posee mayor afinidad por AR que T, dando una respuesta más potente en tejidos “*DHT-dependientes*” como son próstata, testículos, vesícula seminal y estructuras accesorias (*Efectos Androgénicos*). Los Estrógenos generados por transformación de T serían fuertes reguladores de procesos metabólicos relacionados con comportamiento y cognición, actividad cardiovascular, función sexual incluyendo libido y procesos de recambio óseo en el macho. Sin embargo, la mayor proporción de T actuaría sin cambios en tejidos “*DHT-Independiente*” o donde la *5 α -reductasa* se expresa escasamente, actuando directamente sobre el crecimiento de músculo esquelético, la formación de tejido óseo, la distribución de tejido adiposo y la función sexual [16, 17].

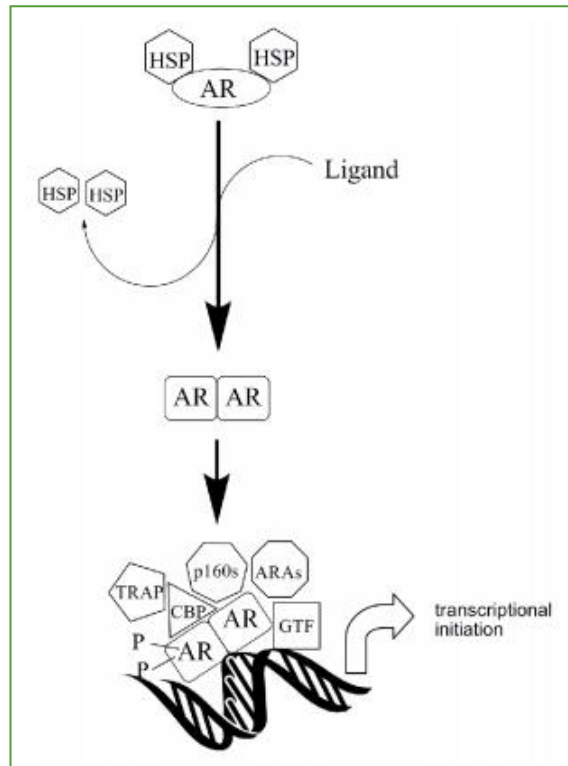


Figura 5. Mecanismo de acción del receptor de andrógeno [18]

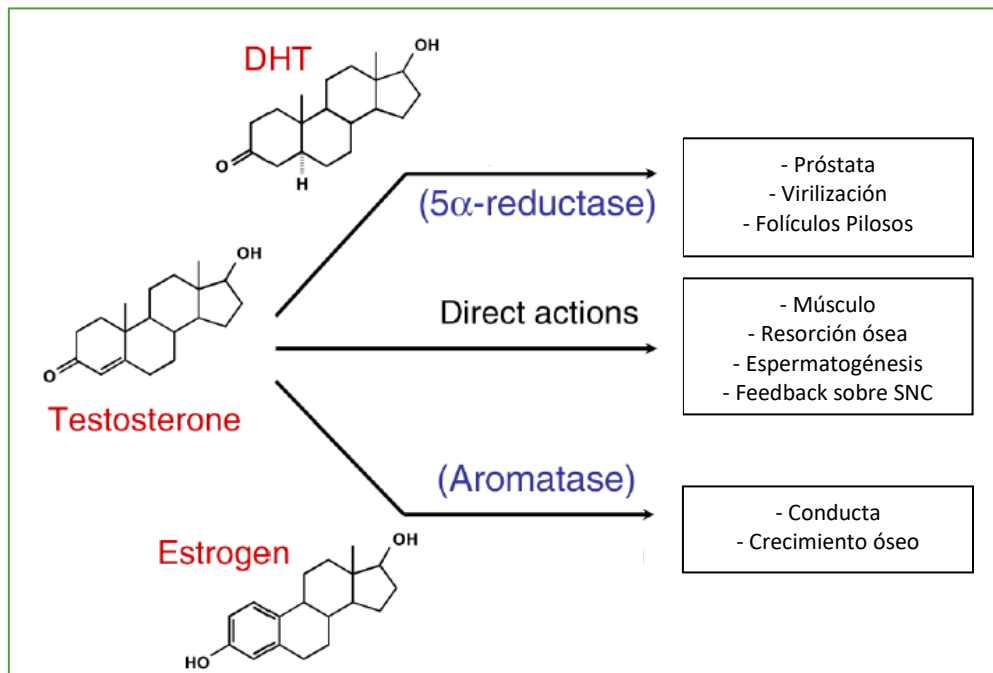


Figura 6. Efectos de la *Testosterona* en los tejidos [14, 17].

La *Testosterona* (*T*) puede unirse a los receptores de andrógenos (*AR*) directamente. En algunos casos, según las enzimas presentes en el tejido, *T* puede ser transformada por 5α-reductasa para unirse a los *AR* con mayor afinidad que *T*. En otros tejidos, está presente una *Aromatasa* capaz de transformar a *T* y posibilitar su unión a receptores de estrógenos (*ER*).

Moduladores Selectivos de Receptores de Andrógenos (SARMs)

Los esteroides androgénicos anabolizantes han sido aislados, identificados y sintetizados desde los años 1930 [19]. Es bien conocido que su propiedad anabolizante en tejido muscular se basa en su capacidad agonista de los receptores androgénicos (Androgen Receptors, AR) [12, 19-21]. Durante décadas, se han utilizado clínicamente en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el déficit de andrógenos, incluyendo la osteoporosis y la hiperplasia prostática benigna [20]. Sin embargo, pese a las investigaciones constantes e intensivas, el empleo es muy limitado debido a que no son capaces de separar el efecto anabolizante del androgénico.

En los últimos años, su idoneidad para la terapia de reemplazo hormonal en hombres de edad avanzada y la regulación de la fertilidad masculina ha estado bajo investigación [22]. Las terapias tradicionales con anabólicos androgénicos, que aplican compuestos esteroides como la *Testosterona*, son a menudo limitadas debido a la baja biodisponibilidad oral, la reactividad cruzada con otros receptores esteroides, la toxicidad hepática y otros efectos secundarios indeseables en la próstata y en el sistema cardiovascular [12, 19, 20].

Los SARMs son una nueva familia de sustancias, químicamente no esteroideas, que tienen capacidad de unión a receptores de andrógenos (AR) [23, 24]. El término *Moduladores Selectivos de Receptores de Andrógenos* y la selectividad de tejidos fue reportado por primera vez en 1998 [23]. Los primeros SARMs no esteroideos fueron los derivados de la arilpropionamida, particularmente derivados de la *Flutamida*. Actualmente, se encuentran en un estado relativamente precoz de desarrollo para el uso en clínica humana.

El mecanismo de acción de los SARMs no se encuentra completamente establecidos. Sin embargo, las hipótesis probables son no ser susceptibles a la acción de la enzima reductora de posición 5 alfa (*5 α -reductasa*) que posibilita la acción los andrógenos esteroideos en algunos tejidos o generar un cambio

estructural diferente del AR en diferentes tejidos, actuando a nivel genómico modificando el reclutamiento de cofactores.

Idealmente presentan selectividad en su efecto dependiendo del tejido y tienen baja toxicidad (hepática, cardiovascular, etc.). Además, poseen propiedades farmacológicas favorables como alta absorción digestiva facilitando la administración oral y muestran un tiempo vida media largo antes de ser eliminados del organismo [16, 18, 25, 26].

Considerando sus estructuras químicas, los SARM se pueden clasificar en al menos en cuatro clases: 1) arilpropionamida (APA), 2) hidantoína bicíclica, 3) quinoleína, y 4) análogos de tetrahydroquinoleina. En la Tabla 1 se presentan las estructuras químicas generales de cada familia.

El estudio del metabolismo de estas sustancias químicas es fundamental cuando se quiere realizar el control en prácticas ganaderas [27]. Esto se debe a que luego de su administración, la sustancia sufre reacciones químicas dentro del organismo que la modifican. En consecuencia, la concentración de la sustancia disminuye en el organismo a expensas del aumento de los productos de las reacciones. De esta forma, algunos metabolitos pueden permanecer como indicadores del uso de la sustancia en concentraciones mayores y por períodos de tiempos más prolongados que la droga administrada [4, 28].

Tabla 1. Familias de SARMs no esteroideos [29].

Familia química	Estructura general
Análogos de la Arilpropionamida	
Análogos de la Hidantoína Bicíclica	
Análogos de la Tetrahydroquinoleína	
Análogos de la Quinoleína	

El primer el desarrollo exitoso de un SARM es Bicalutamida (Figura 7), perteneciente a los derivados de la aril propionamida (APA) [30, 31]. Pese a ser usado como antiandrógeno, por bloquear los AR, en el hombre produce el aumento de los niveles hormonales de testosterona, estradiol, hormona luteinizante y en menor medida la hormona folículo estimulante [32-38]. Otros compuestos SARMs están en diferentes etapas del estudio clínico [16, 39, 40]. Sin embargo, otros derivados de APA demostraron su capacidad agonista de AR [41].

Estudios del metabolismo de Bicalutamida utilizando animales de experimentación y humanos (pruebas clínicas) reflejan la aparición de metabolitos producto de reacciones de *Fase I* (hidroxilación) y *Fase II* (conjugación con glucurónido y sulfato) [30, 31]. Además, los perfiles de eliminación en materia fecal y orina de los metabolitos y de Bicalutamida libre

destacaron la importancia de estas matrices como vía de excreción cuantitativamente importantes [42, 43].

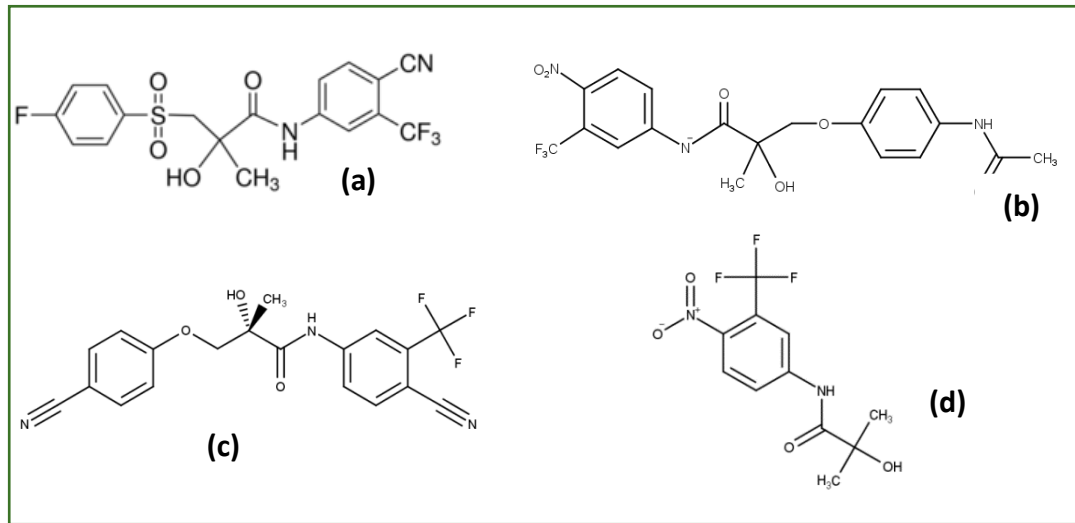


Figura 7. Estructura química de Bicalutamida (a); Andarina (b); Ostarina (c); Hidroxiflutamida (d).

En los últimos años, un número creciente de estudios han sido publicados sobre las características analíticas y de metabolismo de SRAM derivados de APA. Los métodos empleados en su mayoría son aproximaciones modernas de Cromatografía Líquida acoplada a detectores de espectrometría de masas de alta resolución [44-46]. Las *reacciones de Fase I* (hidroxilación, defenilación, nitrorreducción, etc.) y de *Fase II* (conjugación con glucurónido y sulfato) fueron confirmadas en estudios *in vitro* e *in vivo* (Orina y Sangre) [47-50].

Algunos de los Moduladores Selectivos de Receptores de Andrógenos (SARMs) con capacidad agonista de AR, constituyen un riesgo de abuso en el deporte y en la producción animal. Por este motivo, desde 2008, se prohíbe el uso de los SARMs en los deportes por la Agencia Mundial Antidopaje [51, 52]. Además, aunque los ensayos clínicos/toxicológicos no están concluidos, se han registrado casos de ventas ilegales a través de Internet y su empleo en la producción de cerdos ha sido reportado [53, 54]. Casos de abuso por SARMs en deportes se han publicado [55], solo durante el 2013 se han reportado 13 detecciones [56]. De esta manera, los SARMs comienzan a recorrer un camino

desde el dopaje deportivo a la producción ganadera como ha ocurrido antes con otros agentes anabolizantes [49].

Seguridad Química de los Alimentos

El uso de sustancias químicas durante la producción animal para tratar síntomas de una enfermedad o simplemente con fines zootécnicos, genera residuos químicos. La toxicidad de los residuos o el riesgo que presentan para la salud del consumidor de productos derivados de animales tratados determina que las drogas veterinarias usadas se encuentren reglamentadas mediante normativas de aplicación voluntarias o legislaciones de cumplimiento obligatorio, que difieren según el país considerado.

Los participantes de la cadena productiva deben involucrarse para lograr niveles de residuos que no afecten la salud del consumidor. Los productores, los veterinarios y aquellos partícipes del negocio de los alimentos tienen la responsabilidad fundamental de proveer alimentos seguros y de calidad en el mercado. En primer lugar, los productores, necesitan saber qué sustancias y cómo pueden utilizarlas durante la producción y para ello buscar el asesoramiento profesional de los veterinarios. Los gobiernos, a través de sus organismos, deben adoptar medidas de control de los alimentos, teniendo en cuenta las obligaciones comerciales internacionales. En casos de incumplimiento, los inspectores y los analistas de laboratorio deben proporcionar evidencia. Los jueces deciden sanciones por el abuso o el uso ilegal de fármacos.

El comercio de alimentos puede verse afectado de manera significativa por las diferencias en los requisitos de inocuidad de los alimentos entre los países, como, por ejemplo, los residuos de medicamentos veterinarios. Incluso la disponibilidad de diferentes métodos analíticos y las diferencias en el rendimiento entre los laboratorios, especialmente el caso de sustancias prohibidas (cuando no se ha establecido un límite permitido: sustancia no autorizada; o cuando no se puede establecer un límite permitido: sustancia prohibida) también pueden conducir a *Obstáculos Técnicos al Comercio*.

El Acuerdo sobre la aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias (Sanitary and Phytosanitary Measures, SPS-Agreement) se firmó en el marco del Acuerdo General de Aranceles Aduaneros y Comercio de la Ronda Uruguay (1986-1994). Esto llevó a la creación de la Organización Mundial del Comercio (OMC) para regular el comercio internacional. El Acuerdo SPS fue firmado por 132 Gobiernos Miembros en 1994 y entró en vigor con la creación de la OMC el 1 de enero de 1995. El Acuerdo se ocupa de la aplicación de las normas sobre seguridad alimentaria y sanidad animal y vegetal.

El Acuerdo SPS permite a los países establecer sus propios estándares de bioseguridad, pero alienta a los gobiernos a "armonizarlos", es decir, basar sus medidas nacionales en las normas, directrices y recomendaciones internacionales elaboradas por:

- la Comisión del Codex Alimentarius de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) / Organización Mundial de la Salud (OMS) para la seguridad alimentaria

- la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE)

- la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria de la FAO para la protección vegetal.

El Acuerdo SPS alienta la adopción de normas basadas en medidas científicas para reducir la incertidumbre en el comercio. Por consiguiente, este acuerdo busca facilitar el comercio permitiendo a cada país adoptar las medidas necesarias para cuidar la salud humana, animal y vegetal, siempre que esto no constituya una medida arbitraria, injustificable y discriminatoria entre los países o represente una restricción encubierta al comercio internacional.

Este acuerdo se aplica para alimentos, para piensos y cualquier alimento derivado de animales y vegetales. El objetivo es garantizar que un estado *justifique con información científica* la introducción, la modificación o mantenimiento de normas o procedimientos relacionados con el comercio entre países. El Acuerdo SPS es una *obligación internacional*, que obliga a los gobiernos a respetar las normas que regulan su comercio de una manera "abierta, no discriminatoria y basada en la ciencia".

Legislación Argentina

Como miembro de la OMC, Argentina debe cumplir el Acuerdo SPS y contribuir a impedir que los países utilicen medidas sanitarias y fitosanitarias para restringir el comercio internacional.

La legislación debe asegurar el suministro de alimento seguro y de calidad a los consumidores nacionales y a los compradores internacionales.

En Argentina desde el año 1961, las sustancias con efecto anabolizante se encuentran reguladas. El Decreto Nacional 4224/61, considerando la prohibición que tomaba vigencia en Italia (consumidor de la producción argentina), prohíbe "...la utilización de sustancias de actividad estrogénica en cualquiera de sus formas (natural o sintética) para el uso con fines zootécnicos". Sin embargo, habilita la utilización terapéutica de estrógenos.

En 1987, basándose en estudios y recomendaciones realizadas por organismos internacionales (FAO/AGA 1975 y EURO/ICP/FSP 002), por DISP. N° 56/87 el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) prohíbe "...la importación, fabricación, comercialización, uso y tenencia del *Dietilestilbestrol* (DES), sus sales y sus ésteres y cualquier producto de uso veterinario que lo contengan en su formulación". La toxicidad de estas sustancias (cancerígenas), la falta de metabolización y su estabilidad térmica a los procesos de cocción y la existencia de sustitutos fueron la base para la implementación de esta reglamentación. En 2005, la Resolución SAGPyA N° 31/2005, por ser otros estilbenos de comprobado efecto tóxico, se prohíbe "...la importación, fabricación, comercialización, uso y tenencia de *Hexestrol* y de *Dinestrol*, sus sales y sus ésteres, y de cualquier producto de uso veterinario que los contenga en su formulación."

En 1995, considerando casos de intoxicación humana en Europa que se relacionaban con el uso de β -agonistas y dada la falta de datos toxicológicos para permitir el uso de estas sustancias en producción animal con destino de consumo humano, se prohibió "...elaboración, fraccionamiento, tenencia, importación y uso de alimentos, suplementos alimenticios o medicamentosos y medicamentos con *Clembuterol*, *Salbutamol*, *Cimaterol*, *Albuterol*".

Permitiéndose uso terapéutico en algunos animales bajo responsabilidad directa del veterinario (Resolución SENASA N° 335/95).

En 1997, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la Nación Argentina (Resolución SAGPyA N° 515/97) “...establece los requisitos técnico-administrativos que deberán observar los establecimientos rurales que provean ganado para faena, cuyos productos cárnicos estén destinados a ser exportados a países con exigencias específicas en materia de sustancias anabolizantes...”, por ejemplo, la Unión Europea. Además, se implementa el Plan Nacional de Control Higiénico-Sanitario y de Residuos Químicos, “...para establecer los procedimientos, exigencias y metodologías referidas al control de residuos en dichos productos, y garantizar en los mismos la ausencia de sustancias anabolizantes”.

En el año 2002, se prohíbe el uso de sustancias anabolizantes hormonales inyectables en animales para consumo humano y se establece un sistema de trazabilidad para el seguimiento y control de anabolizantes hormonales que se administren por implante subcutáneo, y para la identificación de los animales tratados (Resolución SENASA N° 156/02).

En el año 2004, se prohíbe “...el uso de productos veterinarios anabolizantes en los animales destinados a la producción de alimentos para el consumo humano.” incluyendo “...los anabólicos naturales, sintéticos o semisintéticos con acción androgénica, estrogénica o progestágena con fines de promoción del crecimiento.” dejando sólo habilitación para manejos o afecciones reproductivas (Resolución SAGPyA 447/2004). Estableciendo la importancia de asegurar la calidad de los alimentos y fortalecer el comercio con países con exigencias similares.

En 2007, se prohíben productos veterinarios indicados como promotores del crecimiento, que contengan en su formulación sustancias con acción tirostática y β -agonistas (Resolución SAGPyA N°148/06).

Legislación de la Unión Europea

La legislación de la Unión Europea busca garantizar alimentos seguros a los consumidores de la UE, independientemente de si se produjeron en la UE o en un tercer país.

En cuanto al empleo de promotores de crecimiento en la producción animal con destino de alimentos, la legislación europea se basa en el *principio de precaución* establecido en el Acuerdo SPS (frente a una sustancia de la cual no se conoce todo su efecto tóxico) y en información científica que demuestra que bajo ciertas circunstancias y dosis estas sustancias tienen efectos tóxicos para el animal y para el consumidor de alimentos que derivan de animales tratados. También, se han encontrado efectos cancerígenos, neurotóxicos, disrupción endócrina, alteraciones inmunológicas, etc. [57, 58].

En Europa, como comunidad económica, desde 1981 se comenzó el control y la restricción para el empleo de agentes anabolizantes en ganadería. En ese año, su normativa (Directiva 81/602/CEE) prohibió ciertas sustancias (dietilestilbestrol, otros estilbenos y tirostáticos). Sin embargo, en aquel momento cada *estado miembro* mantuvo la libertad para prohibir o autorizar el uso de hormonas. En 1988, la Comunidad Europea (CE) prohibió el uso de seis hormonas para la promoción del crecimiento animal (*17-β-Estradiol; Testosterona; Progesterona; Zeranol; Acetato de Trembolona y Acetato de Melengestrol*).

Esta prohibición se aplicó internamente y a las importaciones procedentes de *terceros países*, a partir de 1989. Los terceros países que quieren exportar carne bovina y productos cárnicos a la UE deben disponer de legislación equivalente o utilizar un programa de ganado *libre de hormonas*.

En 1996, se publicaron dos directivas, la Directiva 96/22 / CE y la Directiva 96/23 / CE, que constituyen el marco legal actual para el control de residuos en alimentos de origen animal. La Directiva 96/22/ CE prohíbe el uso de β -agonistas y de determinadas sustancias que tienen una acción hormonal o tirostática en la ganadería. Sin embargo, la Directiva 96/22/CE, permite el empleo de determinados fármacos veterinarios que contienen hormonas (por

ejemplo, 17- β Estradiol, Testosterona, Progesterona y derivados) para uso terapéutico y para la reproducción. La Directiva 96/23/CE establece las medidas que los Estados miembros de la UE deben adoptar para vigilar las sustancias y sus residuos tanto en animales vivos como en productos de origen animal. En conjunto, estas Directivas describen cómo investigar y detectar sustancias en animales, piensos y productos de origen animal.

La Decisión 97/747/CE establece las características del muestreo a realizarse para el control de estas sustancias y sus residuos en determinados productos de origen animal (por ejemplo, aves de corral, carne de conejo y caza, huevos, leche, miel y pescado).

Otros países

Estudios realizados por expertos de la FAO indican que los residuos hormonales naturales en animales tratados no son necesariamente peligrosos para la salud humana. Indican que el consumidor produce cantidades diarias muy superiores a los residuos de estas hormonas y que además está expuesto a dosis más altas, presentes en carne y leche de animales no tratados. Es por ello que muchos países (Estados Unidos, Canadá, Australia, Nueva Zelanda y algunos países de América, Asia y África) aprueban el empleo de algunos agentes anabólicos para la producción animal.

Como se mencionó, los gobiernos implementan un conjunto de medidas para la protección de la salud pública, como, por ejemplo, capacitaciones para los sectores productivos involucrados en la utilización de sustancias químicas, información para los consumidores y aplicación de controles de inocuidad de alimentos. Los diferentes criterios y normativas legales adoptadas por los gobiernos de los países para la elaboración de alimentos y los niveles de residuos pueden dificultar el comercio de productos. El caso de las sustancias anabolizantes en la producción animal lleva años de disputas entre Estados Unidos y la Unión Europea.

Control de Residuos en Producción Animal

A diferencia de otras áreas de la química analítica, el control de prácticas anabolizantes presenta algunas características particulares relacionadas con la escasa cantidad de sustancia que se debe identificar y cuantificar y las consecuencias legales y económicas que surgen de los posibles resultados. De hecho, cientos de compuestos y sus metabolitos deben ser detectados e identificados a partir de una alícuota de muestra limitada durante un corto período de tiempo.

Los laboratorios utilizan una o más técnicas diferentes para la detección y confirmación de las sustancias anabolizantes, que pueden incluir:

- Los métodos de detección inmunológicos, tales como inmunoensayos (ELISA, Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay),
- Métodos cromatográficos: cromatografía de capa delgada (TLC, Thin Layer Chromatography), cromatografía gaseosa (GC, Gas Chromatography) y cromatografía líquida (LC, Liquid Chromatography),
- Métodos Ópticos/espectroscópicos: espectroscopía infrarrojo (IR, infra red), espectroscopía UV-visible, espectroscopía de fluorescencia y espectrometría de masas (MS, mass spectrometry)
- Electroforesis capilar.

Estas técnicas de control pueden dividirse en dos categorías: las que permiten resultados categóricos, incluyendo el uso de la espectrometría de masas, en particular la GC – MSⁿ o LC – MSⁿ y el otro grupo de técnicas que no brindan un resultado definitivo y por lo tanto requieren una etapa de confirmación, que incluyen inmunoensayos, colorimetría, electroforesis capilar y técnicas de cromatografía [14]. De forma general, podemos referirnos al primer grupo como técnicas *Confirmatorias* y al segundo como técnicas de Tamizaje o Cribado, más frecuentemente llamadas Métodos de *Screening*.

La espectrometría de masas se ha convertido en una herramienta indispensable para la detección de anabólicos, basándose en la tendencia de disociación y fragmentación de los anabólicos bajo diferentes condiciones de ionización, permitiendo la caracterización estructural de un amplio número de

moléculas. De esta forma, se obtiene la identificación de núcleos moleculares o elementos comunes y proporciona el espectro de masas característico (*huella digital*) de estas sustancias y de sus productos metabólicos, logrando la detección rápida, sensible y específica en matrices biológicas complejas [14].

En los laboratorios de control modernos el uso de LC-MS se hizo necesario para satisfacer características técnicas de velocidad, robustez, sensibilidad y especificidad de los métodos de detección. El empleo de LC-MS desplazó la posición central que tenían las técnicas de GC (con o sin detectores de espectrometría de masas) en los controles de rutina hasta el final del siglo pasado, fundamentalmente por las dificultades analíticas de GC relacionadas con la detección de moléculas pesadas o polares. Además, en algunos casos las técnicas de GC suponen procedimientos con gran consumo de tiempo de trabajo (del analista) y la necesidad de utilizar reactivos de derivatización peligrosos por su toxicidad, para el analista [14].

Los métodos analíticos para el control de compuestos anabólicos deben satisfacer diferentes criterios de desempeño técnico que darán validez a los resultados obtenidos (Decisión 2002/657/EC). Estos criterios están establecidos en la legislación de muchos países, incluyendo la normativa argentina y de la Unión Europea. En Argentina, los criterios de calidad exigidos por SENASA para que un laboratorio pueda emitir resultados confiables y oficiales están armonizados a la Norma ISO 17025 “...Laboratorios de Referencia de los países compradores como los pertenecientes a la Unión Europea, Estados Unidos de América, Canadá, Australia, etc. están acreditados por dicha Norma” (Disposición 125/2006 – SENASA)

Norma ISO/IEC 17025: 2005

Esta norma lleva el nombre de “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”. Constituye una guía útil con criterios a cumplir por un laboratorio que busca acreditar sus ensayos. Los requisitos técnicos y de gestión se enumeran junto con su explicación. Sin embargo, no describe cómo lograr el cumplimiento.

El capítulo de gestión refiere pautas que el laboratorio debe cumplir para demostrar que las actividades “no técnicas” del laboratorio se realizan bajo un Sistema de Gestión de la Calidad (basado en norma IRAM – ISO 9001). Los requisitos son: Organización; Sistema de calidad; Control de documentos; Revisión de solicitudes, licitaciones y contratos; Subcontratación de ensayos; Compra de servicios; Servicio al cliente; Reclamos; Control de no conformidades; Acción correctiva; Acción preventiva; Control de registros; Auditorías Internas y por último Revisiones por la Dirección.

El capítulo de requisitos técnicos realiza recomendaciones para identificar, entender y controlar los factores que condicionan la exactitud y la confiabilidad de las mediciones: Personal; Instalaciones; Validación – Incertidumbre; Equipo; Trazabilidad; Muestreo; Manejo de muestras; Aseguramiento de la calidad y el Informe.

Cromatografía

Esta técnica se describe en 1906, por el botánico ruso *Tswett*, siendo aplicada a la separación de los pigmentos de plantas. Las bandas coloreadas de pigmentos que se separaban en una columna de carbonato de calcio dieron la base del nombre en griego (*chroma*: color; *grapho*: registro) [59].

La cromatografía es un método separativo en el que los componentes se separan debido a la diferente *afinidad fisicoquímica* entre dos fases, una inmóvil (fase estacionaria) y otra móvil (fase móvil). En el proceso cromatográfico, la muestra es transportada por la fase móvil interaccionando con la fase estacionaria (que se encuentra fijada a un soporte) en ese momento los distintos componentes de la muestra pueden acceder a la fase móvil y la fase estacionaria, estableciéndose de forma dinámica, interacciones físico-químicas. Según la magnitud de estas interacciones generadas, cada componente de la muestra avanzará con la fase móvil a una determinada velocidad. Es decir, aquellas moléculas afines a la fase estacionaria se moverán lentamente mientras que aquellas que tengan una débil interacción con la fase estacionaria acompañarán a la fase móvil y se moverán más rápidamente. De esta forma cada componente presenta una *velocidad de elución* característica

o propia. El sistema cromatográfico moderno (Figura 8), se completa con un detector capaz de evidenciar la presencia de los componentes generando señales en el tiempo y el gráfico que se obtiene como resultado se denomina *cromatograma* (Figura 9) [59].

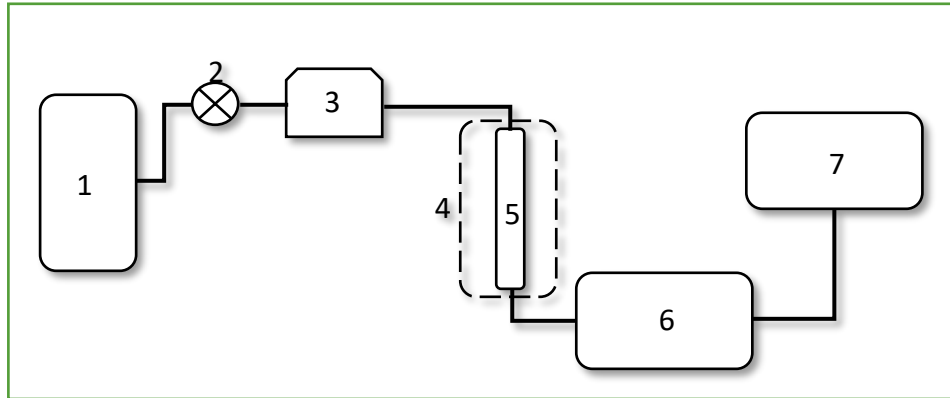


Figura 8. Esquema de cromatógrafo.

- (1) Reservorio de Fase Móvil; (2) Sistema de regulación de la fase móvil; (3) Puerto de inyección de las muestras; (4) Compartimento termostatzado para la columna; (5) Columna con Fase Estacionaria; (6) Detector con amplificación y traducción a señal eléctrica; (7) Sistema para registrar, almacenar y procesar datos (PC).

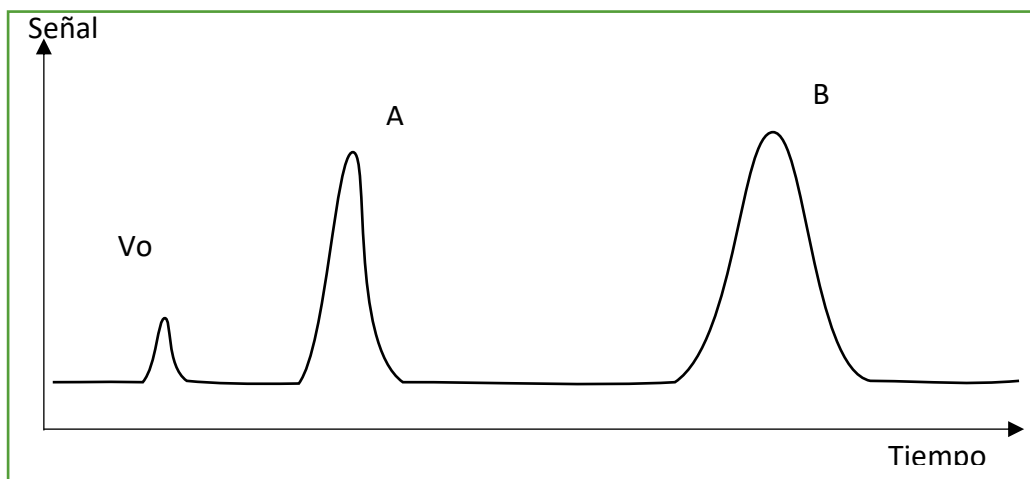


Figura 9. Esquema de cromatograma.

Se observa la señal del volumen muerto (Vo) equivalente a un componente no retenido; la señal de un componente (A) separado de otro componente (B).

Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas (mass spectrometry, MS) agrupa un conjunto de técnicas muy utilizadas en química analítica. Las técnicas de MS son capaces de suministrar información cualitativa y cuantitativa de analitos orgánicos e inorgánicos, sobre la composición en muestras complejas, la estructura molecular, las relaciones isotópicas de los átomos en las muestras, y la estructura y la composición de superficies [60, 61].

La espectrometría de masas puede dividirse en las siguientes etapas:

- generación de moléculas en fase gaseosa
- ionización (generación de iones)
- separación en función de su relación masa /carga (m/z)
- detección de los iones

Las tres partes básicas de un detector de espectrometría de masas son la *fente de ionización*, el *analizador* o filtro de masas y el *transductor* o *detector* (Figura 10).

La zona donde se introducen las moléculas, se evaporan, se ionizan y se aceleran se llama *fente de ionización*. La muestra gaseosa se ioniza entre dos placas cargadas; las moléculas se rompen en fragmentos, algunos de los cuales están cargados (iones) y otros no. Se aceleran los iones por aplicación de un potencial eléctrico y se enfocan utilizando campos eléctricos y rendijas.



Figura 10. Esquema simplificado de un espectrómetro de masas.

Los iones acelerados pasan desde la *fente de ionización* a un *analizador de masas*. En la mayoría de los analizadores de masas se separan los iones en base a su relación m/z (masa/carga, m/z), de forma tal que llegan al *detector* a diferentes tiempos. Esta pequeña corriente de iones se amplifica mediante el

transductor, normalmente un *multiplicador* de electrones, que amplifica las corrientes de modo similar a un tubo fotomultiplicador [60, 61].

El espectro de masas grafica la abundancia relativa de iones recogidos por el detector, ordenados en valores crecientes de la relación masa/carga (m/z) (Figura 11). Cada pico del espectro da información sobre la masa molecular de un determinado fragmento de la molécula que lo originó. El fragmento de mayor tamaño suele ser la molécula sin fraccionar con pérdida de un electrón, M^{*+} , con la adición de un protón, $[M+H]^+$, o con la pérdida de un hidrógeno, $[M-H]^+$, según la estabilidad relativa de cada uno de ellos y del método de espectrometría de masas aplicado. Del espectro de masas se podría deducir de forma inmediata el peso molecular del analito, M , y los pesos moleculares de los sustituyentes y de otras partes de la molécula [60, 61].

Fuentes de ionización

Las fuentes de ionización más usadas en el control de drogas anabolizantes son:

A) Impacto electrónico (Electron Ionization, EI) y ionización química (Chemical Ionization, CI)

Los electrones requeridos para ionizar las moléculas se emiten desde un filamento incandescente y se aceleran entre electrodos hasta alcanzar una determinada energía, generalmente 70 eV. Las moléculas de la muestra se vaporizan y el haz de electrones pasa a través de la muestra. Los electrones chocan o impactan contra las moléculas provocando la formación de iones positivos. Estos iones son repelidos fuera de la cámara de ionización, son enfocados y se introducen en el analizador de masas.

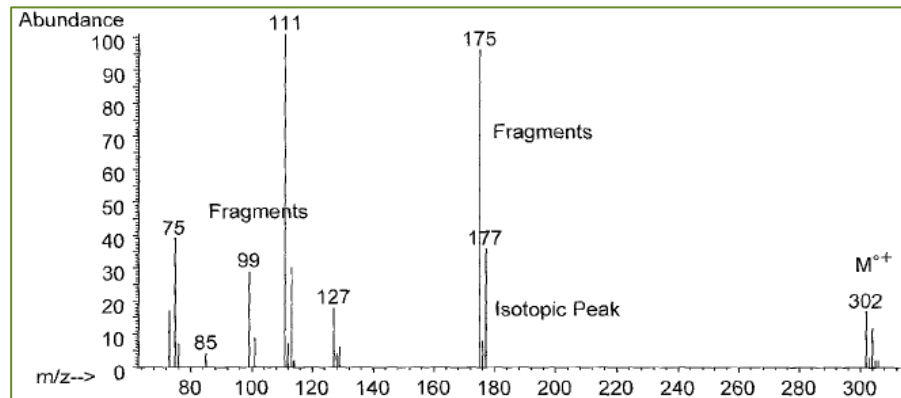


Figura 11. Representación de un espectro de masas.

Las fuentes de ionización química (CI) utilizan un gas reactivo como mediador para “suavizar” las condiciones de ionización de la muestra. En la cámara de ionización se introduce el gas que va a actuar de mediador. El gas es ionizado por el haz de electrones, y a través de las subsiguientes reacciones que tienen lugar en fase gaseosa, acepta protones formando iones moleculares. Estos iones se adicionan a los solutos, dando lugar a diversos iones con más masa que las moléculas originales. Este ion se acelera a través del campo eléctrico hacia el analizador de masas. Las fuentes **EI** y **CI** son habituales en cromatografía de gases [61, 62].

B) Ionización por electronebulización (electrospray ionization, ESI)

Es una técnica de ionización mucho menos agresiva que EI y CI. Consiste en electronebulización a partir de una disolución que fluye a través de una aguja hueca sometida a un campo eléctrico de $5 - 10 \text{ kV cm}^{-1}$, formándose gotas pequeñas con carga eléctrica. De estas gotas se generan los iones en fase gaseosa. Los iones son atraídos hacia el orificio de entrada del analizador de masas mediante un segundo campo eléctrico. Dependiendo de la polaridad de este campo, en el analizador de masas entran sólo los aniones (*operación modo negativo, ESI -*) o sólo los cationes (*operación modo positivo, ESI +*). El proceso de generación de los iones y de evaporación del disolvente son reacciones superficiales, y cualquier cambio sobre la superficie va a influir en el proceso. Ésta es una fuente muy utilizada en los acoplamientos HPLC-MS [61, 62].

C) Ionización química a presión atmosférica (atmospheric pressure chemical ionization, APCI)

Esta fuente de ionización es una modificación de la fuente ESI, útil para detectar moléculas difíciles de ionizar (poco polares). En una fuente ESI la ionización se produce por efecto de un campo eléctrico durante la nebulización, mientras que en APCI la nebulización y la ionización se producen secuencialmente. En este caso, electrones rápidos chocan con las moléculas de nitrógeno y las ionizan. El nitrógeno ionizado reacciona con las moléculas vaporizadas del disolvente, dando lugar a otros iones, que a su vez reaccionan con las moléculas y iones de los solutos. El resultado es una ionización compleja de la muestra, con fragmentos que no siempre tienen una interpretación fácil [61, 62].

D) Ionización basada en láseres pulsados

Existen dos fuentes de ionización diferentes que utilizan láseres pulsados para evaporar la parte superficial de los sólidos. La ablación por láser se utiliza para sublimar muestras sólidas que son difíciles de digerir químicamente. Se generan partículas mediante un láser pulsante, las cuales se introducen mediante un flujo de gas inerte dentro de una antorcha de plasma acoplada inductivamente. La ablación por láser-ICP se utiliza para el análisis de elementos.

Otra fuente de ionización por láser es la ionización por desorción asistida por láser (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, *MALDI*). En este caso el láser calienta la muestra que contiene el analito y los componentes de otra sustancia denominada “*matriz*” para producir iones en fase gaseosa. Los iones MALDI se producen en un pulso corto de tiempo. Es muy eficaz la combinación de la fuente de ionización MALDI con un *analizador* de tiempo de vuelo (time of flight, TOF). Esta técnica acoplada, denominada *MALDI-TOF*, ha adquirido gran importancia en el análisis de muestras sólidas complejas, incluyendo material biológico [62, 63].

Analizadores de masas

La función de los analizadores de masas es la de separar iones con diferentes m/z . Existen diferentes tipos de analizadores.

A) Analizadores de sector magnético

Utilizan un imán permanente para hacer que el haz de iones generados en la *fente de ionización* se mueva en una trayectoria circular de 180, 90 o 60 grados. Se puede llevar a cabo un barrido de masas de los iones variando la fuerza del campo magnético. Los iones que pasan a través de la rendija a la salida se recogen en un electrodo colector y dan lugar a una corriente eléctrica que se amplifica y se registra. Estos espectrómetros se conocen a menudo como de enfoque simple [61, 62].

Generalmente asociados a un cromatógrafo gaseoso con fuente de ionización por *impacto electrónico* o *ionización química*.

B) Analizadores de doble sector magnético o doble enfoque

En los instrumentos de doble enfoque se miden las masas atómicas y moleculares con mayor precisión. Utilizando combinaciones seleccionadas de campos magnéticos y electrostáticos se minimizan las aberraciones direccionales y de energía de los iones [61, 62]. Generalmente asociados a un cromatógrafo gaseoso con fuente de ionización por *impacto electrónico* o *ionización química*.

C) Analizador de masas cuadrupolar

Suelen ser más compactos y más robustos que los de sector magnético. La separación se realiza mediante un campo eléctrico variable en el tiempo (radiofrecuencia, RF). El filtro se construye a partir de cuatro barras metálicas paralelas a las que se aplica una componente de corriente alterna y otra de corriente continua de igual magnitud y signo opuesto. Esto permite que sólo los iones con m/z específicas lleguen al detector, mientras que los demás toman otras trayectorias. La trayectoria es única para cada valor de m/z .

El detector de triple cuadrupolo es una combinación de tres cuadrupolos en serie, donde el cuadrupolo medio es utilizado como celda de colisión y con esto se permite fragmentar los iones filtrados en el primer cuadrupolo. Por

último, en el tercer cuadrupolo se puede seleccionar qué ion detectar y cuáles descartar. Permite realizar estudios de fragmentación y alcanzar selectividades muy elevadas [61, 62].

D) Trampa de iones cuadrupolar

Una trampa de iones permite analizar cationes y aniones en un amplio rango de valores de m/z . Los iones se pueden confinar en un espacio reducido durante largos períodos de tiempo por la acción de campos eléctricos y magnéticos. La capacidad para retener iones en la trampa permite obtener grandes conjuntos de iones hijos empleados para obtener espectros MS^2 . Estos iones hijos pueden ser otra vez aislados y fragmentados para MS^3 , y así sucesivamente. Las fragmentaciones en el interior de la trampa se consiguen mediante colisiones con moléculas de He [61, 62].

E) Tiempo de vuelo (TOF)

Los iones procedentes de la *fuentes de ionización* pasan a un tubo de gran longitud (en el orden del metro) que separa las masas sin aplicación de ningún campo. Un impulso electromagnético comunica una determinada cantidad de energía cinética a un paquete de iones para realizar el recorrido por el tubo. Debido a que todos los iones tienen idealmente la misma energía cinética, los iones con distintas masas adquirirán distintas velocidades y por lo tanto llegarán al detector con diferentes "*tiempos de vuelo*". La característica más importante de un TOF es su elevada exactitud para establecer masas con errores del orden de pocas partes por millón, brindando información valiosa de la abundancia isotópica de la molécula, con lo cual es posible obtener conclusiones sobre su estructura y composición elemental [61, 62].

Materiales y Métodos

Un análisis de laboratorio puede dividirse en las etapas de *preparación de la muestra* (extracción del analito, purificación del analito y concentración del analito) y luego la *determinación instrumental*. Ambas etapas son complejas, la primera por las características químicas de los analitos (SARMs derivados de APA) y las matrices biológicas (orina y heces). En la segunda etapa (instrumental) se debe considerar la amplia diversidad de posibilidades como ser fases estacionarias, fases móviles, parámetros electrónicos de los espectrómetros de masas, etc. Para lograr el ajuste de todas estas variables se trabajó con estándares de los analitos y con la información de estudios previos [45, 47-50, 52, 64, 65].

En este trabajo el desarrollo de métodos analíticos comenzó estudiando los analitos (SARMs derivados de APA) para conocer sus características químicas relacionadas con el método de análisis. La Tabla 2 presenta un resumen de las moléculas usadas, sus estructuras y fragmentación en espectrometría de masas.

Por otra parte, la diferente composición (contenido de agua, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, etc.) de las matrices consideradas (orina, heces y sangre) y los equipos instrumentales hacen imposible aplicar un solo método para el análisis de los SARMs en las matrices estudiadas. En el momento de proponer técnicas de preparación de las muestras, los protocolos analíticos estudiados se encuentran resumidos en las Tabla 3, Tabla 4 y Tabla 5.

El desarrollo y puesta a punto de métodos de *determinación instrumental* LC-MS/MS se basa en condiciones cromatográficas de trabajos previos que se resumen en la Tabla 6. Con soluciones estándares de cada analito se determinan los tiempos de retención y se trabaja con parámetros electrónicos (Tabla 7) para lograr máxima sensibilidad de iones y fragmentaciones características.

Finalmente, se aplican los métodos de *preparación de muestras* y *determinación instrumental* a muestras blanco (que no contienen nuestros

analitos) con el agregado intensional de una cantidad conocida de los analitos para evaluar el desempeño del método desarrollado.

Desarrollo de un método para el control del uso de SARM

Para el desarrollo de metodología de análisis para el control de sustancias prohibidas en producción animal con destino de alimentación humana, se consideran criterios muy exigentes debido a que al tratarse de análisis que tienen consecuencias en la salud humana, legales y económicas para el productor se exige la mayor confianza en la generación del resultado. Otro aspecto a tener en cuenta es la toma de muestra que debe ser sencilla, rápida y en lo posible no involucrar procesos cruentos. Con estos criterios se decidió utilizar orina y materia fecal.

Se toman como base la legislación europea para la evaluación del desempeño del método analítico puesto que posee exigencias analíticas similares a los requerimientos establecidos por el SENASA, en Argentina.

A continuación, se presentan los materiales y métodos aplicados al desarrollo y evaluación del método analítico para orina y materia fecal.

Tabla 2. Moléculas consideradas para el desarrollo de los métodos de análisis.

Compuesto	Sinónimos	CAS	Fórmula	Estructura	Masa (g/mol)	Metabolitos	Fragmentos (m/z)	Eliminación
Ostarina	(S)-3-(4-Cianofenoxi)-N-[4-ciano-3-(trifluorometil)fenil]-2-hidroxi-2-metilpropionamida S22, MK-2866 ENOBOSARM GTx	841205-47-8	C ₁₉ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₃		389,33	defenilación Hidroxilación Con/sin glucuronidación Sulfonación carboxilación	<u>lones (± 0,5)</u> : 388,1; 118,1; 184,9; 241,1; 269,1	t _{1/2} orina= 4hs hasta 6 días t _{1/2} plasma= 1,4hs hasta 16,3h
Andarina	(S)-3-(4-Acetilaminofenoxi)-2-hidroxi-2-metil-N-(4-nitro-3-trifluorometilfenil) propionamida S4	401900-40-1	C ₁₉ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₆		441,36	O-defenilación	<u>lones (± 0,5)</u> : 440,0; 150,1; 205,0; 261,1; 289,1	t _{1/2} plasma= 2,6 h hasta 5,3hs
Bicalutamida <i>Casodex</i> ®	N-[4-Cyano-3-(trifluorometil)fenil]-3-[(4-fluorofenil)sulfonyl]-2-hidroxi-2-metilpropionamida	90357-06-5	C ₁₈ H ₁₄ F ₄ N ₂ O ₄ S		430,37	Glucuronidación Defenilación Hidroxilación	<u>lones (± 0,5)</u> : 428,9; 185,1; 255,1	t _{1/2} plasma= 1 semanaaprox. (ratas 1 día, caninos/humanos 6-7 días)
Flutamida <i>Flucinom</i>	2-Metil-N-(4-nitro-3-[trifluorometil]fenil) Propionamida	13311-84-7	C ₁₁ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₃		276,21	2-hidroxi-flutamida	<u>lones (± 0,5)</u> : 275,1; 229,1; 205,0; 202,0; 186,0 <u>2OH lones (± 0,5)</u> : 291,1; 205,0; 175,0; 159,0; 155,0	-Flutamida: variable -2-hidroxi-flutamida: t _{1/2} plasma= 5,2hs
Arilpropionamidas	X	X	X		X	<u>lones (± 0,5)</u> : 289 ; 261 ; 241 ; 205	x	

Tabla 3. Métodos considerados para el análisis de SARMs derivados de APA en orina.

Compuesto	Protocolo	
Enobosarm [49]	<p>LLE</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 ml de orina + ISTD (Bicalutamida) + Buffer Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (1: 2, v/v); (pH = 7) • Hidrólisis β-glucuronidasa 1 h (50 °C) + sulfatasa • Enfriar a Temp. Amb.+ 100 mg K₂CO₃/NaHCO₃ (2: 1, v/v) + vortex • Extracción head-over-head con 4 ml TBME 15min • Centrifugación 4000 x g 10 min + secar sobrenadante (40 °C) con N₂ • Agregado de STD APA (0,01 mg/l) a extractos blanco para curvas de calibración (<i>Matrix Match calibration</i>) • Evaporación a seco → 40 °C con N₂ → Reconstituir 250 µL H₂O /ACN 4: 1 (v/v), vortex 	<p>SPE</p> <ul style="list-style-type: none"> • 3 ml de orina + ISTD + 3 ml Buffer AA 0,25M, pH = 5 • Acondicionamiento 12 ml MeOH + 6 ml H₂O • Siembra de Muestra (strata-X) • Lavado 1° 6 ml MeOH/H₂O (4: 6, v/v) + 1 % AcH • Lavado 2° 6 ml MeOH/H₂O (2: 8, v/v) + 0,25 % NH₄⁺ • Elución 6 ml MeOH • Evaporación a seco → 40 °C con N₂ • Reconstituir 100 µL MeOH + 400 µL AF 20 mM
Enobosarm [66]	Centrifugación a 17 500 x g durante 5 min con recuperación del sobrenadante	
Enobosarm [65, 67]	<p>SPE</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 ml orina + ISTD → Acondicionamiento 2 ml MeOH + 2 ml H₂O → Siembra de muestra → Lavado 2 ml H₂O → Elución 2 ml MeOH → Evaporación a seco → Reconstituir el residuo con 100 µL MeOH /0,1 % AF 	
Andarina [68]	<p>Screening</p> <ul style="list-style-type: none"> • Orina descongelada (37 °C) • Centrifugación a 1350 x g (5 min) • <u>1ra alícuota</u>: 2 ml + ISTD (mefuside) → saturación con carbonato de potasio → extracción a pH básico/4 ml de acetato de etilo • <u>2da alícuota</u>: 2 ml + ISTD (mefuside) → saturación con NaH₂PO₄ → extracción a pH ácido/4 ml de acetato de etilo • Centrifugación a 1350 x g (5 min) → juntar fases orgánicas y evaporar • Reconstituir 125 µL de Buffer FA 10 mM pH 4/ACN (80/20) 	<p>Confirmación</p> <ul style="list-style-type: none"> • Orina descongelada (37 °C) • Centrifugación a 1350 x g (5 min) • 2 ml orina + ISTD (mefuside) + 1 ml Buffer fosfato 0,8 M pH 7 • Hidrólisis β-glucuronidasa a 50 °C (1 h) • + Buffer Na₂CO₃/NaHCO₃ → pH 8,5-9 • LLE con 5 ml TBME • Recuperar fase orgánica • Evaporación a seco → con flujo de aire (50 °C) • Reconstituir 125 µL Buffer FA 10 mM pH = 4/ACN (80/20)
Andarina [69]	<ul style="list-style-type: none"> • 3 ml orina (Hidrólisis : 1 ml buffer fosfato pH = 7 + 30 µL glucuronidasa (1 h) a 56 °C) → Enfriar a temp. Amb. + NaHCO₃/K₂CO₃ (2 : 1) → LLE con 5 ml dietil éter → Centrifugación y evaporación de la fase orgánica → Reconstituir 100 µL MeOH/H₂O (30/70) 	

STD: estándar; **ISTD:** estándar interno; **LLE:** extracción líquido: líquido; **SPE:** extracción en fase sólida; **TBME:** Metil t-butil éter; **AA:** acetato de amonio; **AF:** ácido fórmico; **AcH:** ácido acético; **FA:** formiato de amonio.

Tabla 4. Protocolos considerados para el análisis de SARMs derivados de APA en heces.

Compuesto	Protocolo
Acetotiolutamida [70]	Heces (6-10,5 g) + 10 ml de agua → homogeneizador mecánico → Extraer tres veces con MeOH/AE 2: 1 (v/v) → Juntar la fase líquida de cada extracción y evaporar a baja presión → Reconstituir con MeOH y filtrar 300 µl en membrana (0,45 µm).
Andarina [71]	<ul style="list-style-type: none"> • Heces con el doble de su volumen con agua → homogeneizador mecánico → Congelar a -20 °C → Descongelar, centrifugar 3000 x g (10 min) + ISTD → Filtrar el sobrenadante (filtro de 0,22 µm) → Inyectar 20 µl en HPLC/MS • Extraer x 4 (la fase sólida AE/MeOH 2: 1 (v/v)) → centrifugar 3000 x g (10 min) → Mezclar y evaporar los sobrenadantes bajo N₂ → Reconstituir con 500 µl de MeOH/ agua, 1: 1 (v/v) → Filtrar el sobrenadante (filtro de 0,22 µm) → Inyectar 20 µL en HPLC/MS
SARM LY2452473 [72]	Heces: 3 x Extracción con 5 volúmenes de ACN/AA 10 mM (1: 1, v: v) → Evaporar y luego reconstituir los extractos con MeOH/AA 10 mM (1: 2, v: v).
S-26 [73]	Heces: 3x extracción con 10 ml de MeOH/AE 2: 1, (v/v) → Mezclar y evaporar las fases líquidas → Diluir el residuo semisólido con MeOH.
Enobosarm [66]	Homogeneizar heces en tres veces su volumen de agua → Extracción: 5 g de heces 2 x (15 ml de ACN → Vórtex 2 min → Centrifugar a 1400 x g, 10 min) → Mezclar el sobrenadante y evaporar a 20 °C con N ₂ → Reconstituir en 1 ml de ACN/agua (1: 1, v/v) → Centrifugar a 17500 x g, 5 min
Bicalutamida [31]	Extracción de heces homogeneizadas (5-10g) con ACN (30 ml) → Evaporar a sequedad a presión reducida → Reconstituir con 1 ml MeOH → Análisis por TLC
Bicalutamida [30]	Extracción de heces homogeneizadas (5g) con 3-6 volúmenes de MeOH → Evaporar a sequedad a presión reducida → Reconstituir con 1-2 ml MeOH → Análisis por TLC

MeOH: Metanol; **AE:** Acetato de etilo; **ACN:** Acetonitrilo; **AA:** Acetato de Amonio; **ISTD:** Internal Standard (estándar interno); **TLC:** Thin Layer Chromatography (cromatografía en capa delgada).

Tabla 5. Protocolos considerados para el análisis de SARMs derivados de APA en sangre.

Compuesto	Protocolo
Bicalutamida [74]	• 50 µL Plasma + 950µL MeOH (ISTD) → Agitar 30" → Centrifugar 14000 rpm (5 min) → 50 µL sobrenadante + 950 µL ACN al 70% → Agitar 30"
Ostarina [66]	• 3 x Extracciones: Plasma + 3 volúmenes de ACN → Separar y mezclar los 3 sobrenadantes → Evaporar a sequedad a 20 °C y N ₂ → Se reconstituye en 0,7-0,9 ml de H ₂ O: ACN (1+1) → Centrifugar 17500 x g (5 min)
Andarina [75]	• Plasma + ACN (ISTD) en igual volumen de plasma → 16000 g x 30 min (4 °C) → Recuperación de sobrenadante
S-1 [76]	• 100 µL Plasma + 30ul ISTD + 1 ml ACN → Centrifugar 16100 x g (10 min) → sobrenadante + 1 ml agua + 7,5 ml AE → agitar 10 min → Centrifugar 1540 x g (10 min) → Evaporar la fase orgánica a sequedad con N ₂ → Reconstituir en 150 µL de H ₂ O: ACN (1+1) → Centrifugar 16100 x g (10 min)
Bicalutamida [77]	• 50 µL Plasma + 200 µL ACN (ISTD) → Agitar 15" → Centrifugar 14000 x g (10 min) → Recuperar sobrenadante
Andarina [71]	• 500 µL Plasma + ISTD + 1 ml ACN → Centrifugar 2000 x g (5 min) → + 7 ml AE agitar 40 min → Centrifugar 2000 x g (5 min) → Evaporar la fase orgánica a sequedad con N ₂ → Reconstituir en 100 µL ACN: Agua (35: 65 v/v)
Hidroxiplutamida [78]	• 200 µL Plasma + 20 µL MeOH (ISTD) + 20 µL MeOH → Vortex → + 600 µL MeOH → Vortex (60") → Centrifugar 1200 rpm (5 min) → Recuperar sobrenadante

MeOH: Metanol; **AE:** Acetato de etilo; **ACN:** Acetonitrilo; **ISTD:** Internal Standard (estándar interno)

Tabla 6. Condiciones cromatográficas utilizadas en otros estudios de SARMs derivados de APA.

Compuestos	Condiciones cromatográficas	
Ostarina [49]	Columna BEH C18 (150x2,1 mm; 1,7 μ m), (50 °C) V_{inj} = 5 μ L Flujo 0,2 ml/min - <u>Grad.</u> : A= H ₂ O + AF 5 mM; B= ACN+AF 5 mM 10 % B entre 0 y 1 min \rightarrow hasta 100 % en 15 min \rightarrow mantiene (2 min) \rightarrow 100 % a 10 % B en 1min \rightarrow 10 % B (8 min) = 28 min	Columna BEH C18 (100x2,1mm; 1,7 μ m) (50 °C) – V_{inj} = 5 μ L Flujo 0,6 ml/min (<u>Split 1: 1 al MSD</u>) - <u>Grad.</u> : A= H ₂ O; B= ACN 0 % B entre 0-0,3min \rightarrow hasta 20 % B entre 0,3-1min \rightarrow hasta 70%B entre 1-5 min \rightarrow hasta 100 % B entre 5-5.5min \rightarrow 100 % B (1min) \rightarrow 100% a 10 % B en 0.5min \rightarrow 0 % B (2min) = 9 min
Ostarina [66]	Columna Sepax C18 (250x4,6 mm; 5 μ m) – Flujo 0,8 ml/min – <u>Grad.</u> : A= H ₂ O+AF 0,1% (ESI +) /A= H ₂ O + AF 0,1% (ESI -) + FA 20 mM B= ACN + AF 0,1% – 10 % a 80 % B en 20min \rightarrow 90 % B en 1min \rightarrow mantiene (4min) \rightarrow 10% B en 8min	
Ostarina [67]	Columna Kinetics Phenomenex (100x2,1 mm; 2,7 μ m) – Flujo 0,2 ml/min – <u>Grad.</u> : A= H ₂ O+AA 5 mM – pH = 3,5; B= ACN 5 % a 100 % B en 12min \rightarrow mantiene (2min)	
Andarina [68]	Columna Sunfire C8 (100x2,1 mm; 3,5 μ m) con Filtro (0,2 μ m) – Flujo 0,35 ml/min (25 °C); Vol. Inyección= 10 μ L <u>Grad.</u> : A= H ₂ O+FA 10mM pH=4; B= ACN; 5 %B (0 a 0,75 min) \rightarrow hasta 80 % en 4,25 min \rightarrow mantiene (1min) \rightarrow 5 % B en 1,5 min	
Andarina [69]	Columna BEH C18 (100x2,1 mm; 1,7 μ m) – Precolumna BEH C18 (50x2,1 mm; 1,7 μ m) (30 °C) – Flujo 0,4 ml/min; Vol. Inyección= 10 μ L <u>Grad.</u> : A= H ₂ O + FA 0,1 %; B= ACN + FA 0,1 % 5 % a 40 % B en 15min \rightarrow 95% en 2min \rightarrow 5 % B en 3min	
SARMs derivados de APA [65, 67]	Columna monolithique RP C18(100x 3 μ m) Vol. Inyección= 50 μ L <u>Grad.</u> : A= H ₂ O ; B= MeOH;30% a 90% de B en 10min con Flujo de 0,9 ml/min	
Hidroxiplutamida [78]	Columna Ultimate C18 (50x2,1 mm; 5 μ m) (30 °C) - Pre-Columna Phenomenex C18 (4x3,0 mm; 5 μ m) - Flujo 0,2 ml/min; Vol. Inyección= 5 μ L <u>Mantiene</u> : H ₂ O/ACN 2: 1 (v/v) 4min	

V_{inj} : volúmen inyectado; **ESI**: electrospray ionization; **AA**: acetato de amonio; **AF**: ácido fórmico; **FA**: formiato de amonio; **MeOH**: Metanol; **ACN**: Acetonitrilo; **MSD**: Mass Spectrometer Detector.

Tabla 7. Parámetros de detectores de espectrometría de masas utilizados en estudios.

SARMs	Condiciones de MS	
Ostarina [49]	MicroTof-Q y Triple Cuadrupolo Full scanESI (-/+) y SRM MS/MS; Volt.Capilar 2,5 kV; Source 120 °C; Desolvat. 450 °C; Gas de Cono 450 l/h; Gas de Desolvat. 150 l/h; Gas CID: argon 2,2.10 ⁻³ mbar	
Ostarina [66]	LTQ	
	ESI (-): sheath gas 50 u; Spray 3,2 kV; Volt.Capilar -35V (300 °C) Lens tube -65V	ESI (+) (glucurónidos) sheath gas 50 u; Spray 3,2kV; Volt.Capilar 35V (300 °C) Lens tube 65V
Ostarina [67]	QTrap MS/MS ESI (-) Source 350 °C, -4 kV; Ionisation -3 kV; Volt.Capilar 290 °C; Full scan m/z 50 - 2000; Resolución 50000; Full scan 50 - 2000 m/z; Resolución 25000; HCD 20 V; Full scan 50 - 2000 m/z; Resolución 25000; HCD 40 V	
Andarina [68]	Screening: TSQ ESI (-) Colis. offset volt.: 20 V; Q1 y Q3 en 0,7 amu mass resolución Volt. Capilar 320 °C; spray 3 kV; Lens/tube 110 V; Q2 Gas Colis.: argon 0,2 Pa	
Andarina [69]	QTOF-MS ESI (-); m/z 100 - 1000: Desolvat. Gas 850 l/h (360°C); Volt.Capilar 2,4 kV; Cono 40 V; Micro-channel plates 1750 V Source 120 °C; Gas de Cono 10 l/h; Gas Colis. 0,25 ml/min	
SARMs derivados de APA [65, 67]	LTQ orbitrap APCI (+) full scan 100 - 500 m/z; tps scan: 1s; Tension decharge 5 kV; Desolvat. 300 °C; Cono 30 V; Gas Nebul. (N ₂): 1 l/min; Resolución 60000 FWHM	
Hidroxi flutamida [78]	Q Trap ESI (-): -4200/-4500 V; Full scan m/z 70 – 1000; Source 275 – 350 °C; Gas Colis.: (N ₂) 6,10 ⁻³ Pa	

Soluciones y Reactivos

Reactivos

Metanol, Etanol y Acetonitrilo fueron comprados en Fisher Scientific (Pittsburgh, USA). Agua de grado ultra-pura ($> 18,4 \text{ M}\Omega/\text{cm}$) fue obtenida de un sistema de purificación. Ácido fórmico fue comprado en Sigma Aldrich. Enzima extraída de *Helix pomatia* con actividad β -glucuronidasa / arilsulfatasa (EC3.2.1.31 + EC3.1.6.1) estabilizada en solución acuosa y acetato de amonio fueron comprados en Merck (Darmstadt, Germany).

Patrones de Enobosarm, Andarina, Bicalutamida e Hidroxiflutamida fueron comprados en Sigma Aldrich (Saint-Louis, USA). Cartuchos de extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction, SPE) Oasis[®] HLB (3cc, 60 mg, 30 μm) fueron adquiridos en Waters (Milford, USA).

Preparación de soluciones estándares

Soluciones madres de cada SARM fueron preparadas gravimétricamente en etanol de forma individual con una concentración de 1 mg/ml. Luego se realizaron diluciones y mezclas de las soluciones madres (Enobosarm, Andarina, Bicalutamida e Hidroxiflutamida) para obtener otras Soluciones estándares de trabajo de concentraciones adecuadas para los ensayos (1 ng/ml – 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Estándar Interno

La solución madre de Bicalutamida-D4 se utilizó como estándar interno (internal standard, ISTD). Todas las soluciones estándares fueron almacenadas a -20°C .

Instrumentación 1° Ensayo con animales (LabERCA, ONIRIS)

El sistema cromatográfico utilizado fue Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) con una columna Acquity UPLC[®] BEH (2,1 x 100 mm; 1,7 μm) y una fase móvil (0,6 ml/min) compuesta por un gradiente de solución A (agua con ácido fórmico al 0,1%) y solución B (acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1%). Para el análisis de espectrometría de masas se empleó un detector equipado con ionización electrospray y analizador de triple cuadrupolo (XEVO TQ-S, Waters, Milford, MA, USA). Para la adquisición y manejo de los datos cromatográficos y

espectrométricos fue utilizado MassLynx 4.0 software (Waters, Milford, MA, USA) (ver Anexo I; pág. 156).

Preparación de las muestras

Los métodos de análisis aplicados para el estudio de Anadarina, Enobosarm, Bicalutamida y Hidroxiflutamida se basaron en trabajos previos realizados en el Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments [14, 24] y otros resumidos en las Tabla 3, Tabla 4 y Tabla 5. El fundamento del protocolo para orina es una *extracción en fase sólida* (SPE, solid phase extraction) y para materia fecal se aplica una combinación de *extracción líquida-líquida* (LLE, liquid-liquid extraction) seguida de una SPE (Anexo II pág.163).

Por otra parte, para poder estudiar las drogas que pudieran estar conjugadas (*glucuronidos o sulfatos*) también se añadió una etapa de hidrólisis (Anexo III; pág. 168).

Evaluación del método

La metodología aplicada fue evaluada por parámetros, obtenidos del marco legal europeo referido al funcionamiento de métodos analíticos aplicables al control de alimentos (Decisión 2002/657/EC). Los ensayos realizados tuvieron como propósito determinar *selectividad, linealidad, exactitud, precisión y sensibilidad*.

Muestras blanco de animales control (no tratados) fueron empleadas para la construcción de *curvas de calibración* y también usadas para el *ensayo de recuperación* (ver *Exactitud*, pág. siguiente). Las *muestras blanco* recibieron la adición de diferentes cantidades de soluciones estándares y luego fueron procesadas junto a las muestras de animales tratados.

Las *curvas de calibración* se construyeron para cada analito usando la señal (*S*) relación de áreas de cada analito con el estándar interno ($S = \frac{\text{Área}_{\text{Analito}}}{\text{Área}_{\text{STD}}}$) en función de su concentración. Se realizaron diferentes curvas de calibración para cubrir los siguientes rangos: 0,25 – 30 ng/ml para orina y 0,5 – 1600 ng/g para heces (ver Anexo IV; pág. 172).

La concentración ($C_{Analito}$) se calculó por interpolación según:

$$C_{analito} = \frac{(S - b)}{a}$$

Donde S : señal; b : ordenada al origen de la ecuación correspondiente a la regresión lineal del analito y a : pendiente de la ecuación correspondiente a la regresión lineal del analito.

Linealidad: la linealidad fue evaluada en términos de coeficiente de determinación (r^2) obtenido de curvas de calibración construidas.

Exactitud: como no se encuentra disponible ninguna prueba de interlaboratorio para estas sustancias, se evaluó como recuperación porcentual ($R\%$). La $R\%$ del método fue calculada para cada analito a distintos niveles de concentración. Las $R\%$ se calcularon entre 0,25 – 30 ng/ml para orina y para heces: 0,5 – 1600ng/g. Para este propósito se utilizaron como valores verdaderos (100%) curvas construidas con extractos de *muestras blanco* con adición de cantidades conocidas soluciones estándares (*matrix matched calibration* [79, 80]) y se aplicó la siguiente fórmula:

$$R\% = \frac{C_{cal.}}{C_{con.}} \times 100$$

Donde $C_{cal.}$: concentración calculada; $C_{con.}$: concentración conocida (obtenida de agregar el analito al extracto).

Precisión: se evaluó como el Coeficiente de Variación (Relative Standard Deviation porcentual, RSD%) calculado del análisis realizado por triplicado de muestras fortificadas entre 0,25 – 30 ng/ml para orina y para heces: 0,5 – 1600ng/g.

$$RSD \% = (\text{Desvío Estándar}) / \text{Promedio} \times 100$$

Sensibilidad: fue determinada como el menor nivel de la curva de calibración que mostraba una relación señal/ruido mayor a 10 y una recuperación entre 70 – 120 %.

Selectividad: fue estudiada siguiendo los criterios de la legislación europea para la aplicación de cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas (HPLC-MS/MS), los cuales se basan en el tiempo de

retención relativos a un estándar interno (ISTD) y la tolerancia de abundancia relativa de iones (Tabla 8) en modo de *monitoreo de reacciones múltiples* (MRM).

Tabla 8. Tolerancias máximas permitidas para las abundancias relativas de iones.

Intensidad relativa de iones (%)	Tolerancia relativa (%)
>50	± 20
>20 -50	± 25
>10 -20	± 30
≤ 10	± 50

La selectividad también se comprobó observando ausencia de interferencias comparando muestras blanco y muestras fortificadas.

Estudio de metabolitos de Bicalutamida y Andarina con propósito de control en prácticas de producción animal

Una vez finalizada la etapa de desarrollo y evaluación del método analítico. El estudio del metabolismo se llevó a cabo a través de dos ensayos con animales que se describen a continuación (ver *Primer Ensayo animal*, pág. 67 y en *Segundo Ensayo animal*, pág. 69).

Primer Ensayo animal

Este ensayo se realizó para detectar Bicalutamida con los métodos desarrollados previamente, para orina y heces. Luego se continuó por la búsqueda de *metabolitos de conjugados*. Finalmente, se buscaron de otros metabolitos.

Administración de la dosis

En 10 ml de etanol fueron disueltos 100 mg de Bicalutamida (CASODEX®) y luego se añadió cuatro veces el volumen de jugo natural de manzana (comercial). La dosis diluida con jugo de manzana se administró al animal (Figura 12) con una jeringa de 50 ml por vía oral.

Muestreo

Este estudio de eliminación de Bicalutamida fue aprobado por el Comité Francés de Ética (Protocolo Nº 02323.01). Muestras de orina y heces fueron tomadas de un ternero saludable (raza: Montbeliard, peso: 190 kg, edad: 8,5 meses) antes y después de la administración oral de 100 mg Casodex[®] (día 0).

El muestreo inició 3 días antes de la administración de la droga y consistió en la toma de orina y heces de forma diaria hasta el día 7. El día 0 se tomaron muestras extras, a las 4 y a las 8 horas posteriores a la dosis. Las muestras fueron conservadas a - 20 °C hasta ser procesadas.

Metabolitos conjugados

Este estudio consistió en determinar la forma más conveniente de hidrolizar los conjugados (Glucurónidos, Sulfatos, etc.). Se estudiaron hidrólisis química e hidrólisis enzimática junto con pruebas de estabilidad de los analitos en condiciones de hidrólisis (ver Anexo III; pág. 168).



Figura 12. Ternero utilizado para el estudio de eliminación de Bicalutamida.

Raza: Montbeliard, peso: 190 kg, edad: 8,5 meses. Administración oral de 100 mg de Casodex[®] y toma de muestras de orina y heces.

Estudio de Metabolitos

El estudio de los metabolitos de Fase I se realizó mezclando extractos de matrices (orina y heces) provenientes de los días: 1; 3; 5 y 7.

La estrategia para este ensayo fue combinar la información obtenida de distintos modos Scan que permite el analizador de triple cuadrupolo (Precursor Ion Scan, Product Ion Scan, Neutral Losses Scan y Full Scan). Luego de postular metabolitos candidatos, se realizaron comprobaciones en modos de monitoreo

de las transiciones simples y múltiples (Multiple Reaction Monitoring, MRM; y Simple Reaction Monitoring, SRM) de forma de aportar mayor certeza a los metabolitos postulados.

Soluciones y Reactivos

En este primer ensayo con un animal se utilizó lo descrito en *Desarrollo de un método para el control del uso de SARM* (pág. 64) y se realizó en Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LaBERCA – Francia).

Instrumentación

En este primer ensayo con un animal se utilizó el cromatógrafo líquido descrito en el título anterior *Desarrollo de un método para el control del uso de SARM* (pág. 64) y se realizó en Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LaBERCA – Francia).

Preparación de las muestras

En este primer ensayo con un animal se aplicó el método desarrollado en *Desarrollo de un método para el control del uso de SARMS* (pág. 78) y se realizó en Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LaBERCA – Francia).

Segundo Ensayo animal (INTA – Anguil)

En este ensayo se trabajó con 3 porcinos, de raza *Chetapuy* (hembras) y 6 bovinos *Angus*, como se detalla en la Tabla 9. Los animales se encontraban en buen estado de salud y todo el ensayo se realizó bajo supervisión veterinaria. Los procedimientos de toma de muestras basados en el Manual de la OIE [81] fueron ejecutados por veterinarios de la Estación Experimental Agropecuaria Anguil (INTA Anguil).

Tabla 9. Administración de dosis orales realizadas en bovinos y porcinos.

CDX: Casodex[®]; AND: Andarina; CTR: control (sin dosis).

Caravana N°	Peso (kg)	Tratamiento	Dosis	Animal
379	320	CDX	50 mg durante 5 días	Novillo
421	340	CDX	200 mg	Novillo
404	336	CTR	-	Novillo
323	329	CTR	-	Novillo
326	306	CTR	-	Novillo
443	338	CDX	100 mg	Novillo
334	108	CDX	100	Porcino
330	103	AND	100	Porcino
329	95	CTR	-	Porcino

Figura 13. Novillos (Angus) tratados con dosis de Casodex[®].

Administración de las dosis

Cantidad suficiente de los fármacos fueron disueltos en etanol y luego se añadió cuatro veces el volumen de jugo natural de manzana comercial (Tabla 10). La dosis diluída con jugo de manzana fue administrada a cada animal (Figura 13) con jeringas de 50 ml.

En el caso del grupo control, se administró durante 5 días, 50 ml de la mezcla de etanol con jugo natural de manzana en la proporción 10 ml etanol + 40 ml de jugo de manzana.

Tabla 10. Detalles de la preparación de las dosis

CDX (mg)	AND (mg)	Etanol (ml)	Jugo de manzana (ml)
50	-	10	40
200	-	40	160
-	-	10	40
-	-	10	40
-	-	10	40
100	-	20	80
100	-	20	80
-	100	20	80

Tabla 11. Esquema del muestreo realizado.

Día	Novillos			Porcinos		
	Sangre	Heces	Orina	Sangre	Heces	Orina
-3	X	X	X	X	X	X
-2	X	X	X	X	X	X
-1	X	X	X	X	X	X
0	X	X	X	X	X	X
0,17	X	X	X	X	X	X
0,33	X	X	X	X	X	X
1	X	X	X	X	X	X
2	X	X	X	X	X	X
3	X	X	X	X	X	X
4	X	X	X	X	X	X
5	X	X	X	X	X	X
6	X	X	X	X	X	X
7	X	X	X	No	no	no
8	no	No	No	X	X	X
9	X	X	X	No	no	no
10	no	No	No	X	X	X
11	X	X	X	No	no	no

Muestreo

Muestras de orina, heces y sangre fueron tomadas antes y después de la administración de las dosis (día 0) como se muestra en la Tabla 11. A diferencia del primer ensayo con animales aquí se tomó sangre para la obtención de suero.

El muestreo inició 3 días antes de la administración de las dosis y consistió en la toma de orina y heces como se detalla en la Tabla 11. El día 0 se tomaron muestras extras, a las 4 y a las 8 horas posteriores a la administración de la dosis.

Las orinas y las heces fueron conservadas (- 20 °C) hasta el momento de ser procesadas. La sangre fue incubada a 25 ° C durante 1 hora, luego se centrifugó y finalmente se separó el suero que se almacenó a - 20 °C.

Soluciones y Reactivos

Metanol, Etanol y Acetonitrilo grado HPLC marca Fisher scientific (Pittsburgh, USA). Agua desionizada Ultrapura (> 18.4 MΩ/cm) se obtuvo con PureLab Classic purification system (Elga). Acido fórmico marca Sigma-Aldrich. β-Glucuronidase/Arylsulfatase (*Helix pomatia*) solución acuosa estabilizada (EC3.2.1.31+EC3.1.6.1) marca Roche y Acetato de amonio marca Sigma Aldrich.

Estándares analíticos de Andarina, Bicalutamida e Hidroxiflutamida marca Sigma Aldrich (Saint-Louis, USA). Cartuchos de extracción en fase sólida Oasis® HLB (3 cc, 60 mg, 30 μm) marca Waters (Milford, USA).

Preparación de soluciones estándares

Soluciones madres de cada SARM fueron preparadas gravimétricamente en etanol a una concentración de 1 mg/ml. Luego se realizaron diluciones y mezclas de las soluciones madres (Andarina, Bicalutamida e Hidroxiflutamida) para obtener otras Soluciones estándares de trabajo de concentraciones adecuadas para los ensayos.

Hidroxiflutamida fue utilizada como estándar interno (ISTD).

Preparación de las muestras

El método empleado en este ensayo para muestras de orina y heces es el descrito más adelante en *Desarrollo de un método para el control del uso de SARM* (pág. 78) y a continuación, se describe el análisis realizado en las muestras de suero.

Suero

Las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente. Se toma 100 µL de suero y se adiciona 50 µL del ISTD de 2,5 ng/ml (en agua: acetonitrilo, 7+3, con un 1 % de ácido fórmico) y 200 µL de Metanol: Acetonitrilo (1+3), para precipitar proteínas. La mezcla se centrifuga en tubos tipo Eppendorf durante 20 minutos a 19.000 x g. Se separa el sobrenadante límpido en un vial.

Instrumentación (INTA Castelar)

El sistema cromatográfico utilizado fue Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) con una columna C18 *XBridge* (2,1x100 mm; 3.5 µm) y una fase móvil (0,25ml/min) compuesta por un gradiente de solución A (agua con ácido fórmico al 0,1%) y solución B (acetonitrilo/metanol, 50 % v/v, con ácido fórmico al 0,1%). Para el análisis de espectrometría de masas se empleó un detector equipado con ionización electrospray y analizador de simple cuadrupolo (SQD, Waters, Milford, MA, USA). Para la adquisición y el manejo de los datos cromatográficos y espectrométricos fue utilizado MassLynx 4.0 software (Waters, Milford, MA, USA).

El gradiente aplicado consistió en 90 % de A (de 0-1min), 90 a 65 % de A (de 1 – 2min), de 65 a 45 % de A (de 2 – 11 min), de 45 a 0 % de A (de 11 – 11,5) y manteniendo en 0 % hasta el minuto 12,5, volviendo a la concentración inicial (de 12,5 a 13 min) y manteniendo 90 % A entre 13 - 15 min. El volumen de inyección fue 10µL. La temperatura de las muestras se mantuvo a 20 °C y la columna a 55 °C.

La fuente del detector (SQD) se mantuvo a 150 °C utilizando nitrógeno como gas de desolvatación (350 °C) a un flujo de 750 l/h. El voltaje del capilar fue -2,9 kV y para el estudio de los SARMs se trabajó en Modo SIM (Single Ion Monitoring) (Tabla18; pág. 105).

Tabla 12. Parámetros de Masa empleados para la determinación de analitos.

Iones y tiempos de retención (RT) utilizados para la identificación y cuantificación de Hidroxiflutamida, Andarina y Bicalutamida (Q) Ion de cuantificación, (q) Ion de cualificación.

RT (min)	Compuesto	Ion	Cono (V)
8,01	Hidroxiflutamida	291,1 (Q)	40
		205,0 (q)	
8,60	Andarina	261,0 (q)	40
		440,1 (Q)	
9,20	Bicalutamida	429,1 (q)	30
		255,1 (Q)	

Evaluación del método de cuantificación (2° ensayo)

La metodología aplicada fue evaluada por parámetros objetivos. Los parámetros evaluados fueron *selectividad*, *linealidad*, *exactitud*, *precisión* y *sensibilidad*.

Muestras blanco (de animales no tratados) fueron elaboradas mezclando suero proveniente de varios animales de las dos especies, conformando un pool de muestras blanco que se fraccionó según la necesidad. Luego fueron adicionadas con diferentes cantidades de soluciones estándar y finalmente se procesaron según los métodos descritos anteriormente.

Las curvas de calibración se construyeron para cada analito usando la señal (S) relación de áreas de cada analito con el estándar interno ($S = \frac{\text{Área}_{\text{Analito}}}{\text{Área}_{\text{STD}}}$) en función de su concentración. Se realizaron diferentes curvas de calibración para cubrir los siguientes rangos: para orina 0,5 – 200 ng/ml, heces 2 – 3500 ng/g y para suero 2 – 3000 ng/ml.

La concentración ($C_{Analito}$) se calculó por interpolación según:

$$C_{analito} = \frac{(S - b)}{a}$$

Donde S : señal; b : ordenada al origen de la ecuación correspondiente a la regresión lineal del analito y a : pendiente de la ecuación correspondiente a la regresión lineal del analito.

Linealidad: la linealidad fue evaluada en términos de coeficiente de determinación (r^2) obtenido de curvas de calibración construidas.

Exactitud: como no se encuentra disponible ninguna prueba interlaboratorio para estas sustancias, se evaluó como recuperación porcentual ($R\%$). La $R\%$ del método fue calculada para cada analito en distintos niveles de concentración: para orina 0,5 – 200 ng/ml, heces 2 – 3500 ng/g y para suero 2 – 3000 ng/ml. Para este propósito se utilizaron como valores verdaderos (100%) curvas construidas con *extractos de muestras blanco* con adición de cantidades conocidas soluciones estándares (*matrix matched calibration*[79, 80]) y se aplicó la siguiente fórmula:

$$R\% = \frac{C_{cal.}}{C_{con.}} \times 100$$

Donde $C_{cal.}$: concentración calculada; $C_{con.}$: concentración conocida (obtenida de agregar el analito al extracto).

Precisión: se evaluó como el Coeficiente de Variación (Relative Standard Deviation, RSD%) calculado del análisis realizado en diferentes días y con diferentes analistas de muestras fortificadas a 0,25; 0,5; 1; 3 y 10 ng/ml para orina mientras que para suero y heces se trabajó a 1; 2; 5; 10 y 20 ppb (suero: ng/ml y para heces: ng/g).

Para ello se evaluaron variaciones inter-ensayos e intra-ensayo, según:

Fuentes de variación	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad (v)
Entre-ensayo (SS_b)	$SS_b = SS_t - SS_w$	$v_b = p-1$
Intra-ensayo (SS_w)	$SS_w = \sum v_i s_i^2$	$v_w = p(n-1)$
Total (SS_t)	$SS_t = \sum v_i s_i^2$	$v_t = pn-1$

Cuadrado Medio (MS)	SD	RSD%
$MS_b = SS_b / v_b$	$\sqrt{MS_b}$	SD*100/promedio
$MS_w = SS_w / v_w$	$\sqrt{MS_w}$	SD*100/promedio

Donde p : número de días y n : número de analistas; s_w , s_b and s_t las desviaciones estándares entre-grupos, dentro-grupos y total respectivamente.

Sensibilidad: fue determinada como el menor nivel de la curva de calibración que mostraba una señal/ruido mayor que 3 y una recuperación entre 70 – 120 %.

Selectividad: la identificación de los compuestos se basó en 2 criterios: tiempo de retención relativo y la tolerancia de abundancia relativa de los iones (Tabla 8; pág. 67).

La selectividad también se comprobó observando ausencia de interferencias comparando muestras blanco y muestras fortificadas.

Estudio de metabolitos

El segundo ensayo con animales el estudio de metabolitos de Bicalutamida y Andarina se realizó en 2 etapas: análisis de muestras en modo SCAN y confirmación por modo MRM.

Con el fin de evitar posibles pérdidas de metabolitos durante una extracción, el análisis de metabolitos se realizó en orina y materia fecal con los métodos descritos a continuación. Estas técnicas se basaron en trabajos previos [74] [66] [76] [75] [77] [71] [78] y consisten básicamente en *dilución*, separación de sólidos por centrifugación y análisis por UPLC-Ms/Ms.

Método Simplificado para Orina

A 5 ml de orina descongelada se le agregan 2,5 ml de una solución de metanol: acetonitrilo (50: 50, v/v) con un 0,1 % de formiato de amonio. Luego se centrifugan durante 20 minutos a 19000 x g. El sobrenadante es transferido a un vial.

Método Simplificado para Heces

A 1 g de materia fecal liofilizada se le agregan 1 ml de solución acuosa de formiato de amonio 0,1 % y 2 ml de de una solución de metanol: acetonitrilo

(50: 50, v/v). Luego se centrifugan durante 20 minutos a 19000 x g. El sobrenadante es transferido a un vial.

ESTUDIO DE LAS CONCENTRACIONES DE METABOLITOS SARMs (INTA – Concordia)

La cuantificación y estudio de las concentraciones de excreción de metabolitos se realizó con los métodos indicados durante el primer ensayo con animales (ver Figura 14 y Figura 15).

Instrumentación

Esta etapa del trabajo se llevó a cabo con la colaboración del personal y el equipamiento del Laboratorio de INTA – Concordia (Entre Ríos, Argentina).

El sistema cromatográfico utilizado fue Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) con una columna Acquity UPLC® BEH (2.1x100 mm; 1.7 µm) y una fase móvil (0,45 ml/min) compuesta por un gradiente de solución A (agua con ácido fórmico al 0,1 %) y solución B (acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 %). Para el análisis de espectrometría de masas se empleó un detector equipado con ionización electrospray y analizador de triple cuadrupolo (XEVO TQ-D, Waters, Milford, MA, USA). Para la adquisición y manejo de los datos cromatográficos y espectrométricos fue utilizado MassLynx 4.0 software (Waters, Milford, MA, USA).

Resultados y discusión

Desarrollo de un método para el control del uso de SARMs

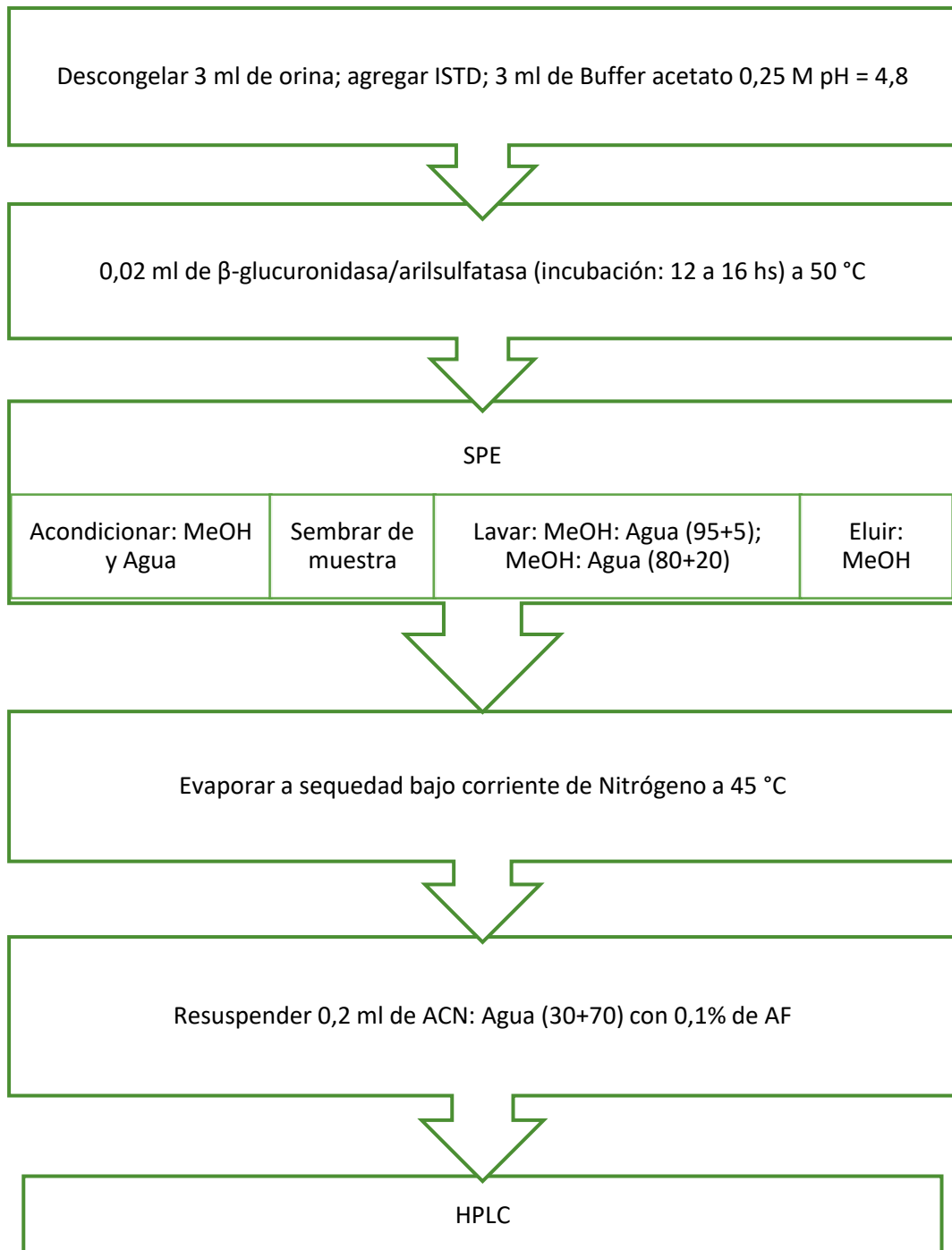
Orinas

Las muestras fueron descongeladas ajustando el pH de 3 ml de orina a 5 con el agregado de 3 ml de buffer acetato de amonio 0,25 M. Los cartuchos de extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction, SPE) fueron acondicionados con metanol y agua. La muestra fue sembrada en el cartucho y luego fue lavado con 2 soluciones de agua:metanol (95+5 y 80+20). Los analitos fueron eluidos del cartucho de SPE con metanol y luego se evaporó el eluido bajo corriente de nitrógeno a 45 °C. Finalmente el residuo fue reconstituido con 0,2 ml de una solución 70+30 (v/v) de agua: acetonitrilo con ác. fórmico 0,1 %.

Estudio de los metabolitos de FASE II por hidrólisis enzimática (Anexo III; pág. 168): las muestras de orina con agregado de buffer acetato de amonio y suspensión acuosa de enzimas extraídas de *Helix pomatia* con actividad β -glucuronidasa/arilsulfatasa, fueron incubadas durante la noche (12 a 16 horas) a 50 °C. A continuación, el método de extracción con SPE fue aplicado como se describió anteriormente (Figura 14).

Figura 14. Método desarrollado para orinas.

El agregado de la enzima β -glucuronidasa/arilsulfatasa sólo se realiza para estudiar los metabolitos de conjugados.



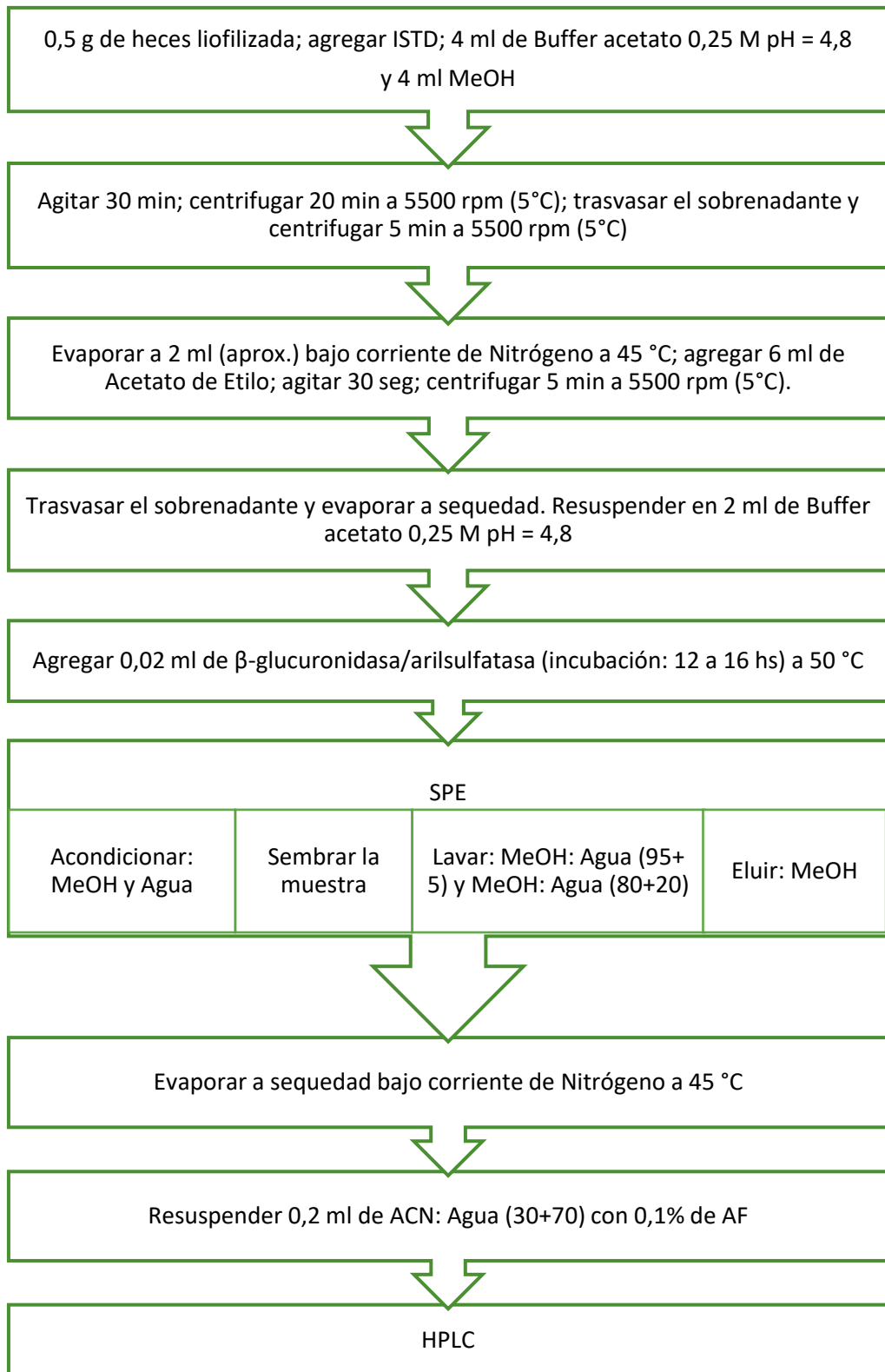
Heces

Las muestras de materia fecal (0,5 g), previamente liofilizadas (ver Anexo II, pág. 163), se acondicionaron con 4 ml de buffer acetato de amonio (0,25 M; pH 4,8) y 4 ml de metanol. Se agitaron, luego se centrifugaron y el sobrenadante fue centrifugado nuevamente. La fase líquida fue evaporada a 2 ml bajo corriente de nitrógeno a 45 °C. Se añadió Acetato de etilo (6 ml); la mezcla fue agitada y centrifugada. El sobrenadante fue evaporado a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 45 °C y los residuos fueron resuspendidos en 2 ml de buffer acetato de amonio (0,25 M; pH 4,8). La muestra fue sembrada en el cartucho y luego fue lavado con mezclas agua: metanol (95+5 y 80+20). Los analitos fueron eluidos del cartucho de SPE con metanol y luego se evaporó el eluido bajo corriente de nitrógeno a 45 °C. Finalmente, el residuo reconstituido con 0,2 ml de una solución 70+30 (v/v) de agua: acetonitrilo con ác. fórmico 0,1 % fue filtrado 30 minutos a 17000 x g con una membrana de polietersulfona para centrífuga (10K).

Estudio de los *metabolitos conjugados* por hidrólisis enzimática: a 0,5 g de muestras liofilizadas se añadieron 4 ml de buffer acetato de amonio (0,25 M; pH 4,8) y 4 ml de metanol. Se agitaron, luego se centrifugaron y el sobrenadante fue centrifugado nuevamente. La fase líquida fue evaporada a 2 ml bajo corriente de nitrógeno a 45 °C. Se añadió Acetato de etilo (6 ml), la mezcla fue agitada y centrifugada. El sobrenadante fue evaporado a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 45 °C, los residuos fueron resuspendidos en 2 ml de buffer acetato de amonio (0,25 M; pH 4,8) y se añadió suspensión acuosa de enzimas extraídas de *Helix pomatia* con actividad β -glucuronidasa y arilsulfatasa, fueron incubadas durante la noche (12 a 16 horas) a 50 °C. A continuación, fue aplicado el método SPE como se describió anteriormente (Figura 15).

Figura 15. Método desarrollado para heces.

El agregado de la enzima β -glucuronidasa/arilsulfatasa sólo se realiza para estudiar los metabolitos de conjugados.



Evaluación de la performance del método

Las características cromatográficas del sistema instrumental utilizado se encuentran resumidas en el Anexo I (pág. 156). La Tabla 13 presenta los tiempos de retención, las transiciones empleadas para la identificación y la cuantificación de cada analito, incluyendo el estándar interno (ISTD).

Tabla 13. Parámetros usados para identificación y cuantificación de SARMs.

Enobosarm, Andarina, Bicalutamida, Bicalutamida-D4 y Hidroxiflutamida, (Q) Transiciones de cuantificación, (q) transiciones de calificación

RT (min)	Analito	Transiciones	Cono (V)	Colisión (eV)
2,81	Hidroxiflutamida	291,1>205,0 (Q)	40	24
		291,1>175,0 (q)		32
		291,1>155,0 (q)		36
3,02	Andarina	440,1>150,0 (Q)	40	26
		440,1>261,0 (q)		18
		440,1>205,0 (q)		32
3,44	Bicalutamida- D4	433,1 > 255,0 (Q)	30	16
		433,1 > 185,0 (q)		44
		433,1 > 177,0 (q)		24
3,46	Bicalutamida	429,1 > 255,1 (Q)	30	16
		429,1 > 185,0 (q)		44
		429,1 > 173,0 (q)		24
3,96	Ostarina	388,1>118,0 (Q)	30	18
		388,1>269,0 (q)		18
		388,1>185,0 (q)		38

En esta primera etapa del trabajo, se evaluó el método usando muestras blanco (de animales no tratados) a las cuales se les añadió cantidades conocidas de soluciones estándar. La Tabla 14 resume los resultados de los parámetros estudiados y el Anexo IV(pág. 172) muestra el detalle de los parámetros calculados con sus respectivas tablas de datos.

Los datos de la Tabla 14 muestran un adecuado desempeño del método ($120\% > R\% > 70\%$; $r^2 > 0,99$; $RSD\% < 20\%$) en el rango de concentraciones estudiados 0,25 – 30 ng/ml para orina y 0,5 – 1600 ng/g para heces (Decisión 2002/657/EC). Para evaluar la exactitud de los métodos se empleó la recuperación debido a que no hay pruebas interlaboratorio para este grupo de sustancias [49, 56].

Tabla 14. Parámetros obtenidos para la evaluación del método.

Orina				
	Hidroxiflutamida	Enobosarm	Bicalutamida	Andarina
A	1,4176	0,9815	0,9604	0,3593
B	0,1774	0,0859	0,1529	0,0471
r²	0,998 ± 0,002	0,998 ± 0,002	0,999 ± 0,007	0,999 ± 0,006
RSD (%)	0,6 - 11,6	2,4 - 7,1	1,8 - 6,6	4,4 - 17,9
R%	97 - 118	73 - 118	95 - 111	71 - 107

Heces				
	Hidroxiflutamida	Enobosarm	Bicalutamida	Andarina
A	0,7532	0,5833	0,6086	0,2108
B	0,7926	0,3069	0,4191	0,1650
r²	0,996 ± 0,003	0,993 ± 0,005	0,996 ± 0,003	0,996 ± 0,002
RSD (%)	1,6 - 10,9	2,8 - 13,9	1,6 - 10,9	0,6 - 18
R%	88 - 115	85 - 117	83 - 109	74 - 108

La sensibilidad expresada como límite de cuantificación (limit of quantification, LQ o LOQ) fue de 0,25 ng/ml para orina y 0,5 ng/g para heces. Estos niveles de concentración son adecuados, tomando en cuenta que la recomendación europea (CRL Guidance Paper 2007) para sustancias anabolizantes esteroideas en orina es de 0,5 ng/ml [49]. En el caso de materia fecal, no existen recomendaciones [49] para anabolizantes esteroideos.

La Figura 16 presenta cromatogramas que muestran la sensibilidad a bajas concentraciones, la especificidad y la selectividad logradas por el método. Se puede observar la ausencia de interferencias (picos) en las muestras blanco y también una muy buena señal a las concentraciones mas bajas ensayadas. Estos cromatogramas nos muestran que aplicando el método desarrollado se eliminan interferencias provenientes de orina y materia fecal del bovino.

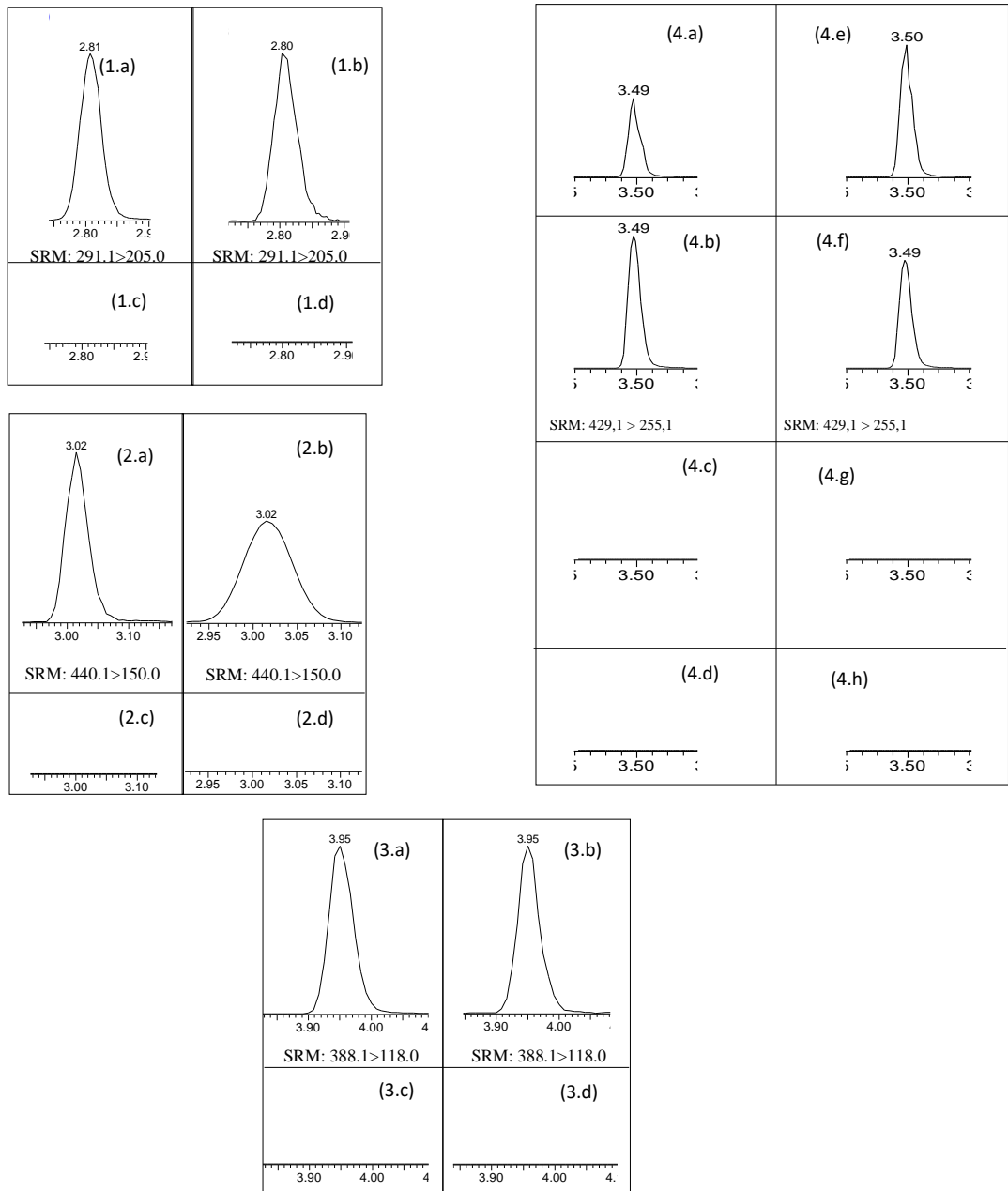


Figura 16. Cromatogramas SRM para cuantificación de SARMs.

(1.a) Extracto de orina blanco con agregado de Hidroxiflutamida (0,25ng/ml); (1.b) Extracto de heces blanco con agregado de Hidroxiflutamida (0,5ng/g); (1.c) Extracto de orina blanco; (1.d) Extracto de heces blanco; (2.a) Extracto de orina blanco con agregado de Andarina (0,25ng/ml); (2.b) Extracto de heces blanco con agregado de Andarina (0,5ng/g); (2.a) Extracto de orina blanco; (2.d) Extracto de heces blanco; (3.a) Extracto de orina blanco con agregado de Enobosarm (0,25ng/ml); (3.b) Extracto de heces blanco con agregado de Enobosarm (0,5ng/g); (3.c) Extracto de orina blanco; (3.d) Extracto de heces blanco; (4.a) Extracto de orina del ternero tratado, luego de la administración de Casodex (día 1); (4.b) Extracto de orina blanco con agregado de Bicalutamida; (4.c) Extracto de orina blanco; (4.d) Extracto de orina del ternero tratado, antes de la administración de Casodex (día -3); (4.e) Extracto de orina del ternero tratado, luego de la administración de Casodex (día 1); (4.f) Extracto de orina blanco con agregado de Bicalutamida; (4.g) Extracto de orina blanco; (4.h) Extracto de orina del ternero tratado, antes de la administración de Casodex (día -3).

Conclusiones Parciales:

- Se desarrolló un método analítico para el estudio de Enobosarm, Hidroxyflutamida, Bicalutamida y Andarina en orina y heces bovinas. El límite de cuantificación fue de 0,25 ng/ml para orina y 0,5 ng/g para heces.
- El método de procesamiento propuesto para orina es más sencillo que para heces. Esto era esperable considerando que la materia fecal es una matriz con mayor complejidad (mayor contenido de proteínas, lípidos y más heterogénea). Como consecuencia requiere más trabajo para eliminar las posibles interferencias o sustancias que podrían ensuciar/deteriorar el equipo instrumental. Por este motivo el tiempo empleado para el análisis de heces es el doble, especialmente debido a las etapas de evaporación.
- Un analista en una jornada laboral de 8 horas, aplicando los protocolos propuestos, podría procesar hasta 12 muestras de heces o hasta 24 muestras de orina. En el caso de realizarse la hidrólisis enzimática, debemos considerar la incubación (durante la noche).
- Los métodos propuestos mostraron un desempeño satisfactorio para los requerimientos regulatorios, en cuanto a *linealidad, sensibilidad, precisión, exactitud, selectividad y especificidad*. En consecuencia, la metodología desarrollada es capaz de ser aplicada en la producción bovina con propósito de control de uso de *Bicalutamida, Ostarina, Hidroxiflutamida* y *Andarina*, en orina y heces.
- Cabe destacar que éste es el primer trabajo que utiliza materia fecal como matriz para el control rutinario de abuso de SARMs (Hidroxyflutamida, Bicalutamida y Andarina) en la producción de animales con destino de alimentación humana.

Estudio de metabolitos de Bicalutamida y Andarina

Primer ensayo con animales (Bicalutamida)

Estudio de eliminación de Bicalutamida y sus metabolitos

Luego de la administración de Casodex® al ternero de raza Montbeliar y posterior toma de muestras de orina y heces, se procedió a la determinación y cuantificación de Bicalutamida aplicando el método desarrollado para control (Ver Figura 14 y Figura 15).

Cuantificación de Bicalutamida en orina y heces

Los resultados obtenidos de Bicalutamida en orina y heces durante los 7 días de muestreo se presentan en la Figura 17 y más detalles se presentan en las tablas del Anexo V (pág.179). Como se esperaba no se encontró Bicalutamida previa a la administración, pero luego de 4 horas se registró un rápido aumento en orina y heces. En ambas matrices se observa un rápido aumento, alcanzando un máximo en el día 1 (13,15 ng/ml en orina y 1254,11 ng/g en heces) y un descenso lento de la concentración hasta el día 7 (0,72 ng/ml en orina y 52,90 ng/g en heces). Estudios obtenidos en algunos animales de laboratorios describen una excreción similar a la encontrada en este trabajo con una mayor eliminación de Bicalutamida en los primeros días de post-administración [30, 82].

Las concentraciones encontradas en heces fueron mucho mayores que en orina. Sin embargo, el aumento relativo al día 1, fue mayor en orina (4hs= 19 %; 8hs= 49 %) que en heces (4hs=1 %; 8hs=19 %). El aumento urinario temprano podría ser explicado porque Bicalutamida tiene 2 isómeros (R y S) de los cuales el isómero S tiene escasa actividad biológica y se eliminaría rápidamente con mínimos cambios metabólicos. Entonces, la eliminación empezaría rápidamente con el isómero S por orina [31, 82]. En cambio, la excreción de R-Bicalutamida es lenta a causa de su metabolismo que incluye recirculación entero-hepática con excreción biliar [42]. Este comportamiento sería probablemente aplicable al bovino estudiado dado que en las Figura 17

(a) y (b) se puede ver que durante los primeros 3 días tenemos los mayores valores de concentración.

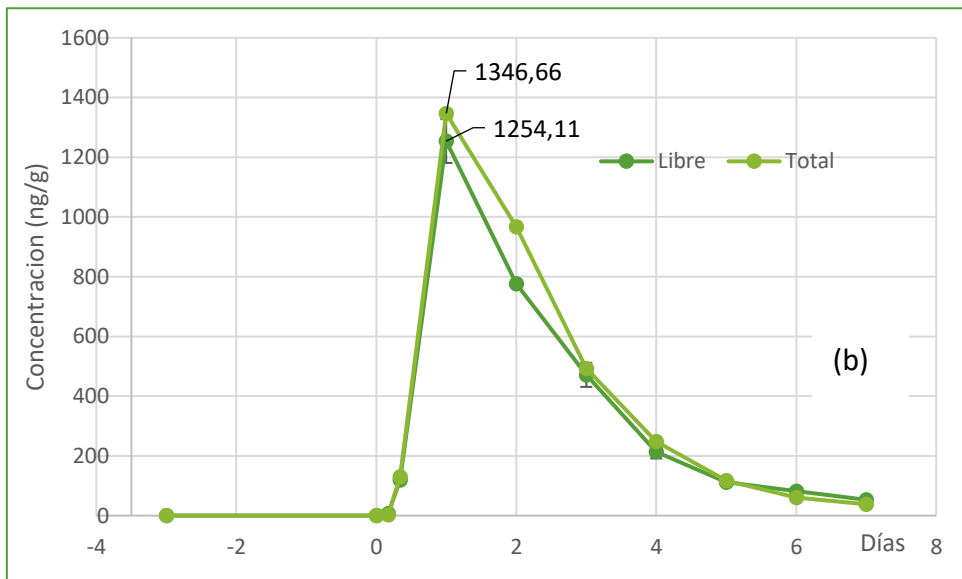
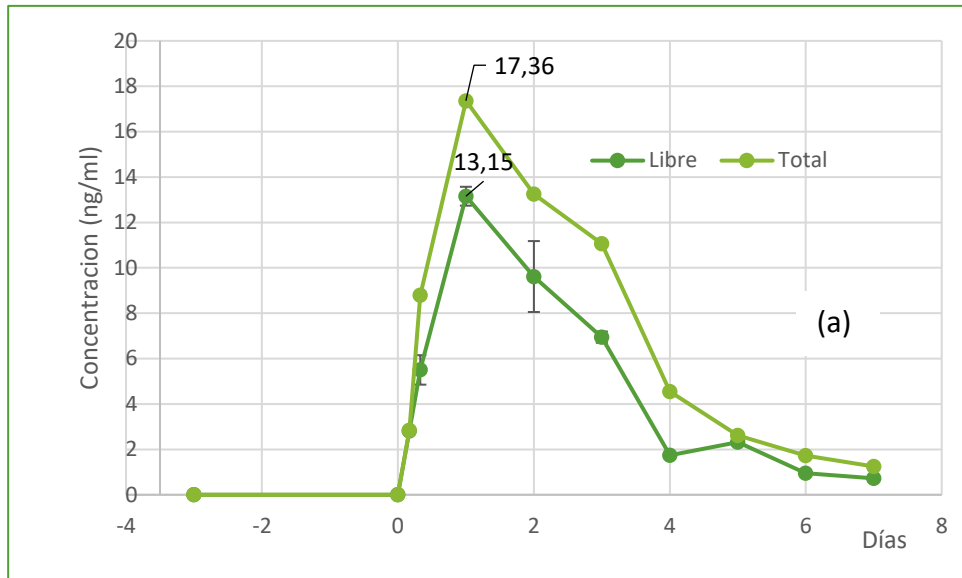


Figura 17. Perfil de excreción de Bicalutamida en orina (a) y heces (b).

Cada punto representa el promedio de 5 determinaciones.

Estudio de metabolitos

Los metabolitos de Fase II fueron determinados luego de establecer una forma adecuada de trabajar con hidrólisis enzimática (Ver ensayos realizados en Anexo III, pág.168). En las Figura 17 (a) y (b) se presentan los resultados de concentración para Bicalutamida *libre* y Bicalutamida *total* (libre + liberada, por acción enzimática). Se puede ver que la curva correspondiente a Bicalutamida

total es paralela a la libre y durante todo el ensayo se encuentra por encima pero siempre muy cerca. Esto se explicaría porque la libre (liberada sin modificaciones) es eliminada en mayor cantidad que conjugada (como glucurónido, sulfato, etc.) en ambas matrices (orina y heces). También es posible determinar la concentración de Bicalutamida conjugada (como glucurónido, sulfato, etc.) por orina y heces, realizando la sustracción de total menos libre. La presencia de Bicalutamida libre sin modificación en heces se debe a Bicalutamida no absorbida y también puede ser explicada porque parte es excretada en bilis como glucurónido y la flora digestiva liberaría a la Bicalutamida de su conjugación [42].

El análisis de otros metabolitos, incluyendo los de Fase I, fue más complejo debido a que al no conocer las estructuras químicas ni saber cuántos metabolitos buscar, no se pueden establecer condiciones óptimas en el detector MS (espectrometría de masas) para encontrarlos. La estrategia general aplicada para la búsqueda, se basó en realizar numerosos ensayos con el detector MS (en modos SCAN) con el fin de combinar los espectros de masas con los tiempos cromatográficos. De esta forma se reunió la información incompleta de cada ensayo SCAN, para proponer metabolitos lógicos. Finalmente, estas estructuras químicas (metabolitos propuestos) fueron evaluadas por espectrometría de masas en modo MRM (Monitoreo de Reacciones Múltiples) dando mayor confianza a los metabolitos propuestos.

Estos análisis se realizaron con una mezcla compuesta por extractos de orina y de heces de varios días. El propósito de realizar esta mezcla fue aplicar una búsqueda simultánea en orina y heces. Finalmente, se determinaría qué metabolitos estaban presentes en cada matriz, analizando las muestras diarias.

Luego de adaptar el gradiente cromatográfico para separar sustancias más polares (metabolitos), se analizó la mezcla de extractos utilizando el modo Full Scan en el detector de espectrometría de masas (variando el voltaje de cono). Así se detectaron regiones del cromatograma con mayor abundancia de iones característicos de Bicalutamida, descritos por otros autores [30, 31, 49], como ser: $m/z = 185, 255, 159, 173, 621, 445, 525, 411$ (Anexo V; pág. 179).

Después se analizó la mezcla de extractos utilizando el modo Precursor Ion Scan, Neutral Losses Scan y Product Ion Scan en el detector de espectrometría de masas (variando el voltaje de cono). Entonces se complementa la información obtenida de cada modo de trabajo del detector de espectrometría de masas y se localizan regiones del cromatograma donde los iones característicos se encuentran de forma simultánea.

Por último, se proponen estructuras posibles para los iones encontrados de mayor tamaño y se trata de explicar de forma teórica sus fragmentaciones en las que dan lugar a iones más pequeños. La forma de confirmar las especulaciones teóricas es incluir los *iones padres* con sus fragmentos relacionados en una misma transición monitoreada (*single reaction monitoring*, SRM) y luego múltiples transiciones (*multiple reaction monitoring*, MRM). También se comprueba la ausencia de MRM en las muestras blanco.

La Tabla 15 muestra los resultados de esta etapa del trabajo. Pueden observarse los iones cuasi-moleculares [M-H] con los iones relacionados y están indicadas las transiciones confirmadas por SRM.

Tabla 15. Metabolitos de Bicalutamida encontrados en el bovino tratado con Casodex[®].

Resultados del estudio MS en modo Scan y modo SRM.

	M1	M2	M3	M4	M5
[M-H]	605	621	445	509	525
Iones relacionados (m/z)	587	603	427	491	507
	561	445*	409	411	445*
	543	427*	185*	173*	427*
	429*	365*	255*	185*	255*
	411*	185*	189*	255*	185*
	193*	255*		429*	175
	185	175			189
	255	189*			
	159*	271*			
	173	201*			
		173			
		159			

La Figura 18 presenta un cromatograma compuesto construido por la sumatoria de los SRM (total ion current, TIC) obtenido en el análisis de la mezcla de extractos preparados como se describió en *Estudio de Metabolitos* de la pág. 68.

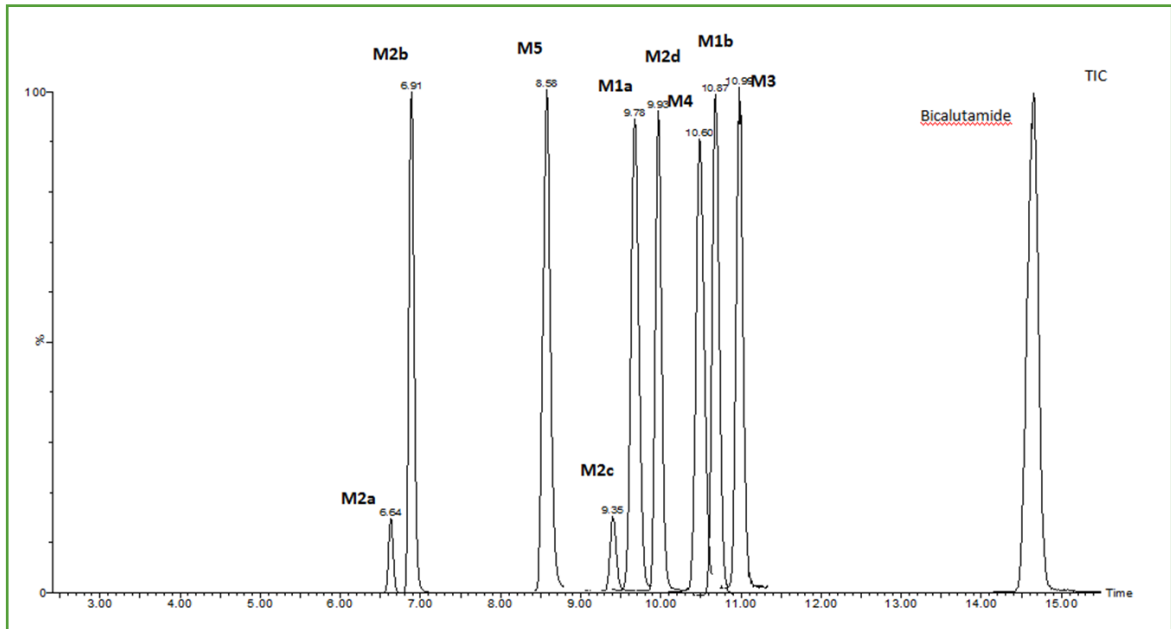


Figura 18. Cromatograma compuesto construido por los TICs para Bicalutamida (1° Ensayo)

Resultado obtenido de los SRM usados para los metabolitos de Bicalutamida en orina y heces. Los TICs corresponden a: M1a – M1b: 605>159 + 605>193 + 605>411; M2a – M2b: 621>185 + 621>255 + 621>445; M2c – M2d: 621>201 + 621>445 + 621>271; M3: 445>185 + 445>189 + 445> 255; M4: 509>173 + 509>185 + 509>255; M5: 525>185; 525>255; 525>445; Bicalutamida: 429,1>173,02 + 429,1>185,04 + 429,1>255,1.

Luego de analizar la información de espectrometría de masas y los datos bibliográficos, los metabolitos encontrados fueron 5 y se los nombró anteponiendo la letra “M”. Se propusieron las estructuras que se describen a continuación:

Metabolito 1 (M1): Correspondería a la forma desprotonada de la Bicalutamida glucuronada (Figura 19). Los fragmentos encontrados se relacionan a la pérdida de agua ($m/z = 587$); pérdida de formiato ($m/z = 561$) seguida de pérdida de agua ($m/z = 543$); también se encontraron fragmentos característicos de Bicalutamida ($m/z = 429, 411$) y al ácido glucurónico ($m/z = 193$).

Se observan 2 grupos de fragmentos relacionados a la glucuronidación en 2 posiciones: a) en el anillo trifluorometil sustituido ($m/z = 185$ y 255) y b) en el anillo monofluoro sustituido ($m/z = 159$ y 173). M1 ha sido identificado en bilis de rata, perro y en orina de conejo y humanos [30, 31, 82]. La Figura 18 presenta 2 picos para M1: M1a (9,78 min) y M1b (10,87 min), sin embargo, las limitaciones del estudio no permiten hacer conjeturas para asignar los picos a las formas R o S. La Figura 19 presenta una estructura probable para los metabolitos M1, con el trabajo realizado en el presente estudio no se puede saber la posición real del ácido glucurónico (Gluc).

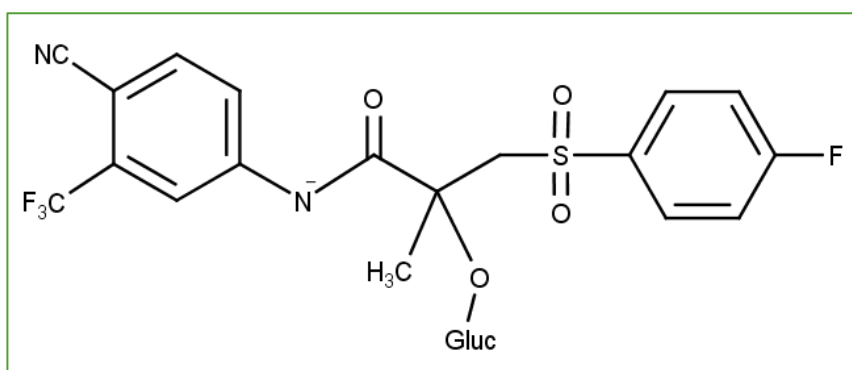


Figura 19. Estructura de propuesta para los metabolitos M1 ($m/z = 605$).

Metabolito 2 (M2): Correspondería a la forma desprotonada de Hidroxi-Bicalutamida conjugada con ácido glucurónico (Figura 20). Se encontraron iones consistentes con Hidroxi-Bicalutamida ($m/z = 445$), con la pérdida de agua ($m/z = 427$) y con el aducto sódico de M2 ($m/z = 643$). M2 fue reportado en bilis de rata, perro y orina humana [30, 31, 43, 82]. La Figura 18 presenta 4 picos para M2 (M2a, M2b, M2c y M2d), lo cual podría sugerir que la hidroxilación con glucuronidación ocurre en ambos anillos para los isómeros R o S, pero nuevamente las limitaciones del estudio no permiten asignar los picos a las estructuras. Los picos M2a (6,6 min) y M2b (6,9 min) muestran iones compatibles con el anillo trifluorometil sustituido sin modificaciones ($m/z = 185$ y 255) mientras que el otro anillo estaría hidroxilado ($m/z = 175, 189$) y conjugado ($m/z = 365$). Los picos M2c (9,3 min) y M2d (9,9 min) presentan iones

consistentes con el anillo monofluorado sin cambios ($m/z = 159, 173$) mientras que el otro anillo estaría hidroxilado ($m/z = 201, 271$).

La Figura 20 muestra 2 posibles alternativas de ubicación para el ácido glucurónico (Gluc). Esta figura no propone una estructura exacta dado que la información provista por el detector de espectrometría de masas no es suficiente.

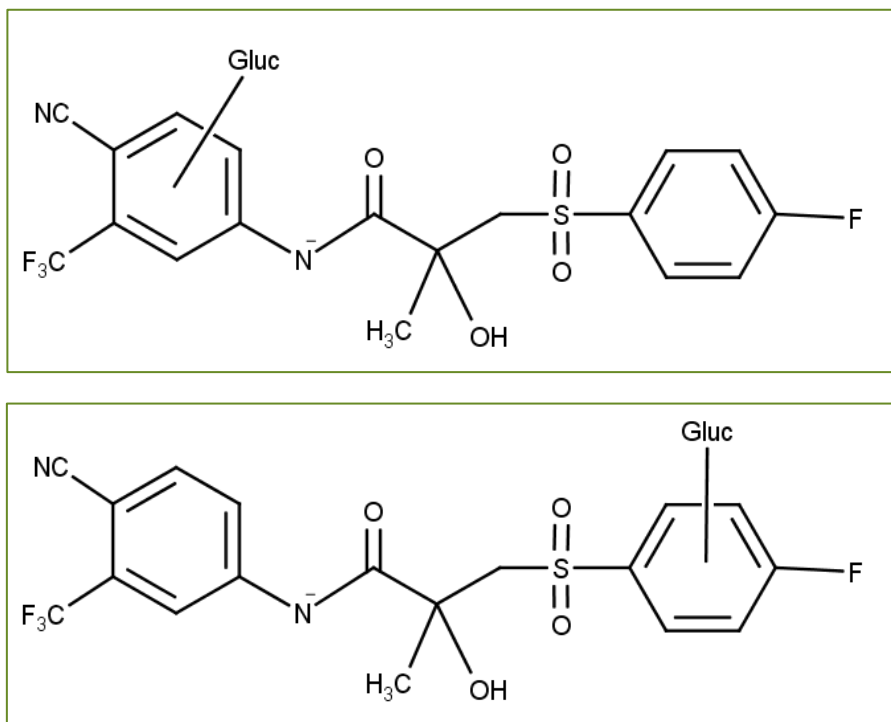


Figura 20. Estructura de propuesta para los metabolitos M2 ($m/z = 621$).

Metabolito 3 (M3): Correspondería a la forma desprotonada de Bicalutamida hidroxilada (Figura 21), reportada en trabajos anteriores, en heces de rata y de humano [31, 82]. M3 presenta iones provenientes de la pérdida sucesiva de 2 moléculas de agua, primero $m/z = 427$ y luego $m/z = 409$. También muestra iones correspondientes al anillo trifluorometil sustituido sin cambios ($m/z = 185$ y 255) y otros consistentes con el anillo monofluorado hidroxilado ($m/z = 189$).

La Figura 21 muestra la probable estructura química consistente con la información obtenida de los espectros de masa. Se puede suponer que el hidroxilo está en el “anillo monofluorado” pero no se puede conocer la posición exacta y por esta razón, no se grafica una unión verdadera.

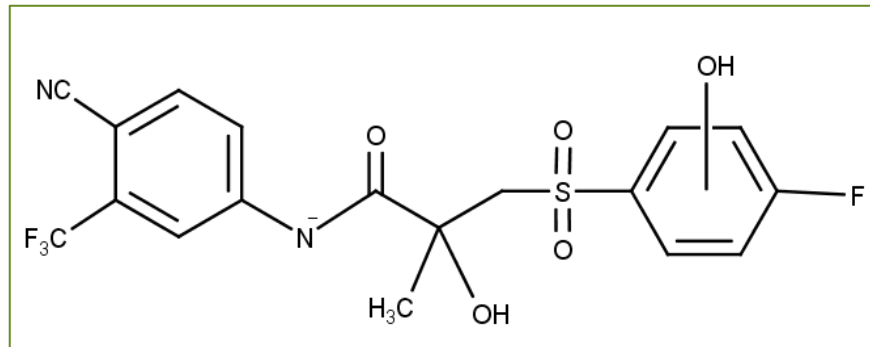


Figura 21. Estructura de propuesta para M3 ($m/z = 445$).

Metabolito 4 (M4): Correspondiente a la forma desprotonada de Bicalutamida sulfatada (Figura 22). Presenta iones consistentes con la pérdida de agua de M4 ($m/z = 491$), fragmentos característicos de Bicalutamida ($m/z = 429$ y 411) y otros iones que se relacionan con los 2 anillos de Bicalutamida sin cambios ($m/z = 173$, 185 y 255) que indicaría que el grupo sulfato se encuentra en el alcohol terciario de Bicalutamida.

La Figura 22 presenta la estructura química propuesta considerando los fragmentos encontrados en los espectros de masa adquiridos. Sin embargo, no se puede considerar que la estructura sugerida sea correcta. Para poder afirmar se deberían realizar estudios complementarios como el análisis con un espectrómetro de masas de alta resolución o bien de resonancia magnética nuclear.

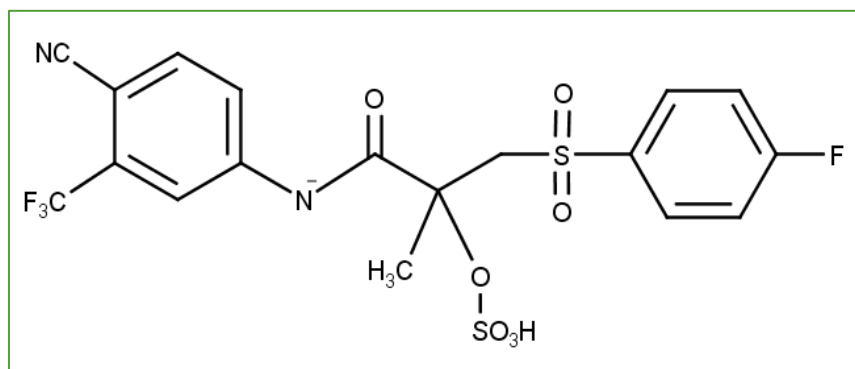


Figura 22. Estructura de propuesta para M4 ($m/z = 509$).

Metabolito 5 (M5): Correspondiente a la forma desprotonada del derivado hidroxilado y sulfatado de Bicalutamida (Figura 23). M5 presenta iones que provendrían de la pérdida de agua ($m/z = 507$), de la forma desprotonada de Bicalutamida hidroxilada ($m/z = 445$) y de la pérdida de agua de Bicalutamida hidroxilada ($m/z = 427$). También presentan iones compatibles con el anillo trifluorometil sustituido sin modificaciones y otros que corresponderían al anillo monofluoro sustituido hidroxilado. Esto sugeriría que el grupo sulfato se localizaría en el hidroxilo de la cadena Figura 23. Sin embargo, no se puede descartar que el grupo sulfato se ubique en el anillo monofluorado hidroxilado.

La Figura 23 muestra la estructura química propuesta para M5, se puede ver que el anillo trifluorometil sustituido se encuentra sin modificaciones, el anillo monofluoro sustituido hidroxilado. Sin embargo, no es posible asegurar una posición precisa para el grupo sulfato ni para el hidroxilo. Como se mencionó anteriormente para tener las estructuras exactas de los metabolitos propuestos es necesario realizar estudios que complementen este trabajo.

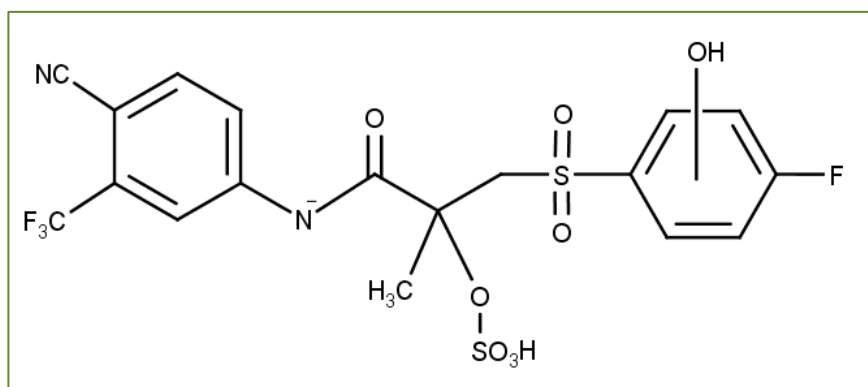


Figura 23. Estructura química propuesta para M5 ($m/z = 525$).

Eliminación de los metabolitos en orina y heces

Como se describió anteriormente, se analizaron los fragmentos obtenidos, los tiempos de retención y las estructuras químicas en función de relaciones m/z que ayudaron a proponer las estructuras de los metabolitos (M1 al M5). El siguiente paso necesario, para poder utilizar esta información con el fin de controlar la administración de Bicalutamida en producción animal, fue establecer la ventana de tiempo en la que se puede detectar cada metabolito.

La construcción de las estructuras de cada metabolito se realizó combinando la información de diferentes fragmentos que ayudaron a sugerir las estructuras propuestas. Sin embargo, para evaluar la ventana temporal y la presencia en cada matriz, solo se utilizaron las transiciones detalladas en la Tabla 16.

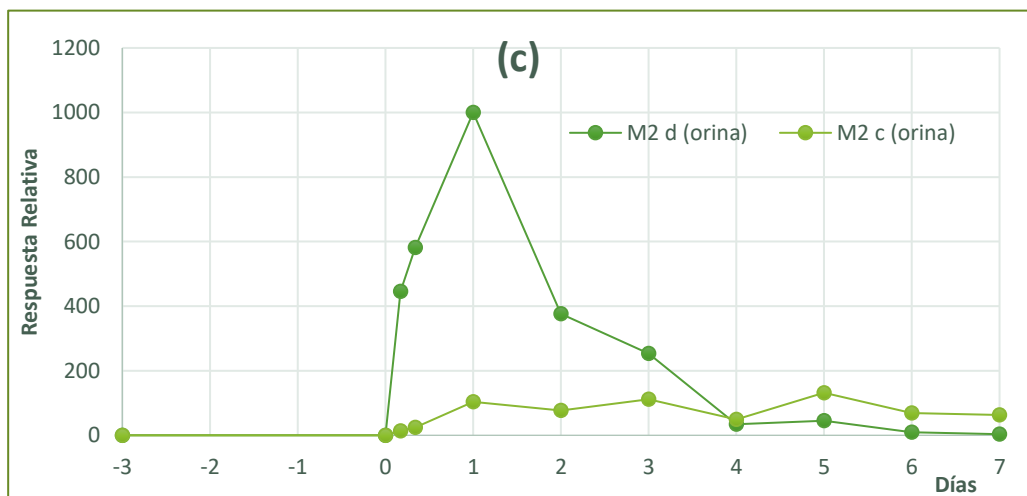
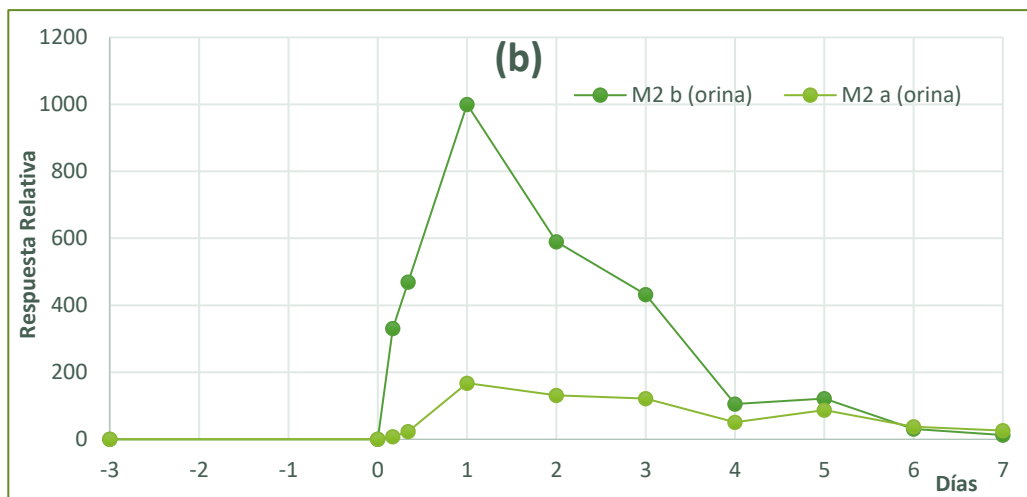
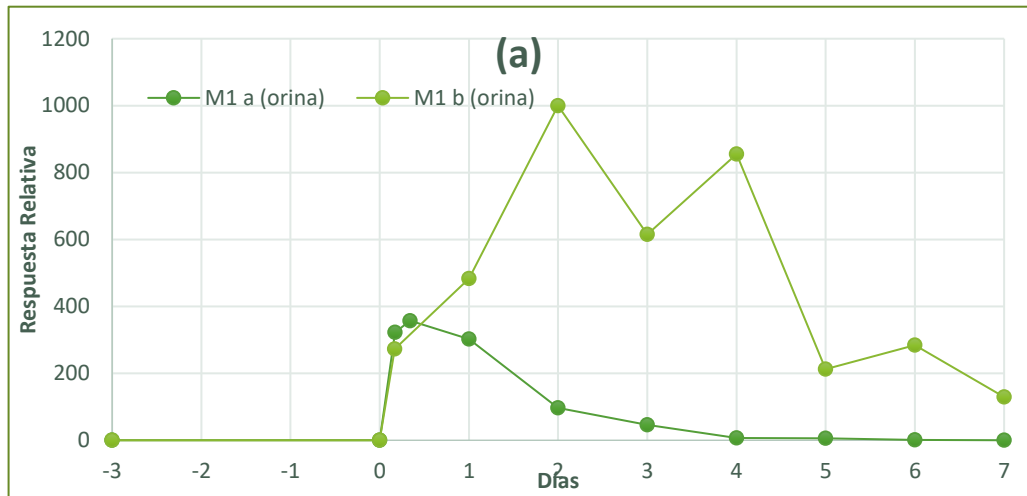
Tabla 16. Transiciones empleadas para la construcción de los perfiles de excreción en orina y heces.

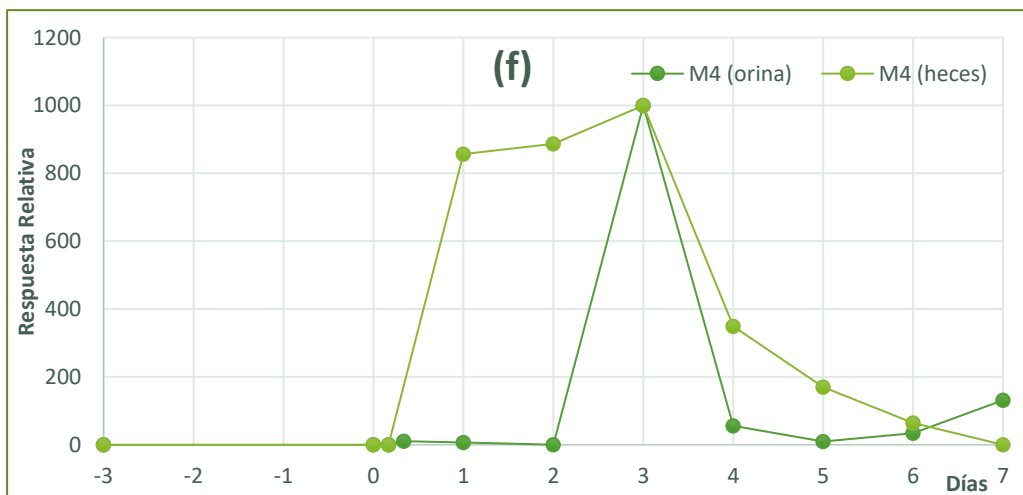
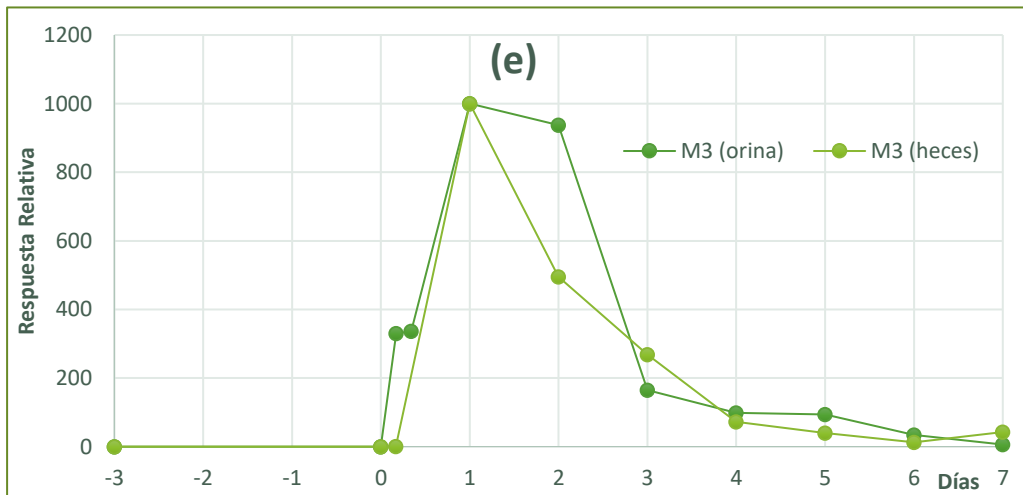
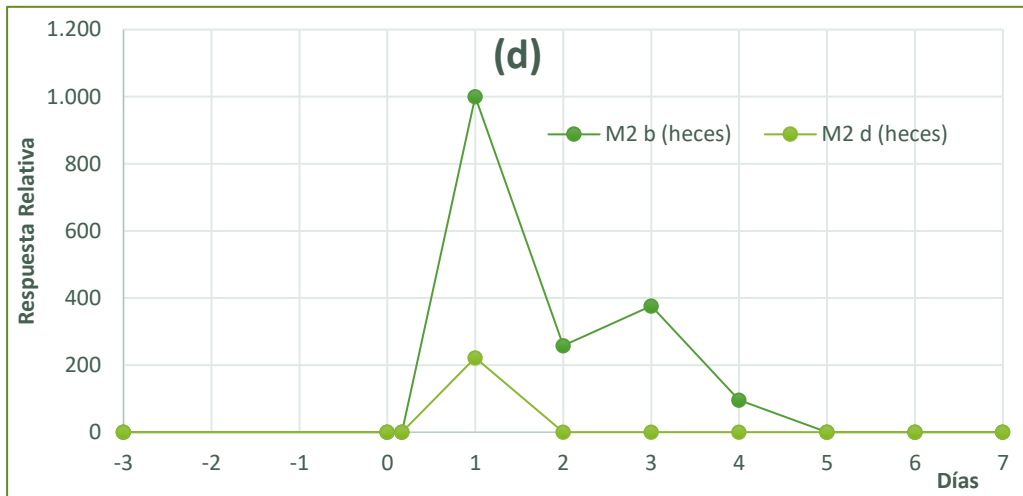
	[M-H ⁻]	MRM (m/z)		
M1	605	605>411	605>193	605>159
M2	621	621>185	621>255	621>189
M3	445	445>185	445>255	445>189
M4	509	509>173	509>185	509>255
M5	525	525>445	525>255	525>185

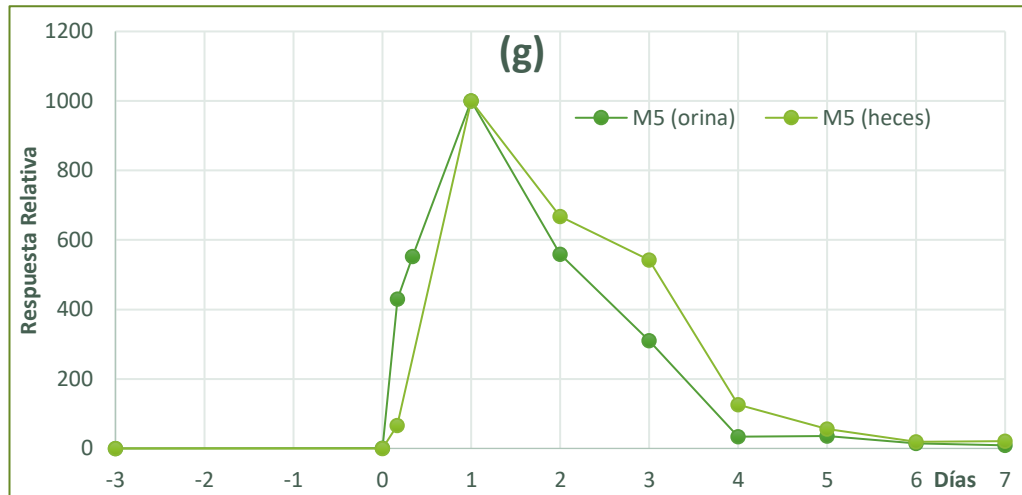
A continuación, se presentan los perfiles de excreción de metabolitos obtenidos del análisis cromatográfico (Figura 24). Al no contar con los estándares patrones de cada metabolito, no se puede transformar la señal en unidades de concentración y por esta razón los siguientes gráficos están contruidos sobre una base arbitraria, donde la señal de cada figura es relativa a la máxima señal del metabolito en cada figura. Sin embargo, estas figuras son muy importantes puesto que muestran qué metabolitos son característicos de cada matriz y, además, cuánto tiempo es detectable cada metabolito determinando la *ventana temporal*.

Figura 24. Perfiles de excreción urinaria y fecal de metabolitos de Bicalutamida.

Valores expresados como valores relativos a la respuesta máxima de cada metabolito.







Las Figura 24 (a), (b), (c), (d), (e), (f) y (g) muestran los resultados obtenidos en esta parte del estudio, presentando la variación de la respuesta relativa en función de los días del ensayo.

M1: En orina, luego de la administración de Bicalutamida M1a y M1b presentaron un aumento durante las 4 primeras horas. El máximo de M1a se encontró a las 8 h mientras que M1b lo tuvo al día 1. M1b presentó un descenso de concentración más lento que M1a (Figura 24 a). En heces no se detectaron.

M2: En orina, M2a y M2c presentaron un aumento lento hasta el día 1 y luego mantiene la concentración bastante estable. En cambio, M2b y M2d presentaron un aumento rápido con un máximo al día 1 seguido por un descenso lento (Figura 24 b y c).

En materia fecal, M2d se encontró en el día 1 y M2b presentó un máximo en día 1, luego desciende y al día 5 ya es no detectable (Figura 24 d).

M3: En ambas matrices se presenta con un rápido aumento a 4 h y con un máximo en el día 1, seguido por un descenso lento (Figura 24 e).

M4: En ambas matrices muestra el máximo en el día 3. En orina la concentración del resto de los días disminuye.

En heces, la concentración aumenta a partir de las 4 h y luego del máximo disminuye (Figura 24 f).

M5: En ambas matrices el máximo se encontró al día 1. En orina, aumenta y desciende rápido, casi simétricamente. En materia fecal aumenta rápido y desciende lento (Figura 24 g).

A causa de la baja solubilidad acuosa de Bicalutamida (< 5 mg/l) se esperaría una baja aparición de la droga en las excretas. Sin embargo, como se observó en los resultados presentados y trabajos previos muestran una lenta eliminación explicada por una intensa absorción de la droga.

Los resultados indican un intenso metabolismo de la droga que incluye modificaciones oxidativas, derivados sulfatados y glucuronados. Los metabolitos encontrados pueden ser explicados por reacciones descritas para otros SARMs derivados de APA [45, 47, 66, 68, 73].

También pudo verse una gran excreción urinaria y fecal de la droga sin cambios. Estas evidencias son compartidas con trabajos realizados previamente en animales de laboratorio y en humanos [30, 31, 82]. Sin embargo, en animales de laboratorio se destaca la aparición de un metabolito urinario mayoritario que no se encontró en este ensayo. Así mismo, los metabolitos provenientes del clivaje de enlace amida, descritos por otros autores [30, 31, 82] no fueron encontrados.

Las concentraciones máximas encontradas en heces y orina dentro de las primeras 24 h, son consistentes con trabajos realizados en el hombre y animales de laboratorio previamente [30, 82]. En rata, ratón y conejo la recuperación de la mayor parte del fármaco administrado se realiza en las primeras 48 h [30, 31, 82].

Además, los datos obtenidos (especialmente para M2) respaldan la hipótesis de un metabolismo con selectividad enantiomérica como el reportado en otras especies [30], incluyendo al hombre [82]. La intensidad de señal que presentan M1 y M2 en heces referiría más a una contaminación durante la toma o manipulación de la muestra que a una verdadera excreción fecal de estos glucurónidos. [30, 31, 82].

Los metabolitos encontrados en orina y el prolongado tiempo de excreción, apoyarían la existencia de una intensa reabsorción intestinal propuesta por otros autores [30, 31, 82]. Esto explica gran parte de la persistencia del efecto atribuido a esta droga.

Las mayores concentraciones de Bicalutamida en heces podrían relacionarse con la eliminación del agua fecal durante el proceso de liofilización

aunque algunos trabajos previos en animales de laboratorio indican una importante eliminación de Bicalutamida en heces [30, 42]. En nuestro caso es posible que ambos efectos sean simultáneos.

Para los metabolitos M4 y M5 no se encontraron descripción bibliográfica previa. Las diferencias observadas se podrían explicar por el metabolismo del animal y la raza estudiada o por las diferencias metodológicas utilizadas [49] [83].

Conclusiones parciales:

- Se determinó la variación de concentración de Bicalutamida en orina y heces luego de la administración oral de 100 mg de Bicalutamida. En ambas matrices se observa un rápido aumento, alcanzando un máximo en el día 1 (13,15 ng/ml en orina y 1254,11 ng/g en heces) y un descenso lento de la concentración hasta el día 7 (0,72 ng/ml en orina y 52,90 ng/g en heces).

- Estos datos apoyan la utilización de orina y materia fecal como matrices útiles para el control de esta droga y probablemente para otros SARMs derivados de la arilpropionamida en prácticas ganaderas.

- Ambas matrices estudiadas presentaron metabolitos provenientes de reacciones de Fase I y Fase II. Los metabolitos encontrados provienen de reacciones de hidroxilación y conjugación. Algunos metabolitos encontrados fueron descritos previamente en ensayos *in vivo* en humanos y animales de laboratorio (rata, perro, conejo y ratones).

- Los metabolitos encontrados pueden ser explicados por reacciones descritas para otros SARMs derivados de APA.

- La mayor variedad de metabolitos se encontraron en orina, mostrando sus máximos dentro de las 48 h posteriores a la administración de la droga. Solo M4 (sulfato derivado) presentó su máximo al día 3, para orina y materia fecal. Luego del día 4 los metabolitos se encuentran cercanos al 10 % de la intensidad máxima; excepto Bicalutamida, M1b, M2b y M2c que se mantienen por encima (en orina).

- En base a los resultados en cuanto a la respuesta en el espectrómetro de masas y la ventana temporal de 7 días, el control analítico de Bicalutamida se debería llevar a cabo siguiendo en orina M2, M5 y M3; en heces M3. Sin embargo, Bicalutamida sin modificación es el mejor candidato dado que además de presentar gran señal en el detector y permanecer detectable hasta el final del ensayo, es posible cuantificarlo dada la disponibilidad de un patrón comercial accesible.

- Este trabajo constituye el primer estudio de eliminación de Bicalutamida en bovinos, el primero en proponer las heces como matriz de análisis y el primero en describir la presencia de M4 y M5.

Segundo ensayo con animales

Estudio de eliminación de Bicalutamida, Andarina y sus metabolitos

Luego de la administración de Bicalutamida y Andarina a porcinos de raza Chetapuy y Bicalutamida a novillos de raza Angus se tomaron muestras de orina, heces y sangre de cada animal como se describió (Ver *Segundo Ensayo animal*; pág.69). Para el análisis de estas muestras se utilizó un equipo cromatográfico diferente al utilizado en el ensayo anterior y por esta razón se evaluó el desempeño del mismo: *Linealidad, Exactitud, Precisión, Sensibilidad y Selectividad* (Ver *Evaluación del método*, pág. 65).

Performance del método (INTA – Castelar)

Las curvas de calibración y las muestras fueron procesadas en el mismo momento. La linealidad de las curvas fue calculada para cada tanda de muestras analizadas. La Tabla 17 presenta un resumen de los resultados de los parámetros calculados para las 3 matrices estudiadas.

Los parámetros obtenidos para el estudio fueron satisfactorios en todos los casos, en un amplio rango de concentraciones ensayadas (orina: 0,5 - 200 ng/ml; heces: 2 - 3500 ng/g; suero: 2 – 3000 ng/ml), para Bicalutamida y Andarina:

- Coeficientes de determinación (r^2) mayores a 0,98
- Recuperaciones entre 70 % y 120 %
- Coeficientes de variación menores al 20 % (RSD %)
- No se observaron interferencias en ninguna de las 3 matrices estudiadas.

En el Anexo VIII (pág. 194) se detallan los datos utilizados para los cálculos y tablas con valores obtenidos en los ensayos realizados para cada matriz.

Tabla 17. Parámetros analíticos calculados para evaluar la confiabilidad del método aplicado.

	Orina	
	Bicalutamida	Andarina
a	0,0626	0,0099
b	-0,5630	-2,6763
r²	0,9987 ± 0,0018	0,9988 ± 0,0014
R %	84,3 – 112,1	80,4 – 108,8
RSD %	5 - 9,9	5,5 - 9,1

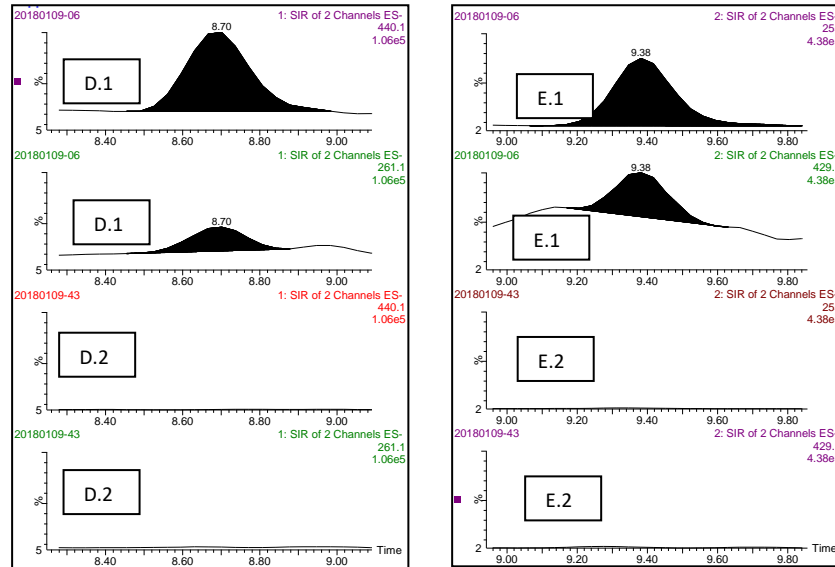
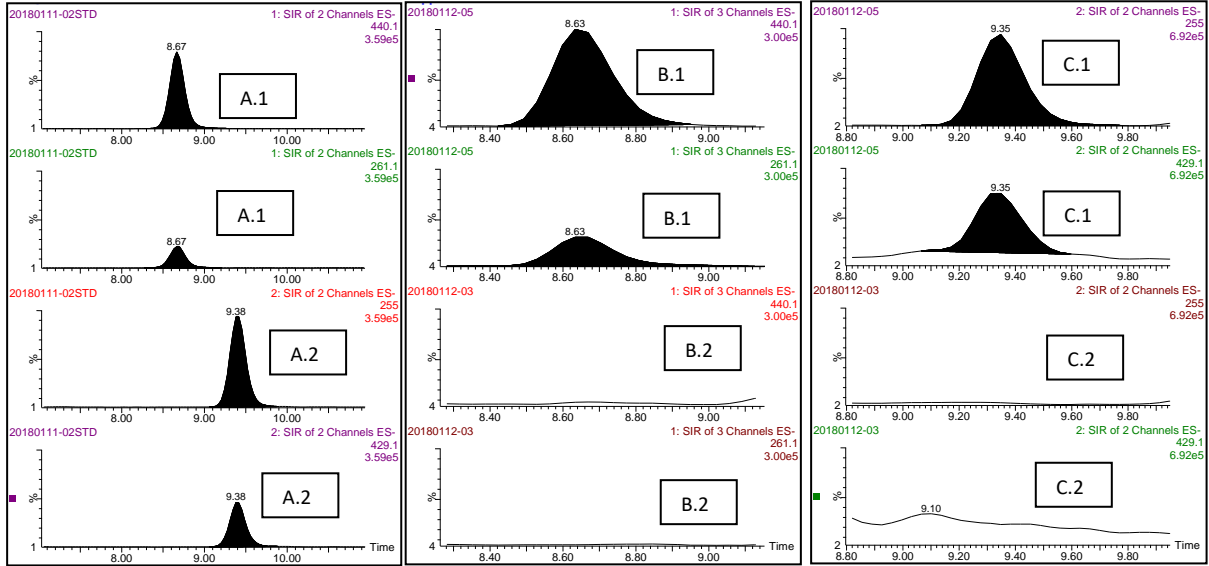
	Heces	
	Bicalutamida	Andarina
a	0,0548	0,0076
b	1,2819	0,1190
r²	0,9914 ± 0,0083	0,9993 ± 0,0008
R %	86,7 - 110,8	82,1 - 108,1
RSD %	5,6 - 12	5,2 - 13,2

	Suero	
	Bicalutamida	Andarina
a	0,0022	0,0016
b	-0,0037	0,0278
r²	0,9994 ± 0,0023	0,9986 ± 0,0013
R %	82,7 - 110,5	86,5 - 109,4
RSD %	5,1 - 10,3	2,5 - 10,7

La Figura 25 presenta cromatogramas SIM (Single Ion Monitoring) que muestran la comparación de soluciones estándares (5 ng/ml), muestras blanco y muestras fortificadas (orina: 0,5 ng/ml, heces: 2 ng/g, suero: 2 ng/ml).

Figura 25. Cromatogramas SIM: de solución estándar, muestras blanco y muestras fortificadas.

(A.1) Andarina, (A.2) Bicalutamida; en orina blanco (B.2) y orina fortificada con Andarina (B.1); orina blanco (C.2) y orina fortificada con Bicalutamida (C.1); heces blanco (D.2) y heces fortificadas con Andarina (D.1); heces blanco (E.2) y heces fortificadas con Bicalutamida (E.1); Suero blanco (F.2) y suero fortificado con Andarina (F.1); Suero blanco (G.2) y suero fortificado con Bicalutamida (G.1).



Continuación Figura 25.

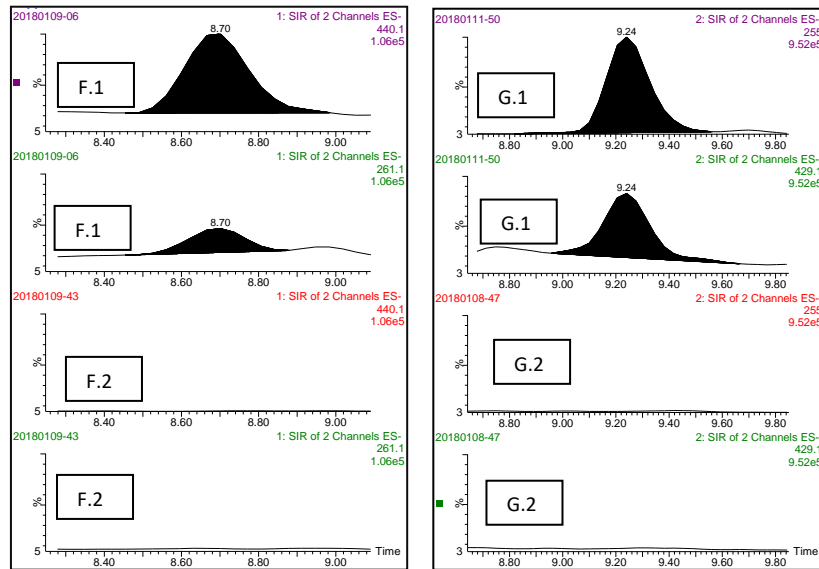


Tabla18. Parámetros de espectrometría de masas usados para identificación y cuantificación de SARMs (2° ensayo).

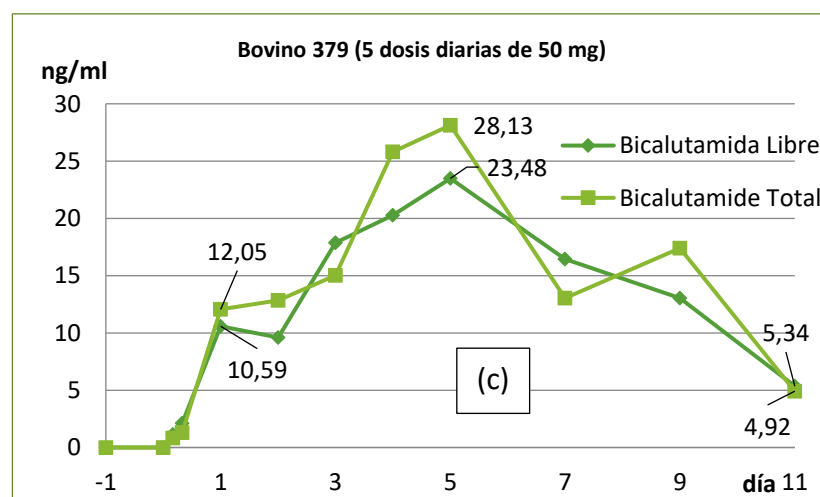
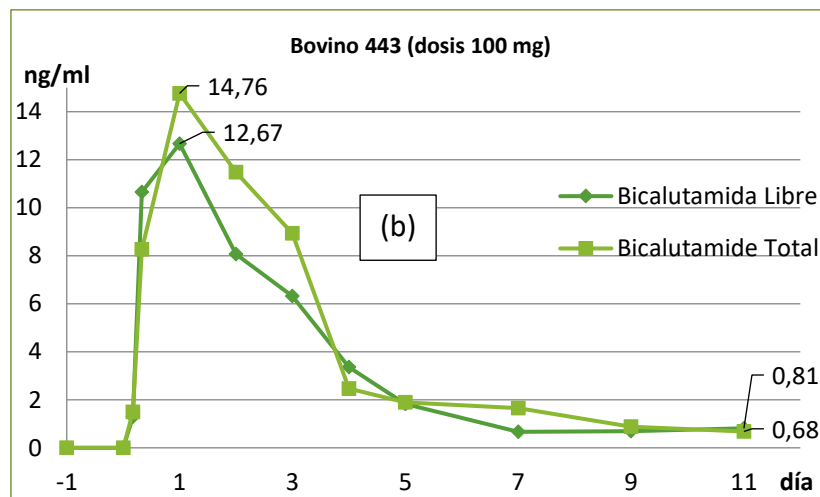
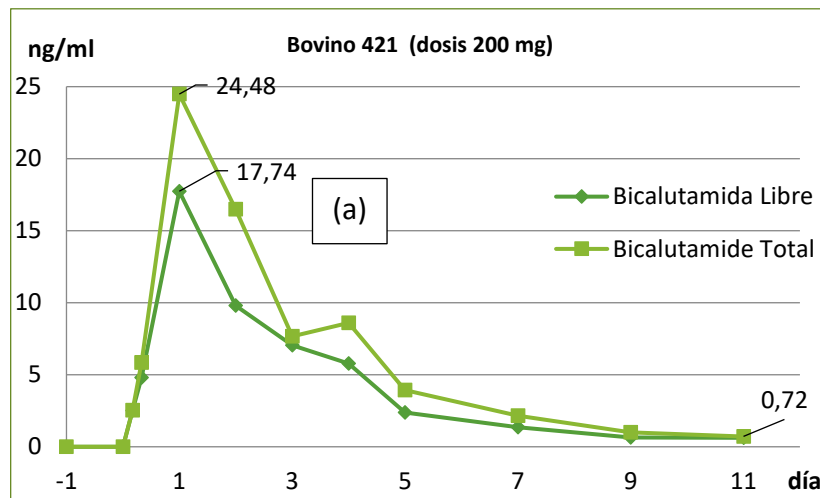
Datos cromatográficos (modo Single Ion Monitoring) utilizados para la identificación de Andarina, Bicalutamida e Hidroxiflutamida. (Q) Ion de cuantificación, (q) Ion de calificación.

RT (min)	Analitos	Iones	Cono (V)
8,01	Hidroxiflutamida	291,1 (Q)	40
		205,0 (q)	
8,6	Andarina	261,0 (q)	40
		440,1 (Q)	
9,2	Bicalutamida	429,1 (q)	60
		255,1 (Q)	

Estudio de concentraciones de Bicalutamida y Andarina

Luego de realizar la identificación y la cuantificación de los SARMs, se graficaron las concentraciones obtenidas para observar las variaciones en el tiempo y determinar las ventanas temporales. Los resultados para Bicalutamida *libre* y *total* en orina se presentan en la Figura 26; en heces en la Figura 27; en suero en la Figura 28 y los resultados de Andarina en el porcino tratado en la Figura 29. Los detalles de la hidrólisis enzimática para la liberación de la droga se presentaron en la Figura 14 (pág. 79), Figura 15 (pág. 81) y están explicados en el Anexo III (pág. 168).

Figura 26. Concentraciones de Bicalutamida en orina.



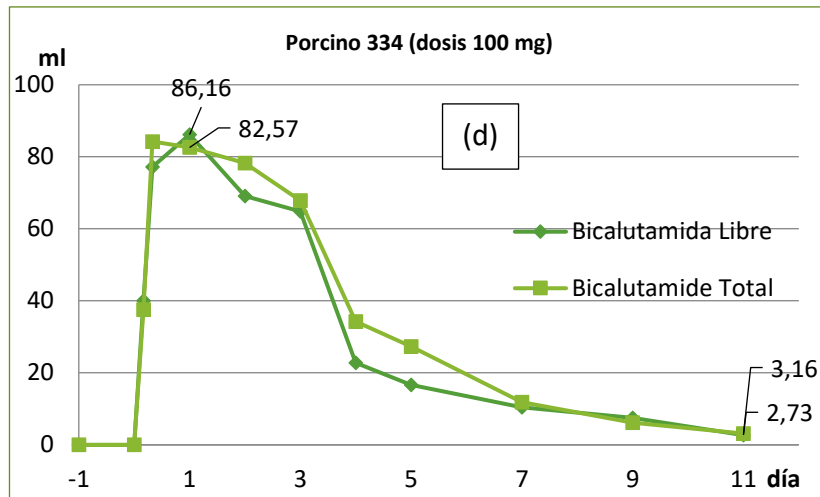
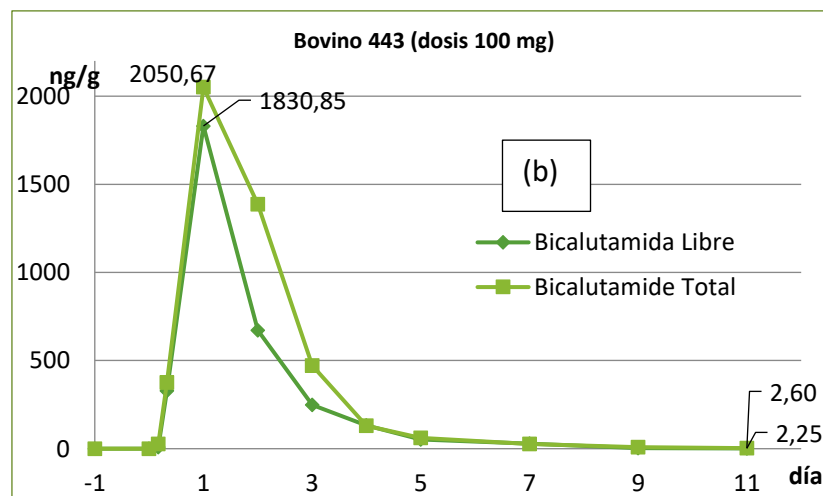
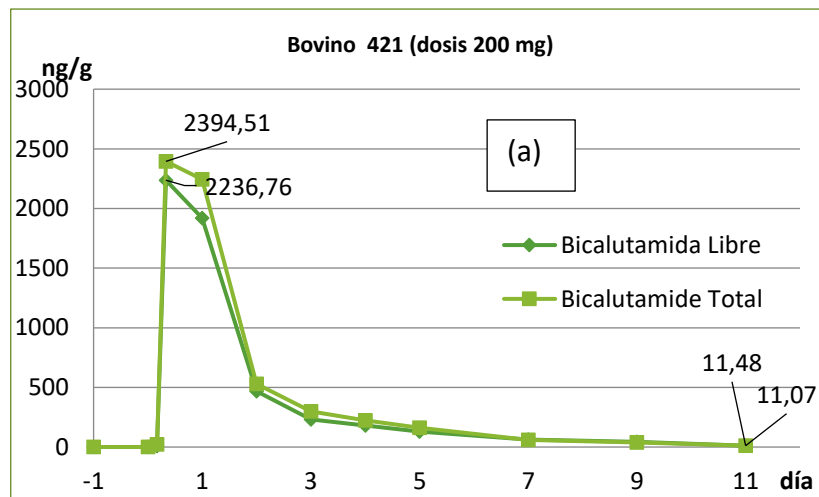


Figura 27. Concentraciones de Bicalutamida en heces.



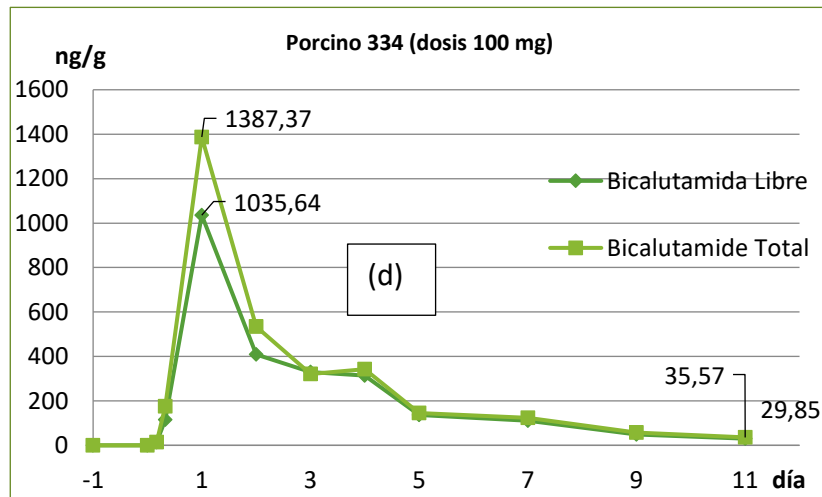
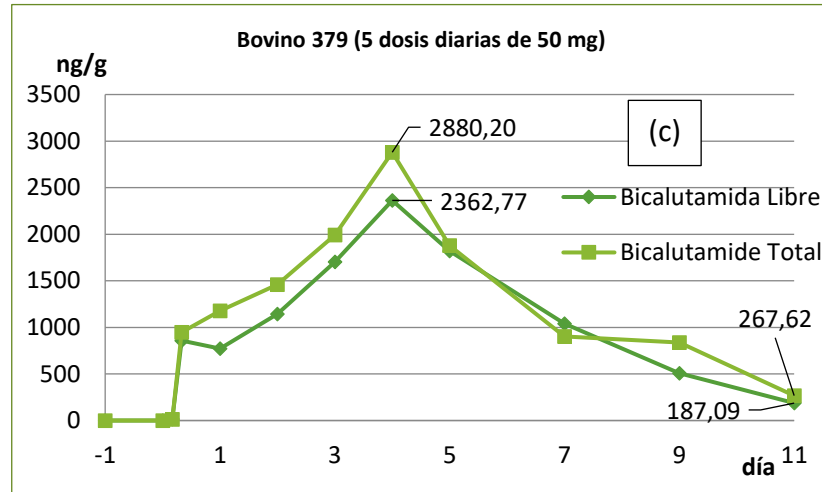
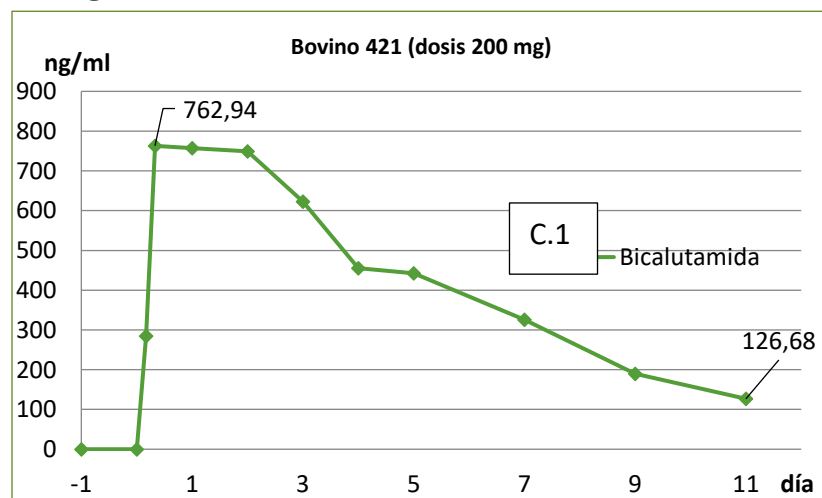


Figura 28. Concentraciones Séricas de Bicalutamida.



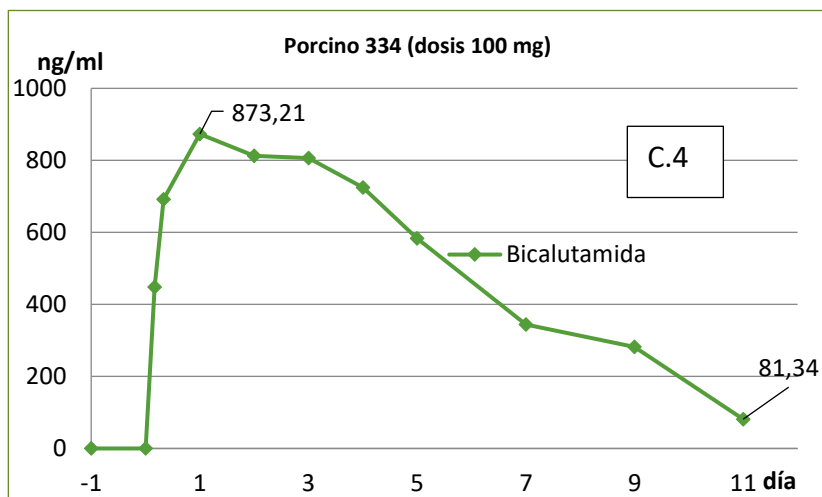
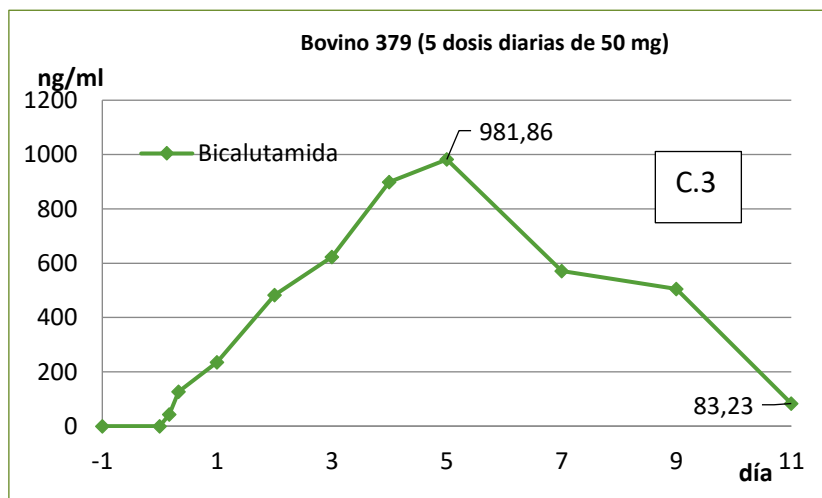
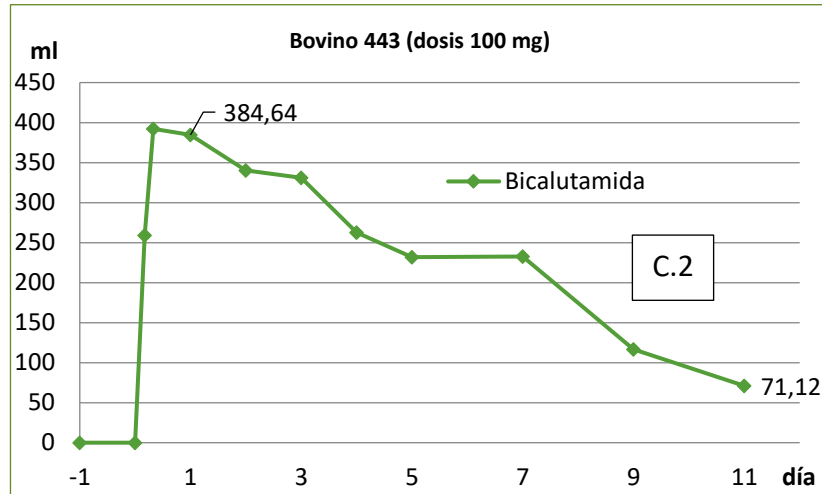
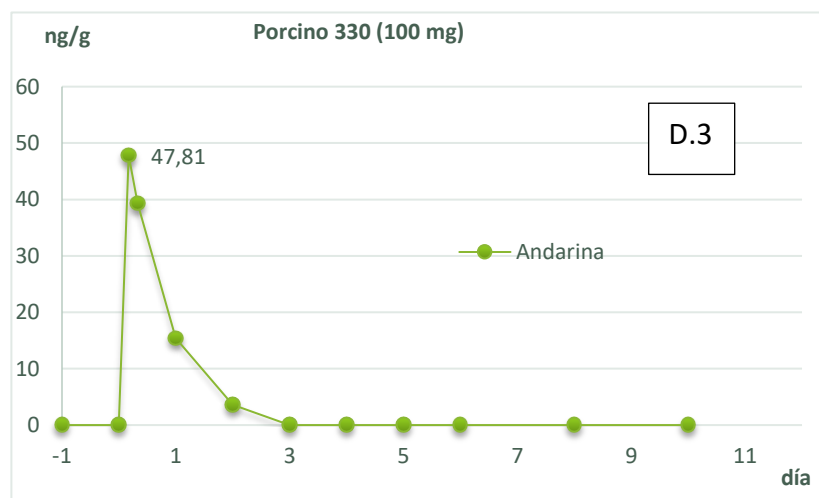
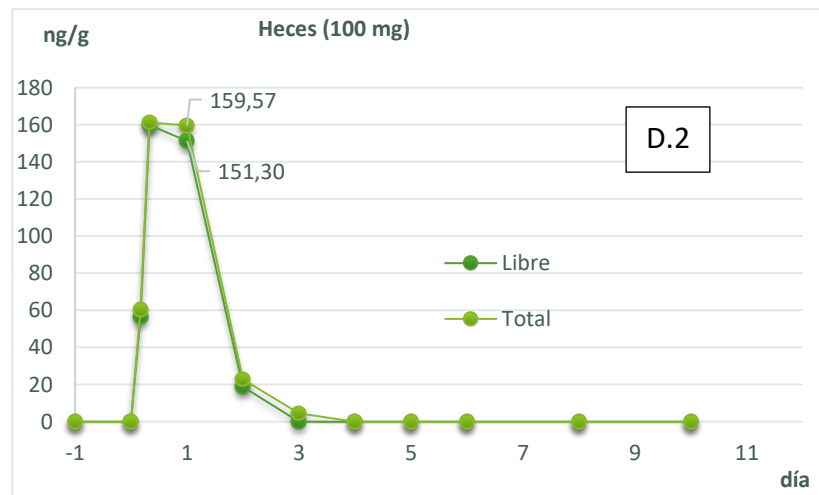
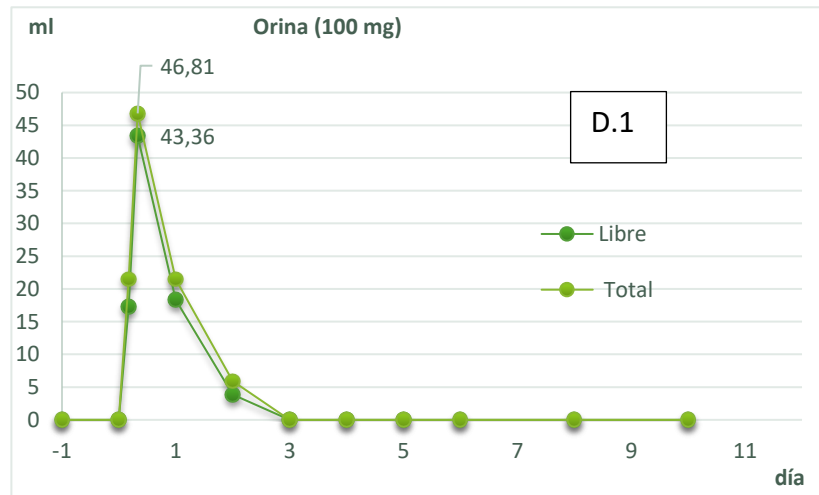


Figura 29. Concentraciones de Andarina en orina, heces y suero porcino.



Como se esperaba, antes de la administración no se detectaron SARMs en ninguna de las matrices estudiadas. Analizando los valores de concentración obtenidos destaca la materia fecal liofilizada como la matriz en la cual se encuentran las mayores concentraciones para ambas especies, ambas drogas y en las diferentes dosis administradas. Esto podría atribuirse en parte al proceso de liofilización en el cual se reduce hasta más del 80 % del peso de materia fecal por eliminación del agua y de esta manera generar la concentración de los solutos no volátiles como los SARMs (y sus metabolitos).

Comparando los resultados obtenidos en los animales tratados con una única dosis de Bicalutamida, se puede observar un aumento rápido (4 h) de la concentración en las matrices estudiadas lo cual indica una buena absorción al igual que en otras especies animales [30]. La excreción alcanza su máximo al día 1, excepto en materia fecal con dosis de 200 mg de Bicalutamida que presenta su máximo antes. Luego de llegar al máximo, la concentración en cada matriz disminuye lentamente, describiendo curvas asimétricas, similares a las encontradas en el primer ensayo con animales (pág. 86). Estas evidencias en porcinos y bovinos, respaldan estudios hechos en animales de laboratorio, donde se describe la recuperación casi total de una única dosis mediante la recolección de orina y heces, encontrando menos del 1 % en aire exhalado [30, 31].

Las curvas de concentración sérica de Bicalutamida en ambas especies estudiadas indican una rápida absorción y un largo período de permanencia en sangre, como en humanos probablemente se transportaría unida a proteínas principalmente a albumina [42].

Analizando las distintas dosis de Bicalutamida, se observa que a mayor dosis administrada es mayor la concentración encontrada en las matrices. Si graficamos la concentración máxima en las 24 h iniciales en función de la dosis encontramos una relación proporcional directa que se presenta, para las distintas matrices, en la Figura 30, Figura 31 y Figura 32.

Figura 30. Relación dosis de Casodex[®] y Bicalutamida en Orina (24 h.).

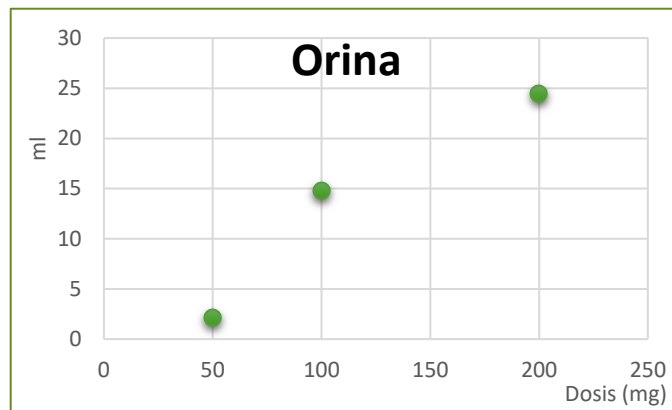


Figura 31. Relación dosis de Casodex[®] y Bicalutamida en heces (24 h.)

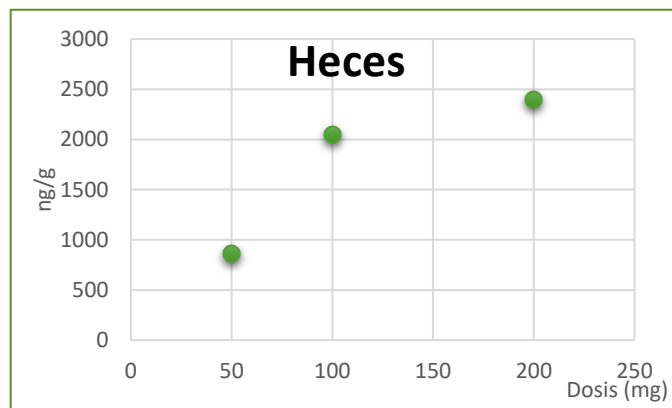
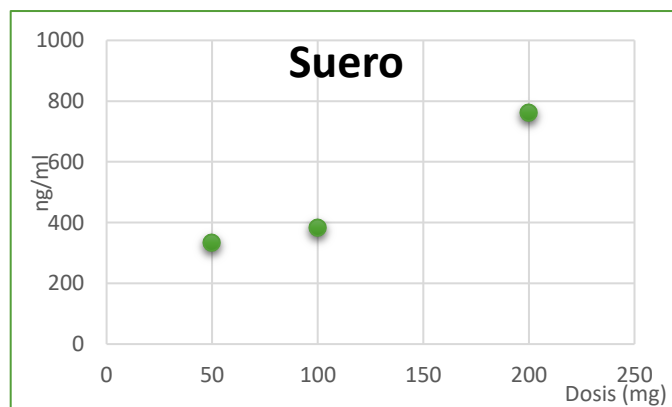


Figura 32. Relación dosis de Casodex[®] y Bicalutamida en suero (24 h.)



En cuanto al efecto acumulativo de las dosis diarias de 50 mg, la Figura 28 (C.3) muestra el aumento de la concentración sérica con el correr de los 5 primeros días de ensayos y de modo similar se incrementa la eliminación (en

orina y materia fecal). Estudios clínicos realizados en voluntarios describen un aumento de concentración sérica de Bicalutamida de hasta 10 veces generada por la administración diaria de 50 mg [42]. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo para bovinos, serían explicados por la existencia de excreción biliar de Bicalutamida conjugada conjuntamente con su reabsorción basada en la circulación enterohepática descrita para otras especies animales [42, 71, 82] que causaría el efecto de acumulación.

Los resultados obtenidos para Andarina presentaron una máxima concentración rápida (4 h) en todas las matrices y una disminución rápida, resultando no detectable al día 3 (en orina y suero). Este comportamiento es similar a estudios previos realizados en otros animales con una rápida aparición en sangre, indicando una veloz absorción digestiva [56, 71, 84].

Comparando las concentraciones de Bicalutamida y Andarina en porcinos, se observa que Bicalutamida tiene una permanencia mayor en los animales, siendo detectada hasta el último día de muestreo en todas las matrices. En cambio, Andarina se elimina de forma veloz, también la absorción es rápida y por esta razón presentan gráficos de “picos agudos” en suero, orina y heces. Los resultados presentados en este trabajo, referidos a rápida absorción y comportamiento distintivos de permanencia para Bicalutamida y Andarina, son similares a los descritos en trabajos previos realizados en otros animales que indican una vida media más corta de Andarina [18] y larga como se mencionó previamente para Bicalutamida.

Observando las figuras construidas con las concentraciones de Andarina en las distintas matrices, se puede indicar un primer inconveniente para los laboratorios de control debido a su corto periodo de detección. Estos inconvenientes analíticos fueron mencionados en trabajos previos realizados con animales de laboratorio y animales de competición deportiva [56, 84, 85]. El metabolismo de Andarina se describe como tan intenso que a bajas dosis no es posible encontrar la droga padre en orina [71]. En nuestro caso, se podría suponer que la dosis administrada sería suficientemente alta como para superar/saturar la capacidad de las vías metabólicas de eliminación del porcino y por esta razón encontramos Andarina en orina y heces.

Este comportamiento distintivo observado, entre Bicalutamida y Andarina, también se observó al calcular algunos parámetros séricos que se presentan en el Anexo XI debido a que exceden los objetivos del presente trabajo y porque no se cuenta con suficiente información por trabajar con un número pequeño de animales (ver Cálculo de parámetros séricos, *pág.217*).

Estudio de metabolitos

En el *segundo ensayo* con animales también se realizó la búsqueda de metabolitos según la estrategia descrita en el *primer ensayo* con animales (ver *Estudio de metabolitos*; *pág.87*). En el caso de los animales tratados con Casodex[®] el trabajo de búsqueda de metabolitos se simplificó por contar con los fragmentos característicos (ver Anexo VI; *pág. 182*). En el caso del porcino tratado con Andarina, primero se establecieron los fragmentos característicos (ver Anexo IX; *pág. 204*) y luego se realizaron análisis en modo SCAN y modo SRM como se describió. En todos los casos se contrastaron los resultados para descartar la aparición en las muestras blanco de los animales sin tratamientos y las muestras blanco tomadas de cada animal, previa administración de las drogas.

La aplicación del Método Simplificado para Orina y del Método Simplificado para Heces (descritos en *pág. 76*) se realizó para evitar pérdidas de metabolitos durante el método de SPE (Figura 14 y Figura 15, *pág. 79*). Sin embargo, se encontraron mejores resultados con el método que utiliza SPE, probablemente porque implica una etapa de concentración que mejora y aumenta la señal de los metabolitos en el detector.

Metabolitos de Bicalutamida

Luego de administrar Casodex[®] (CDX) a bovinos y a un porcino (ver Tabla 9; *pág. 70*) se analizaron muestras de orina y heces para la identificación de metabolitos (ver *Estudio de metabolitos*; *pág.87*). Los resultados obtenidos de la hidrolisis enzimática, que revela la presencia de metabolitos conjugados se presentan en las Figura 26 (*pág. 106*) y Figura 27 (*pág. 107*).

La Tabla 19 muestra los iones relevantes encontrados en modo SCAN y con un asterisco se marcan las reacciones confirmadas en modo SRM. La

información presente en esta tabla muestra que los metabolitos encontrados son los mismos encontrados previamente, como se describe en la Tabla 15 (*Estudio de metabolitos*; pág. 87). Por esta razón recibieron la misma notación: M1, M2, M3, M4 y M5.

Tabla 19. Metabolitos de Bicalutamida encontrados en los bovinos tratados con Casodex®.

Resultados del estudio MS en modo Scan y modo SRM.

	M1	M2	M3	M4	M5
[M-H]	605	621	445	509	525
Iones relacionados (m/z)	587	603	427	411	507
	543	445	185*	173*	445*
	429	427	255*	185*	427
	411*	185*	189*	255*	255*
	193*	255*			185*
	185	175			175
	255	271			
	159*	173			
		159			

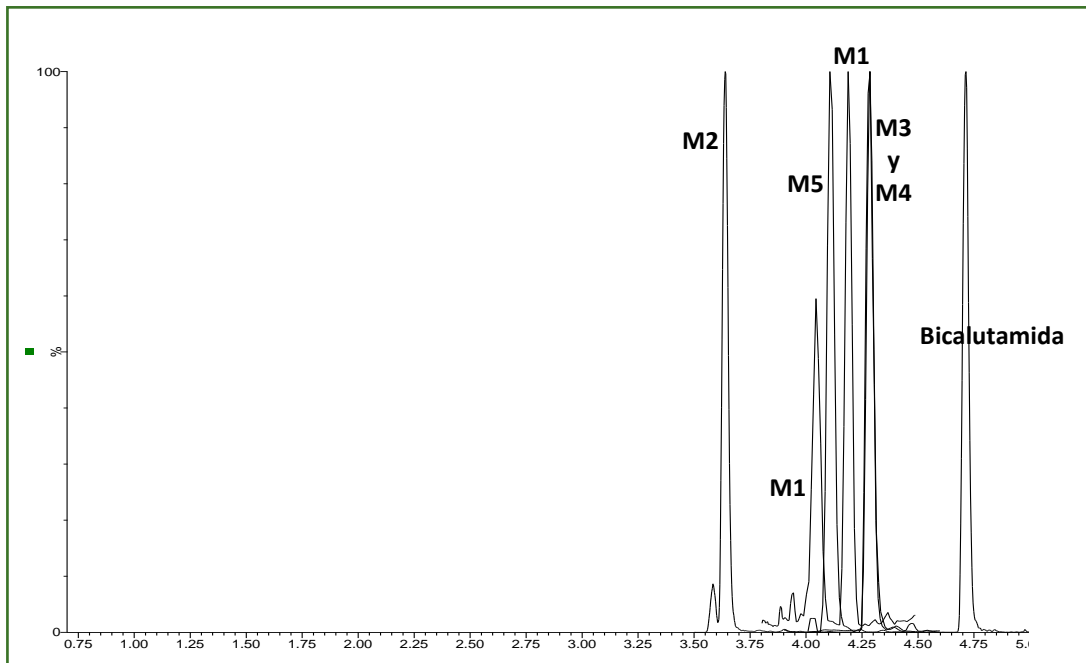


Figura 33. Cromatograma compuesto de bovino con dosis de 200 mg Casodex.

Las señales corresponden a SRM: M1: 605>411; M2: 621>255; M3: 445> 255; M4: 509>255; M5: 525>255 Bicalutamida: 429,1>255,1

La Figura 33 muestra un cromatograma compuesto construido con los resultados obtenidos del bovino tratado con 200 mg de Casodex[®]. En orden de aparición pueden verse 2 picos correspondientes a M2, el más grande a 3,64 min; un primer pico de M1 a 4,04 min; luego un pico de M5 (4,11 min); otro pico de M1 (4,19 min); los picos de M3 y M4 salen juntos a 4,29 min y finalmente Bicalutamida (4,71 min).

Comparando los cromatogramas compuestos de la Figura 18 (pág. 90) con la Figura 33, se pueden observar diferencias en todos los tiempos de retención de los picos, esto se debe a que el sistema cromatográfico empleado en INTA – Concordia fue distinto al usado en LabERCA (Nantes).

Otra diferencia es la ausencia de los metabolitos M2c y M2d en el cromatograma de la Figura 33, una explicación podría ser que estos animales no producen los metabolitos M2 ausentes, lo cual podría deberse a diferencias intra-especies debido a la existencia de distintas isoformas de algunas enzimas intervinientes en el metabolismo de los SARMs [83]. Otra explicación podría ser, la mencionada anteriormente, al cambiar el sistema cromatográfico podemos pensar en que nuestro método/instrumentos aplicados en este ensayo no son capaces de detectarlos en una baja concentración en la que fueron producidos. Otra explicación sería que las sustancias administradas en ambos casos (Casodex[®]) fueron productos comerciales y podrían tener algunas diferencias mínimas en su composición, dado que si bien fueron elaboradas por el mismo fabricante, fueron adquiridas en diferentes países y años. La falta o una mínima producción de M2c o M2d en los animales tratados, podría ser la causa más probable debido a que los ensayos realizados estuvieron sujetos a una gran variabilidad biológica (raza, estado fisiológico, edad, etc.). Por último, tampoco se puede descartar la combinación de todas las causas antes mencionadas como otra explicación.

Se pueden observar los detalles de los metabolitos, los iones y los SRM empleados para la identificación y se indica el sistema cromatográfico en el Anexo X (pág. 206).

La Tabla 20 presenta los iones encontrados en muestras del porcino luego de analizar la información obtenida en modo SCAN y en modo SRM, con un

asterisco se destacan aquellos iones (m/z) que se utilizan para la confirmación de los metabolitos. Comparando con los resultados previos de bovinos en este estudio (Tabla 19 y Tabla 15), destaca la ausencia de M5 y de otros metabolitos.

Tabla 20. Metabolitos de Bicalutamida encontrados en el porcino tratado con Casodex®.

Resultados del estudio MS en modo Scan y modo SRM.

	M1	M2	M3	M4
[M-H]⁻	605	621	445	509
Iones (m/z)	587	603	427	411
	561	445	409	185*
	543	365	185*	255*
	429	185*	255*	
	411*	255*	189*	
	185	175		
	255	189		
		271		
		173		
		159		

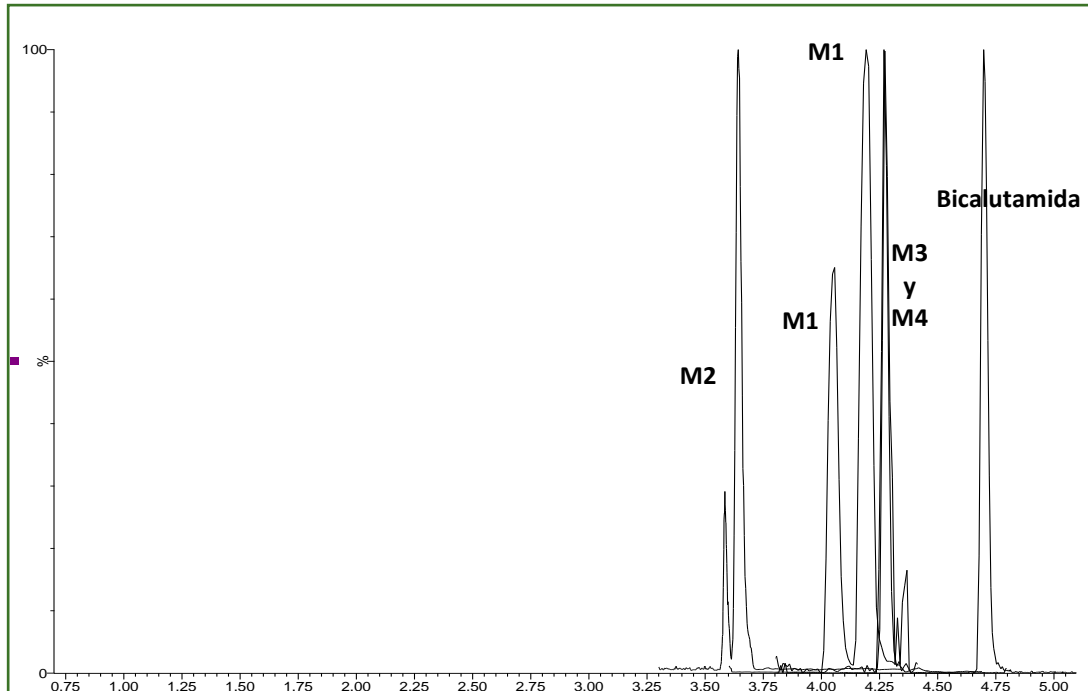


Figura 34. Cromatograma compuesto de muestras de orina y heces porcino tratado con Casodex®

(M1: 605>411; M2: 621>255; M3: 445> 255; M4: 509>255 y Bicalutamida: 429>255).

La Figura 34 presenta un cromatograma compuesto correspondiente a muestras de orina y heces del porcino tratado con Casodex[®]. Esta figura fue construida con SRM que confirman la presencia de los metabolitos M1, M2, M3, M4 y de Bicalutamida. Como se esperaba este cromatograma muestra tiempos de retención similares a los metabolitos en bovinos tratados con Casodex[®]. En orden de aparición se puede observar: M2 con dos picos y el de mayor tamaño a 3,65 min; dos picos correspondientes a M1 (4,04 min y 4,19 min); nuevamente M3 y M4 tienen elución casi simultánea (4,3 min). Se presentan más detalles de los metabolitos, los iones y los SRM empleados para la identificación en el Anexo X (pág. 206).

Estudio de metabolitos de Andarina en porcino

La estrategia empleada para el estudio de metabolitos de Andarina fue la misma que para Bicalutamida: realizar una búsqueda de candidatos en una mezcla de orina y heces (de varios días) basados en los fragmentos característicos (Anexo IX; pág. 204); proponer estructuras que expliquen los iones, confirmar las estructuras y finalmente determinar la “*ventana temporal*” de eliminación de estos metabolitos en orina y en heces.

La Tabla 21 muestra los iones destacados para la identificación de cada uno de los metabolitos encontrados y se marca con asteriscos los iones confirmados por SRM y MRM.

Tabla 21. Metabolitos de Andarina encontrados en porcino.

	DM1	DM2	DM3	DM4	DM5	DM6	DM7	DM8	DM9	DM10	DM11	DM12
M-H	205	221	301	307	397	398	410	426	590	483	616	494
iones (m/z)	175*	190*	221*	205*	221*	261*	150*	261*	572*	205*	465*	414*
	159*	175*	190*	234*	171*	205*	175	289*	261*	277*	205	289*
	155*	171*	171*	175*	205	175*	221	205	175	205	150*	261*
			155*	155		171		175	205	171	440*	205*
				277							261	175
											289	221

En la Tabla 21 hay de 12 metabolitos de Andarina, marcando una gran diferencia con Bicalutamida que presentó solo 4 metabolitos en porcino (Tabla 20). Este resultado indicaría el intenso metabolismo que sufre la droga en el

porcino como se describe en trabajos previos realizados por otros autores y destacado en este trabajo como indica el corto período de detección (48 h) [71] [84].

En la Figura 35 se presenta un cromatograma compuesto correspondiente a muestras del porcino tratado. La figura está construida con SRM de los 12 metabolitos identificados como “DM” (DM1 a DM12). En orden de aparición, se puede observar en el minuto 2,42 el pico de DM9; DM5 a 3,05 min; en 3,37 min simultáneamente tres picos correspondientes a DM7, DM3 y DM2; el pico de DM6 (3,56 min) y el de DM10 (3,58 min) están muy próximos; los picos de DM1 y DM4 están juntos en 3,84 min; juntos también los picos de DM12 y DM11 en 3,94 min; el pico de Andarina está en el minuto 4,50 y muy próximo se encuentra el pico de DM8 (4,51 min). En el Anexo X se presentan otros gráficos que muestran de forma detallada el orden de elución y los SRM empleados para la identificación de los metabolitos encontrados. La presencia de los metabolitos encontrados fueron previamente descrito en otros trabajos *in vitro* e *in vivo* [47, 48, 52, 56, 86].

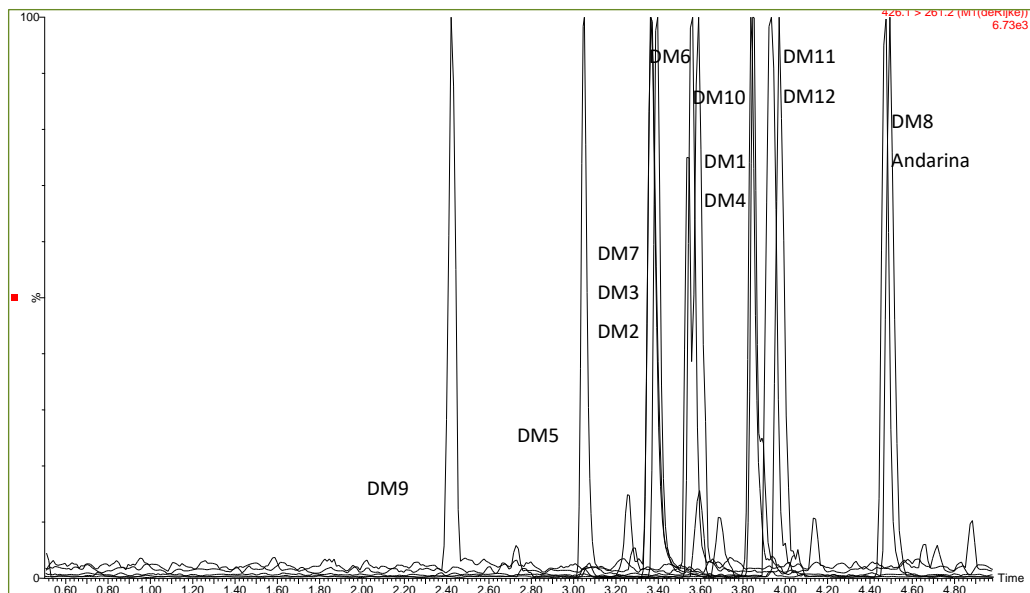


Figura 35. Cromatograma compuesto correspondiente a muestras de orina y heces del porcino tratado con Andarina

(DM1: 205>175; DM2: 221>175; DM3: 301>221; DM4: 307>205; DM5: 397>221; DM6: 398,1>205; DM7: 410,1>150; DM8: 426,1>261,2; DM9: 590>261; DM10: 483,1>205; DM11: 616,1>440,1; DM12: 494>414,1 y Andarina: 440,1>261).

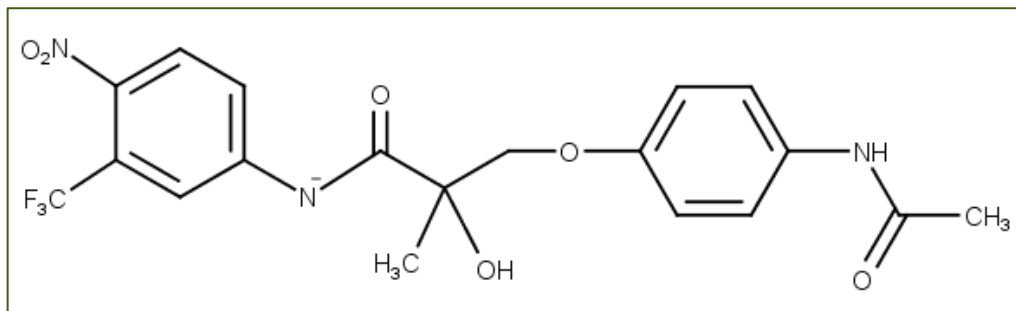


Figura 36. Estructura química de Andarina ($m/z = 440$).

DM1: Este metabolito correspondería al fragmento desprotonado proveniente de la ruptura del enlace amida que une los anillos de Andarina (Figura 36. Estructura química de Andarina ($m/z = 440$)). La Figura 37 muestra la estructura química propuesta, consistente con estudios previos [56] que genera el fragmento $m/z = 175$ por la pérdida de un grupo NO; $m/z = 159$ de la pérdida de un grupo NO_2 y $m/z = 155$ de la pérdida de un grupo HNOF. En la Tabla 21, pueden verse los fragmentos encontrados y en el Anexo X detalles cromatográficos (pág. 213).

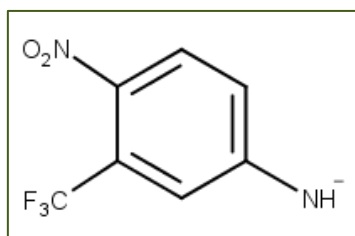


Figura 37. Estructura química propuesta para el metabolito DM1 ($m/z = 205$).

DM2: Correspondería a la forma hidroxilada de DM1. La Figura 38 muestra la probable estructura química que explicaría los fragmentos encontrados: $m/z = 190$ por la pérdida de HNO; $m/z = 175$ por pérdida de NO y $m/z = 171$ por pérdida de HNOF. En la Tabla 21, pueden verse los fragmentos encontrados y en el Anexo X detalles cromatográficos (pág. 213). Las limitaciones del estudio realizado con espectrometría de masas no permiten identificar la posición del enlace del hidroxilo y por esta razón la Figura 38

presenta ese enlace deslocalizado hacia el centro del anillo. Este metabolito fue previamente reportado en orina de caballos tratados con Andarina [56].

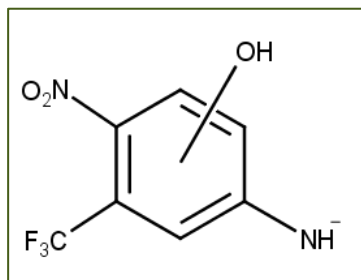


Figura 38. Estructura química propuesta para el metabolito DM2 ($m/z = 221$).

DM3: Correspondería al derivado conjugado con sulfato de DM1. La Figura 39 muestra la probable estructura química que explicaría los fragmentos encontrados: $m/z = 221$ por la pérdida de SO_3 ; $m/z = 190$ por pérdida de HNO y SO_3 ; $m/z = 171$ por pérdida de HNOF y SO_3 ; $m/z = 155$ por la pérdida de HNO_2F y SO_3 . En la Tabla 21 y en el Anexo X detalles cromatográficos (pág. 213) pueden verse los fragmentos encontrados. Este metabolito fue previamente reportado en orina de caballos tratados con Andarina [56]. Las limitaciones del estudio realizado con espectrometría de masas no permiten identificar la posición del enlace del $-\text{OSO}_3\text{H}$ y por esta razón la Figura 39 presenta ese enlace deslocalizado hacia el centro del anillo.

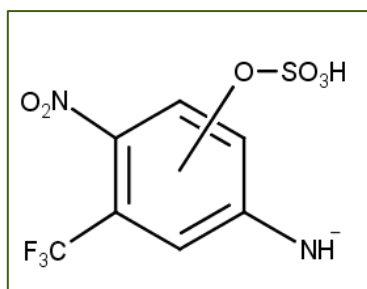


Figura 39. Estructura química propuesta para el metabolito DM3 ($m/z = 301$).

DM4: El tiempo de retención y fragmentos de este metabolito son consistentes con un metabolito descrito en trabajos previos [47-49, 52, 86]. Al igual que en otros trabajos previos, en este no se puede proponer una estructura debido a que por su tamaño ($m/z = 307$) podría tratarse de la

Andarina desfenilada, pero los fragmentos ($m/z = 234$; $m/z = 205$; $m/z = 175$) que se observan con la espectrometría de masas no concuerdan con la estructura de Andarina desfenilada.

DM5: Este metabolito correspondería a DM1 conjugado con ácido glucurónico. Los fragmentos que revela la espectrometría de masas son consistentes: $m/z = 221$ por pérdida del ácido quedando el hidroxí-derivado y $m/z = 171$ cuando además pierde HNOF. En la Tabla 21 y en el Anexo X detalles cromatográficos (pág. 213), pueden verse los fragmentos encontrados. Este metabolito fue previamente reportado en orina de caballos tratados con Andarina [56]. Las limitaciones del estudio realizado con espectrometría de masas no permiten identificar la posición del enlace del ácido glucurónico y por esta razón la Figura 40 presenta ese enlace hacia el centro del anillo.

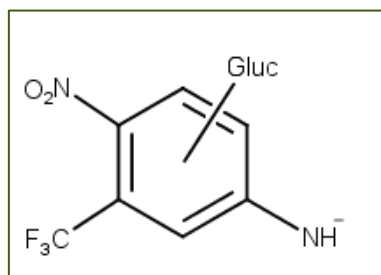


Figura 40. Estructura química propuesta para el metabolito DM5 (m/z : 397).

DM6: Correspondería a la Andarina desacetilada y desprotonada como muestra la Figura 41. Los fragmentos encontrados son consistentes con esta estructura: $m/z = 261$ es un fragmento característico de Andarina (Figura 36) que se genera por pérdida del anillo amino-fenilo con un posterior reordenamiento [52]; $m/z = 205$ producido por ruptura del enlace amida que une ambos anillos de DM6 [52], como se explicó para DM1; $m/z = 175$ generado a partir de $m/z = 205$ por pérdida de NO. En la Tabla 21 y en el Anexo X detalles cromatográficos (pág. 213), pueden verse los fragmentos encontrados.

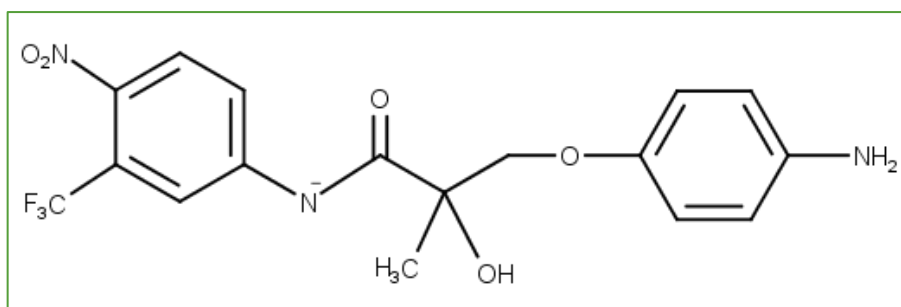


Figura 41. Estructura química propuesta para el metabolito DM6 (m/z : 398).

DM7: Correspondería a la forma desprotonada de la nitro-reducción de Andarina (Figura 36) con una diferencia de 30 Da. La estructura propuesta se presenta en la Figura 42. Este metabolito fue previamente reportado en orina de caballos tratados con Andarina [56]. En la Tabla 21 pueden verse los fragmentos encontrados en los ensayos de espectrometría de masas incluyendo $m/z = 150$ correspondiente al fragmento fenil-acetamida producido por la ruptura del enlace éter en la cadena que une los anillos (ver Anexo IX, *Fragmentos característicos de Andarina* pág. 204).

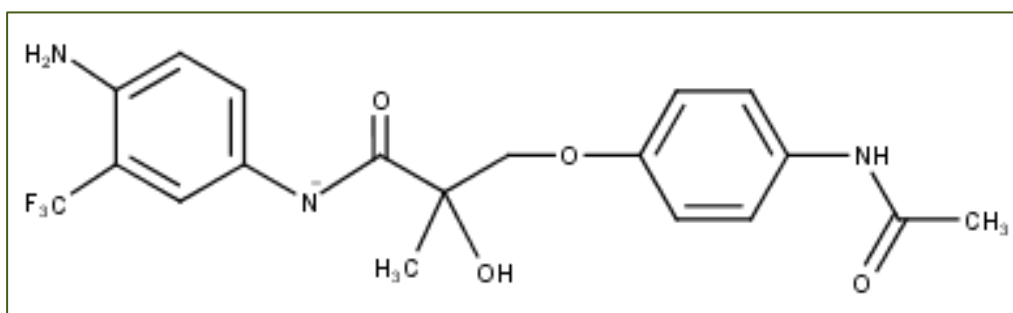


Figura 42. Estructura química propuesta para el metabolito DM7 (m/z : 410).

DM8: Este metabolito correspondería a DM7 hidroxilado. Hay varios sitios en los cuales puede ingresar el oxidrilo de ambos anillos. La aparición de $m/z = 261$ (como se describe en DM6) y $m/z = 289$ correspondiente a la pérdida del grupo fenil-acetamida, indica que el anillo trifluorometil sustituido no recibe al oxidrilo. Por esta razón la Figura 43 muestra al oxidrilo en el anillo fenilo sin indicar una posición exacta, debido a las limitaciones del estudio realizado. Este metabolito fue reportado en durante un ensayo *in vitro*

incubando Andarina en un sistema enzimático que reproduciría condiciones de un organismo vivo [49]. En la Tabla 21 y en el Anexo X detalles cromatográficos (pág. 213), pueden verse los fragmentos encontrados.

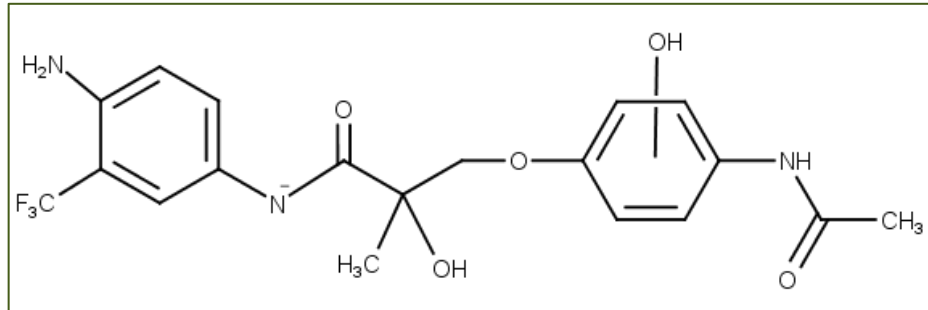


Figura 43. Estructura química propuesta para el metabolito DM8 (m/z: 426).

DM9: Correspondería a la forma desprotonada de Andarina (Figura 36) desacetilada y conjugada con ácido glucurónico. La presencia de $m/z = 261$ indica que el anillo trifluorometil sustituido permanece sin cambios y $m/z = 572$ indica la pérdida de H_2O . La Figura 44 muestra el ácido glucurónico en el anillo desacetilado y debido a las limitaciones del trabajo con espectrometría de masas realizado no se puede determinar la posición exacta y por esta razón se grafica un enlace deslocalizado hacia el centro del anillo. Este metabolito fue reportado durante un ensayo *in vitro* incubando Andarina en un sistema enzimático que reproduciría condiciones de un organismo vivo [52]. En la Tabla 21 y en el Anexo X detalles cromatográficos (pág. 213), pueden verse los fragmentos encontrados.

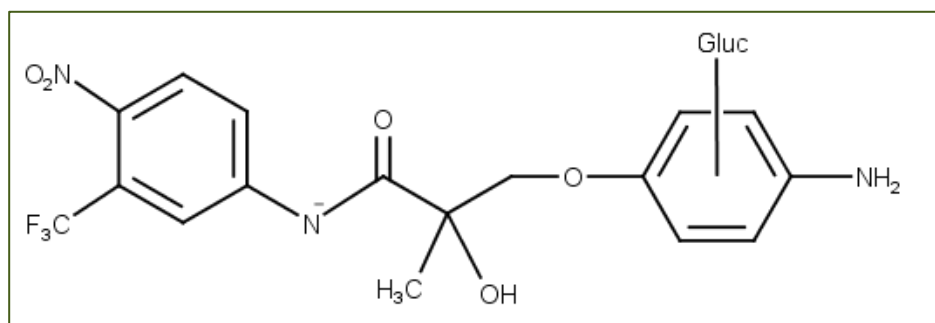


Figura 44. Estructura química propuesta para el metabolito DM9 (m/z: 590).

DM10: En la Figura 45 se muestra la estructura química propuesta para este metabolito. Sin embargo, no es la única posibilidad. Correspondería al derivado conjugado con ácido glucurónico proveniente de la ruptura del enlace éter en la cadena que une los anillos de la Andarina (Figura 36). La presencia del $m/z = 205$ indica ausencias de cambios en el anillo trifluorometil sustituido y $m/z = 277$ es consistente con DM10 que pierde el ácido glucurónico y un metilo. Debido a las limitaciones del trabajo realizado con espectrometría de masas, otra estructura química posible sería que el grupo ácido se una al oxidrilo del carbono asimétrico. Este metabolito fue reportado durante un ensayo *in vitro* incubando Andarina en un sistema enzimático que reproduciría condiciones de un organismo vivo [52]. En la Tabla 21 y en el Anexo X detalles cromatográficos (pág. 213), pueden verse los fragmentos encontrados.

La presencia de DM10 está descrita en trabajos previos que además indican la presencia del metabolito correspondiente a su aglicón (m/z : 307) [52]. Las explicaciones pueden ser varias o combinaciones de ellas, porque podría ser no detectable por la baja concentración de m/z : 307, también podría pasar que las condiciones del detector de masas no favorecen la adquisición de carga eléctrica del fragmento [87] o por el *efecto de supresión iónica* [88] no se detecta m/z : 307.

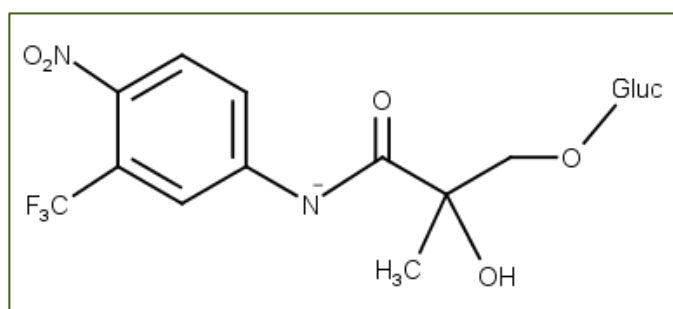


Figura 45. Estructura química propuesta para el metabolito DM10 (m/z : 483).

DM11: Este metabolito correspondería a la forma desprotonada de la Andarina conjugada con ácido glucurónico. Los fragmentos encontrados son consistentes con la estructura propuesta (Figura 46) $m/z = 440$ sería el

resultado de la pérdida del ácido conjugado; $m/z = 465$ mostraría el resultado de la eliminación del anillo fenil-acetamida (como pérdida neutra) y $m/z = 150$ es el anillo fenil-acetamida desprotonado. Este metabolito fue reportado durante un ensayo *in vitro* incubando Andarina en un sistema enzimático que reproduciría condiciones de un organismo vivo [52].

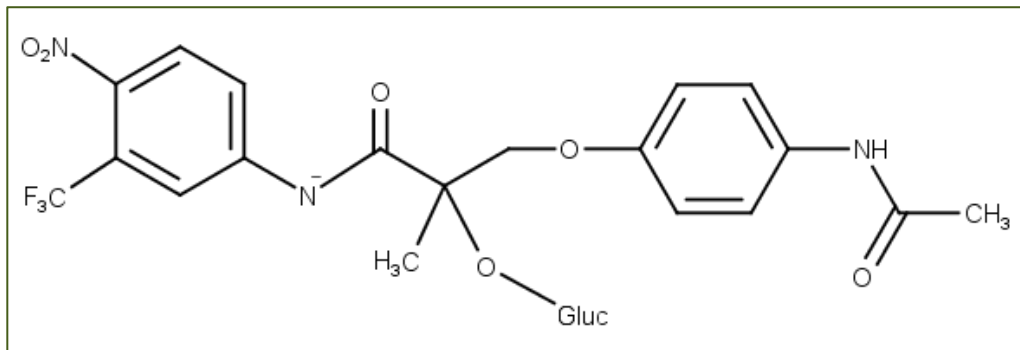


Figura 46. Estructura química propuesta para el metabolito DM11 (m/z : 616).

DM12: Correspondería al metabolito desprotonado de sulfato conjugado de la Andarina (Figura 47). Los fragmentos encontrados son consistentes con la estructura química propuesta: como se explicó anteriormente $m/z = 205$ y $m/z = 261$ indican ausencia de cambios en el anillo trifluorometilado; $m/z = 414$ refleja la pérdida de SO_3 y $m/z = 289$ corresponde a la pérdida del grupo fenil-acetamida. Este metabolito fue reportado en un ensayo *in vitro* incubando Andarina en un sistema enzimático que reproduciría condiciones de un organismo vivo [52]. En la Tabla 21 y en el Anexo X detalles cromatográficos (pág. 213), pueden verse los fragmentos encontrados.

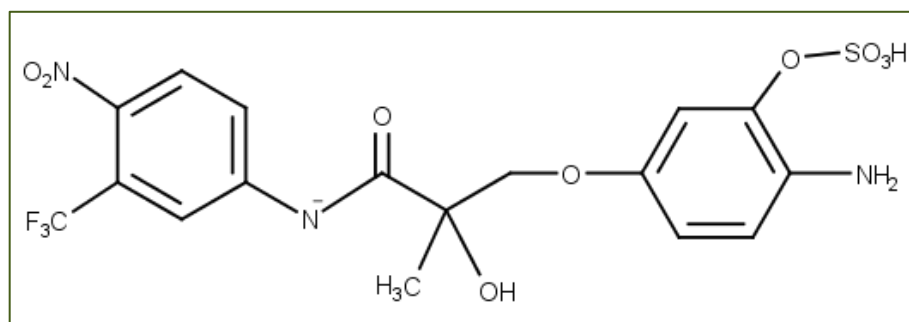


Figura 47. Estructura química propuesta para el metabolito DM12 (m/z : 494).

La aparición de Andarina junto a sus metabolitos en las excretas del cerdo tratado indica su absorción intestinal. La aparición de 12 metabolitos muestra un metabolismo intenso en el porcino al igual que para animales de laboratorios y en caballos [56, 84].

Eliminación de los metabolitos en orina y heces

La construcción de las estructuras de cada metabolito se realizó combinando la información de la bibliografía y los datos de los ensayos trabajando de diferentes modos con espectrometría de masas.

Sin embargo, un objetivo clave para este trabajo es evaluar la ventana temporal de aparición y la presencia de los metabolitos propuestos en cada matriz. En el caso de Bicalutamida se utilizaron las transiciones detalladas en la Tabla 16 (pág. 95) y en el caso de metabolitos de Andarina se indican en la Tabla 22.

Tabla 22. Transiciones MRM de los metabolitos de Andarina.

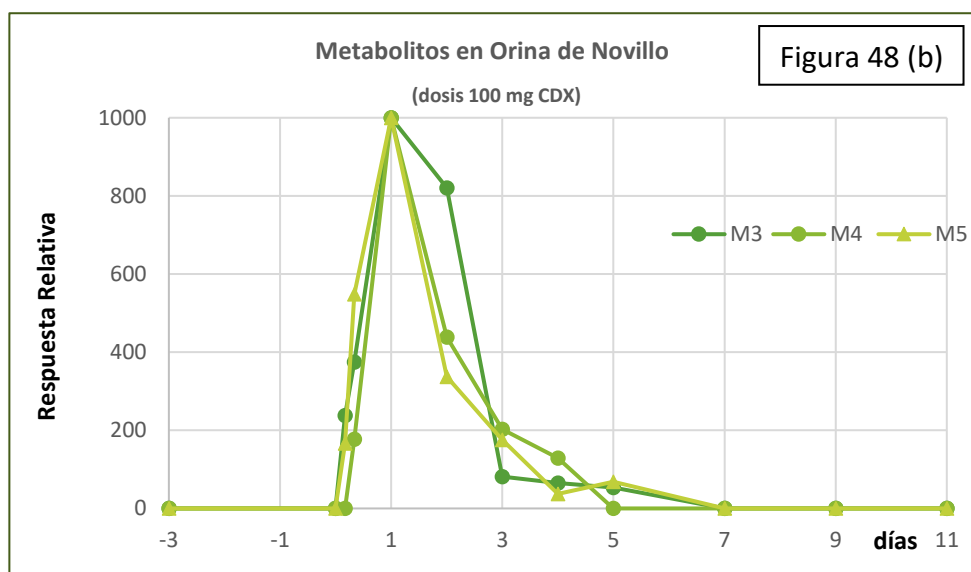
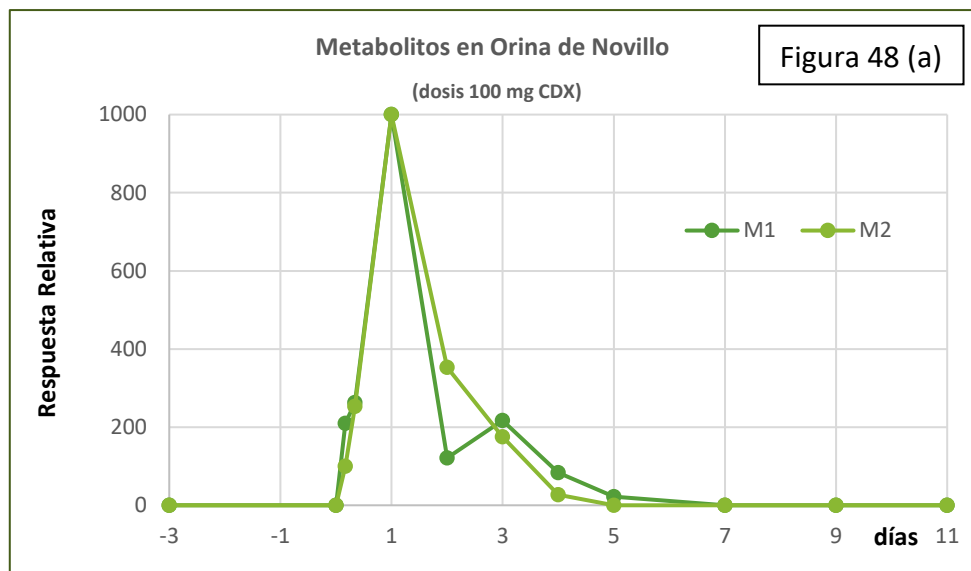
	[M-H ⁻]	MRM (m/z)		
M1	205	205>175	205>159	205>155
M2	221	221>190	221>175	221>171
M3	301	301>221	301>171	
M4	307	307>234	307>205	307>175
M5	397	397>221	397>171	
M6	398	398>175	398>205	398>261
M7	410	410>150		
M8	426	426>289		
M9	590	590>261		
M10	483	483>205		
M11	616	616>440	616>461	616>261
M12	494	494>414		

A continuación, se presentan los perfiles de excreción de metabolitos obtenidos del análisis de las muestras obtenidas durante el ensayo.

Las Figura 48 (a - p) muestran los resultados obtenidos para bovinos (a - k) y porcino (m - p) tratados con Casodex[®] y las Figura 49 (a - k) corresponde al porcino tratado con Andarina. Los gráficos están construidos sobre una base arbitraria, donde la señal de cada figura es relativa a la máxima señal obtenida

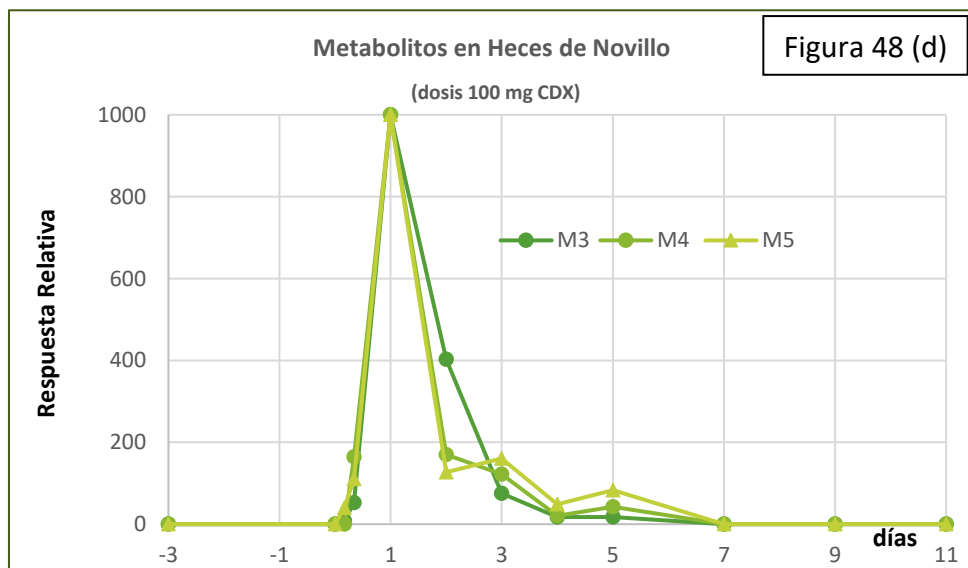
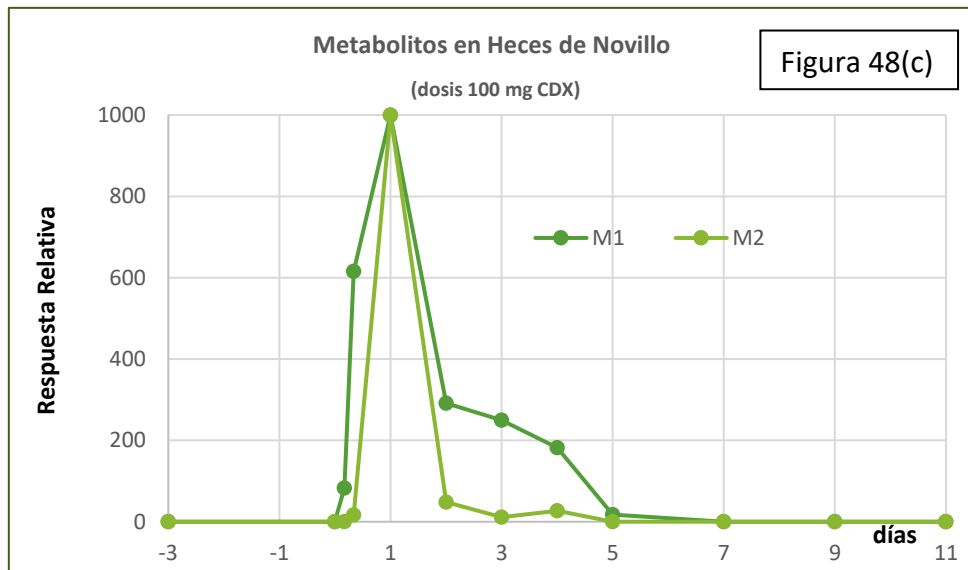
para cada metabolito en cada animal. Se realizó de esta manera puesto que al no contar con los estándares patrones de cada metabolito no se podía transformar la señal en unidades de concentración (al momento del ensayo). Sin embargo, estos gráficos son muy importantes para el control analítico en prácticas ganaderas, puesto que indican qué metabolitos son característicos de cada matriz y, además, por cuánto tiempo permanecen detectables. En el Anexo XI (pág. 217) se presentan las tablas con los datos usados para la construcción de estas figuras.

Figura 48. Perfiles de excreción de metabolitos de Bicalutamida.



En las Figura 48 (a), (b), (d) y (c) se puede ver la eliminación de los metabolitos de Bicalutamida en orina y heces del bovino tratado con 100 mg de Casodex[®]. Se puede observar que el pico de los metabolitos aparece en el día 1, hay un aumento rápido y una disminución lenta describiendo curvas asimétricas.

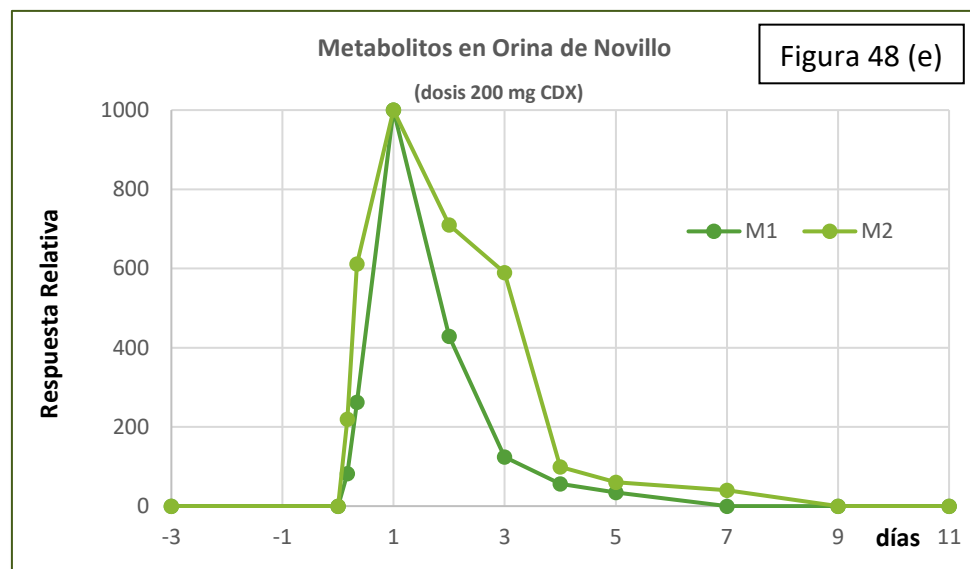
Algunos metabolitos fueron detectados hasta el día 5 (M1; M3 y M5) en orina y heces, mientras que la droga sin modificaciones se detectó hasta el día 11 en heces y hasta el día 7 en orina.

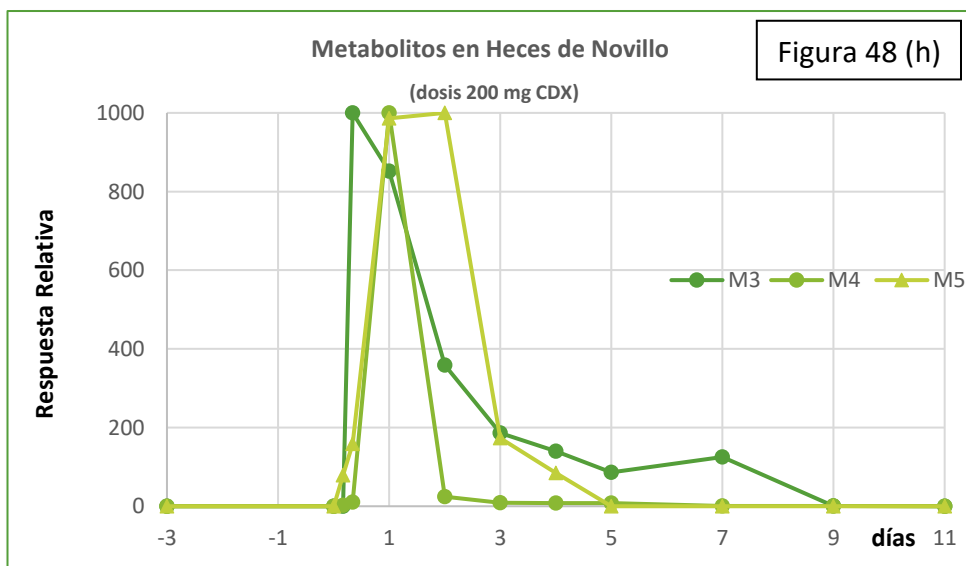
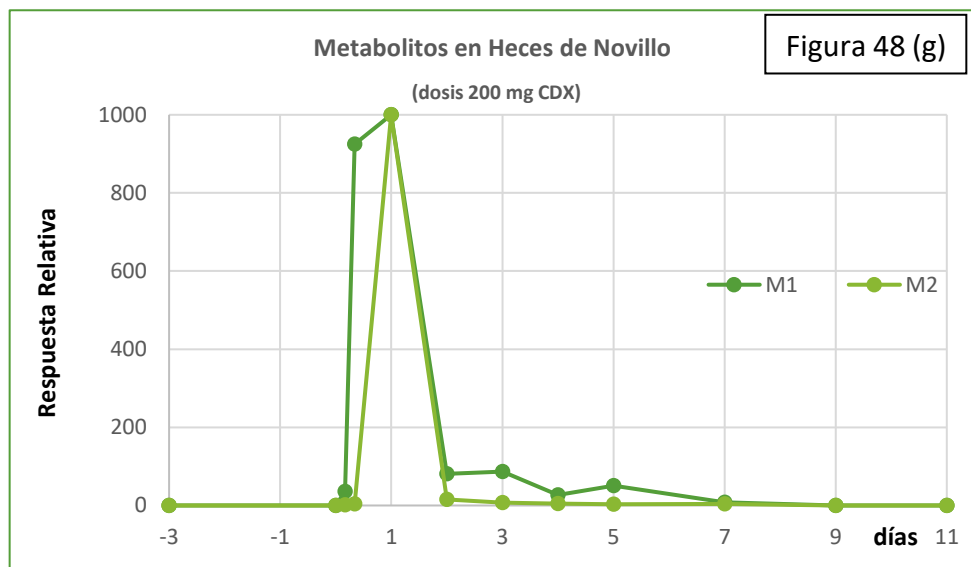
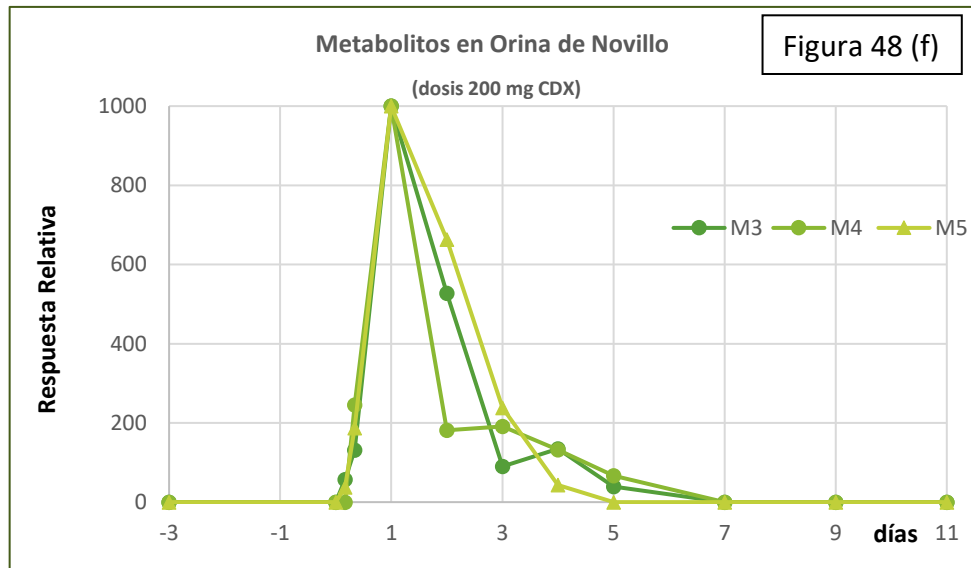


Las Figura 48 (e), (f), (g) y (h) muestran la eliminación del bovino tratado con 200 mg de CDX. Se puede observar que las concentraciones de los

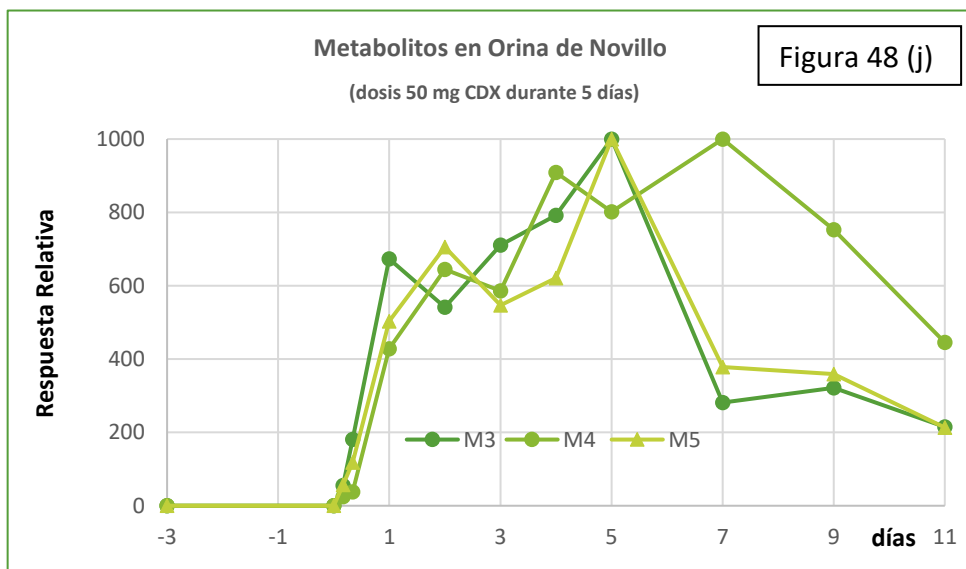
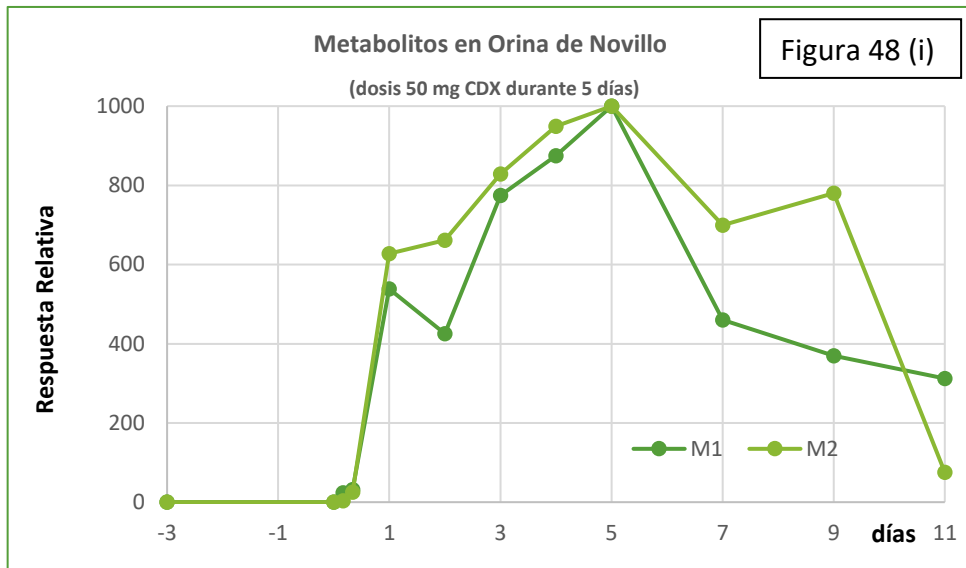
metabolitos aumenta rápido al inicio, hasta las 8hs para M3 y el día 1 y para el resto, luego la disminución es mas lenta, dando curvas asimétricas.

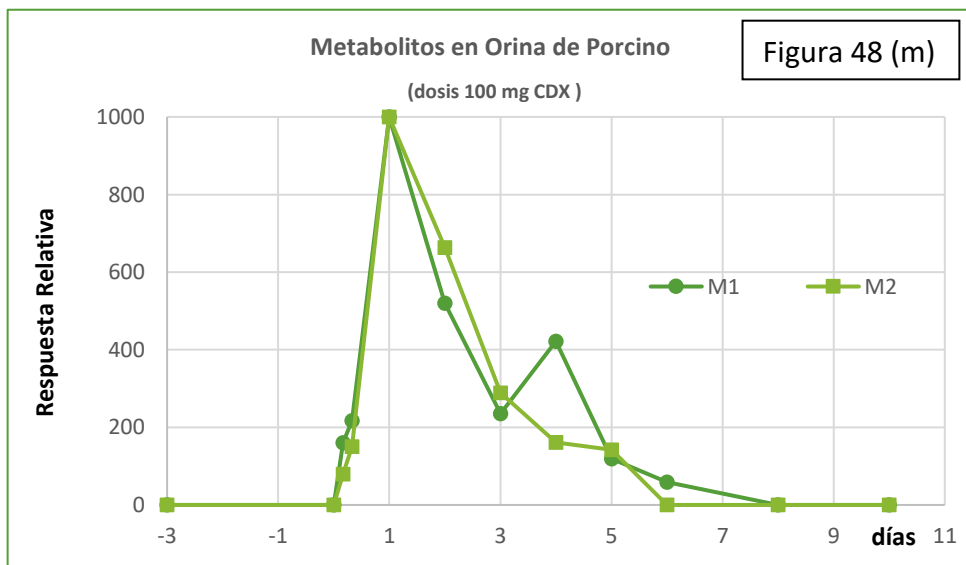
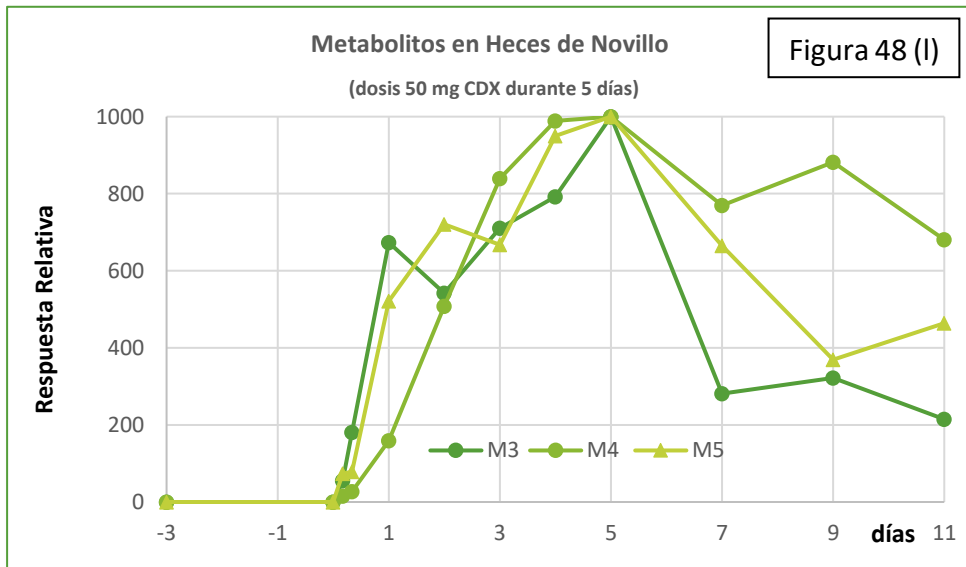
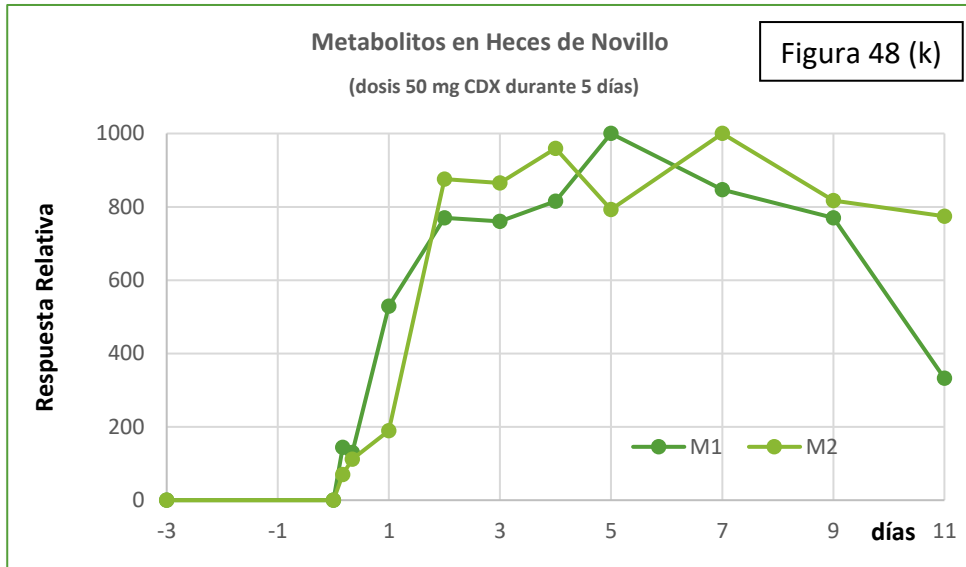
Los metabolitos que permanecen mas tiempo detectables lo hacen hasta el día 9 en heces (M4) y día 7 en orina (M2), mientras que la Bicalutamida (sin modificación) permanece detectable hasta el día 11 en heces y el día 9 en orina. Esta prolongación del período de detección de Bicalutamida comparado con el bovino que recibió 100 mg podría relacionarse con la mayor dosis y a causa de la reabsorción intestinal de Bicalutamida (*circulación enterohepática*) [42]. Por otra parte, el hecho de detectar metabolitos y Bicalutamida durante mayores periodos de tiempo en heces que en orina podría deberse al hecho de utilizar materia fecal liofilizada que tiene un efecto de concentración de sustancias no volátiles y no al hecho de que en orina no se eliminen metabolitos en el mismo período de tiempo.

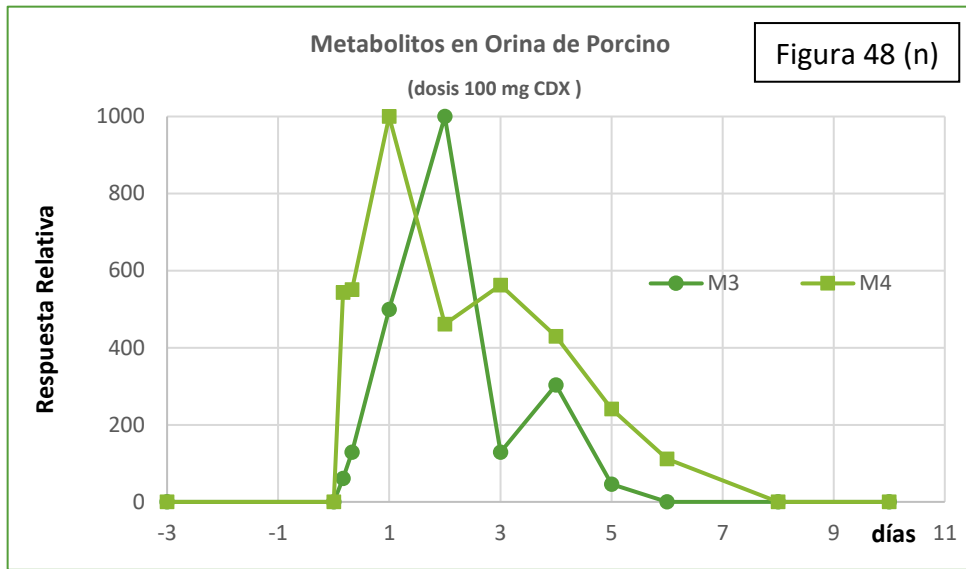




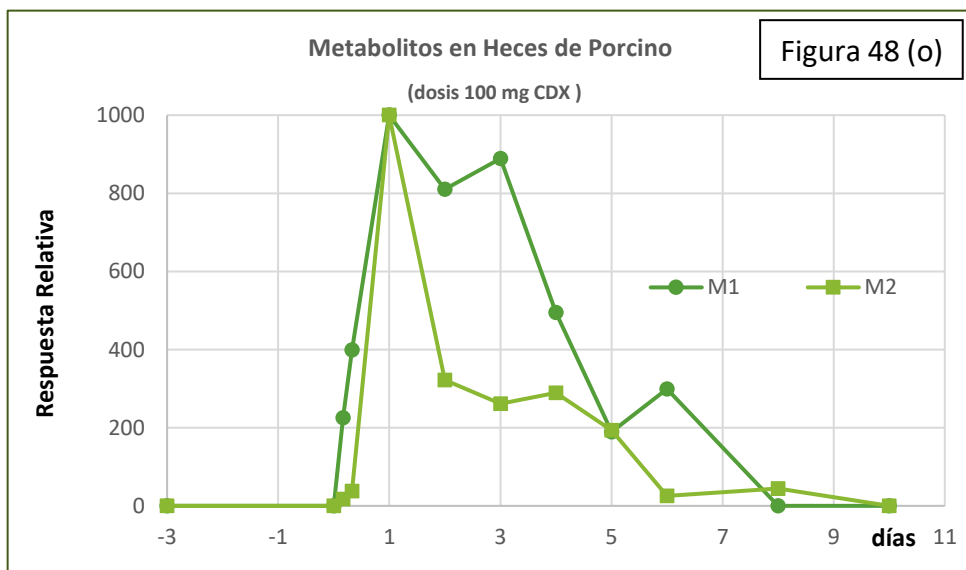
Las Figura 48 (i), (j), (k) y (l) presentan las variaciones de señal relativa de orina y heces de los metabolitos identificados para el bovino que recibió las 5 dosis diarias de 50 mg. En orina, se puede ver que todos los metabolitos aumentan rápidamente hasta el día 1 y que luego se incrementan lentamente; M4 continúa aumentando su señal hasta el día 7 mientras que el resto de los metabolitos presentan su máximo al día 5; finalmente todos disminuyen lentamente permaneciendo detectables hasta el final del ensayo. En heces, el comportamiento es muy similar, pero en esta matriz es M2 quien aumenta su señal hasta el día 7.







Las Figura 48 (m), (n), (o) y (p) muestran las variaciones de las señales relativas de los metabolitos encontrados en orina y en heces del porcino tratado con 100 mg de CDX. Se observa que luego de la administración de la droga (día 0) el aumento de las señales es rápido mostrando los máximos al día 1 y solo M3 en orina muestra su máximo en el día 2. Luego la disminución es lenta para todos los metabolitos, describiendo curvas asimétricas. En orina, se detectan metabolitos hasta el día 6 y en heces hasta el día 8, mientras que Bicalutamida es detectable hasta el final de la prueba (día 10).



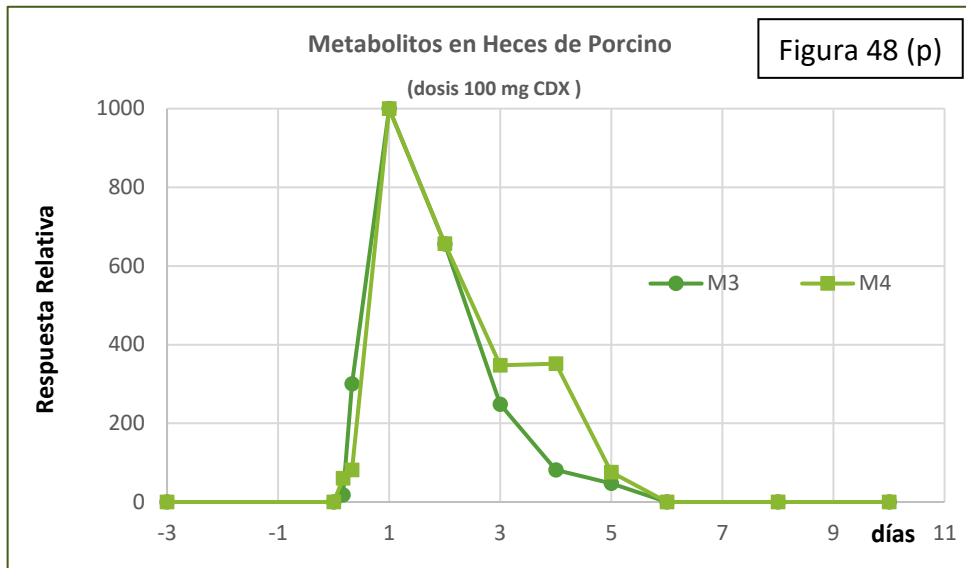
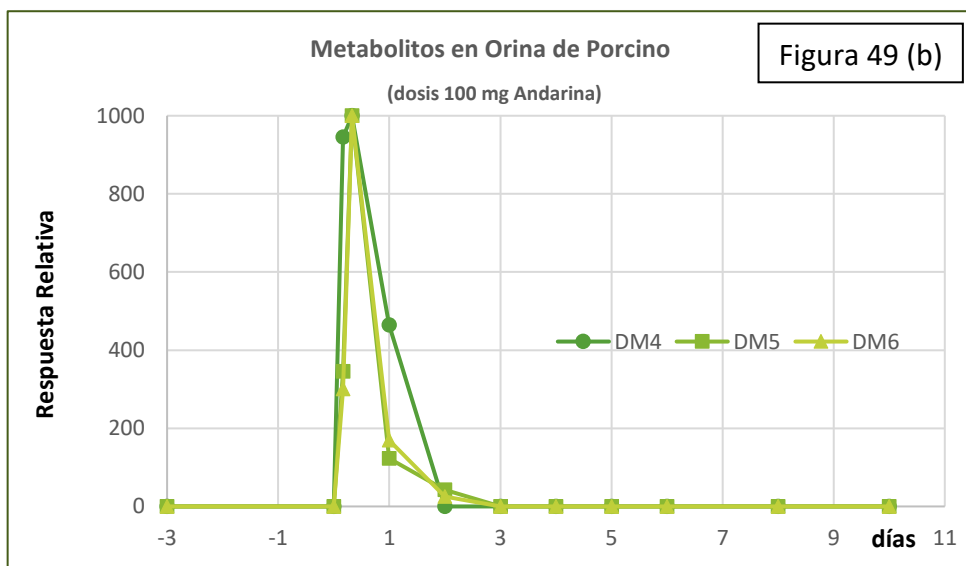
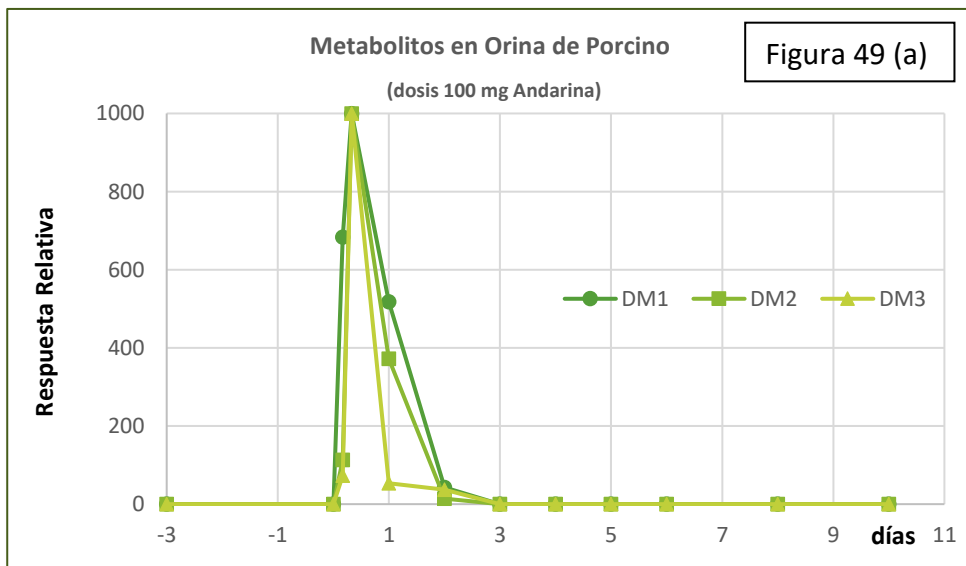
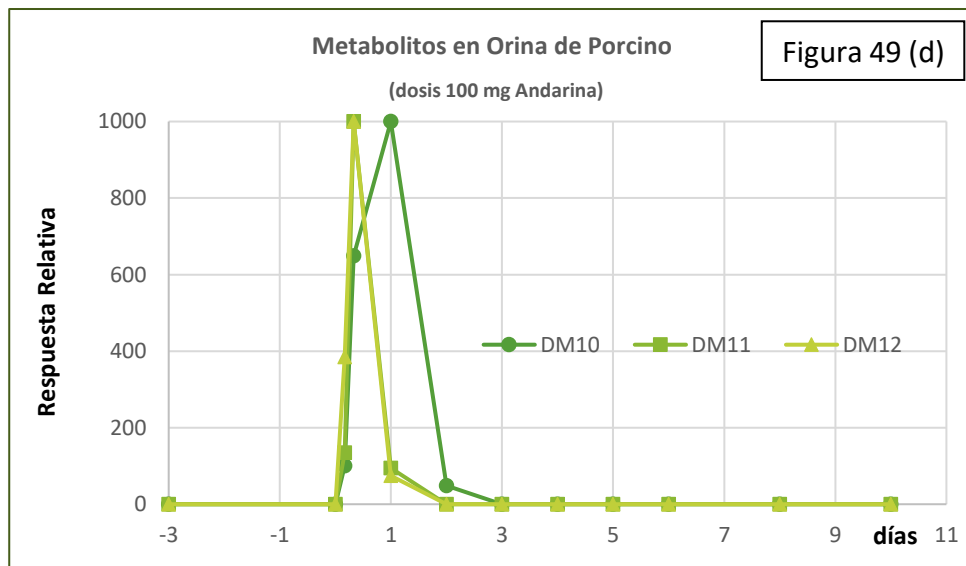
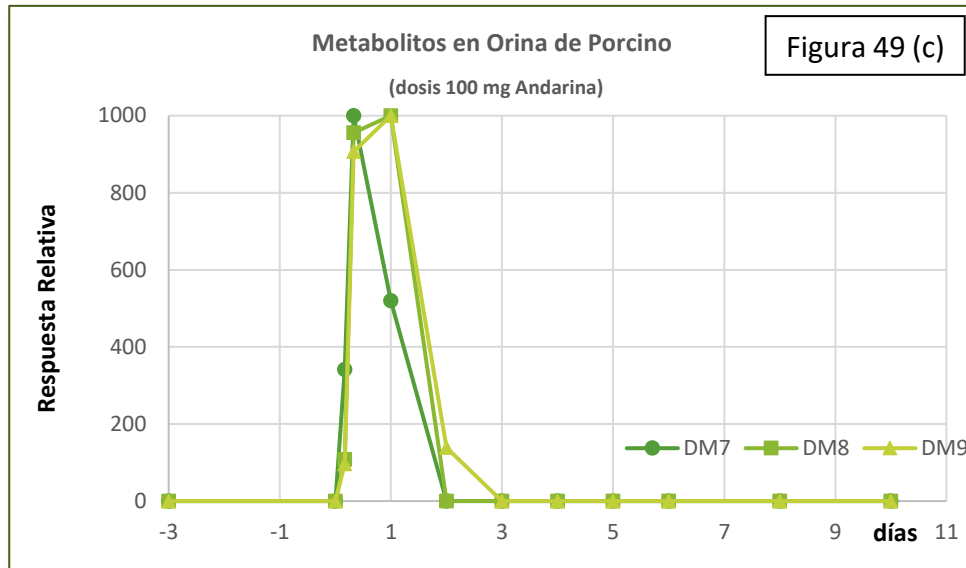
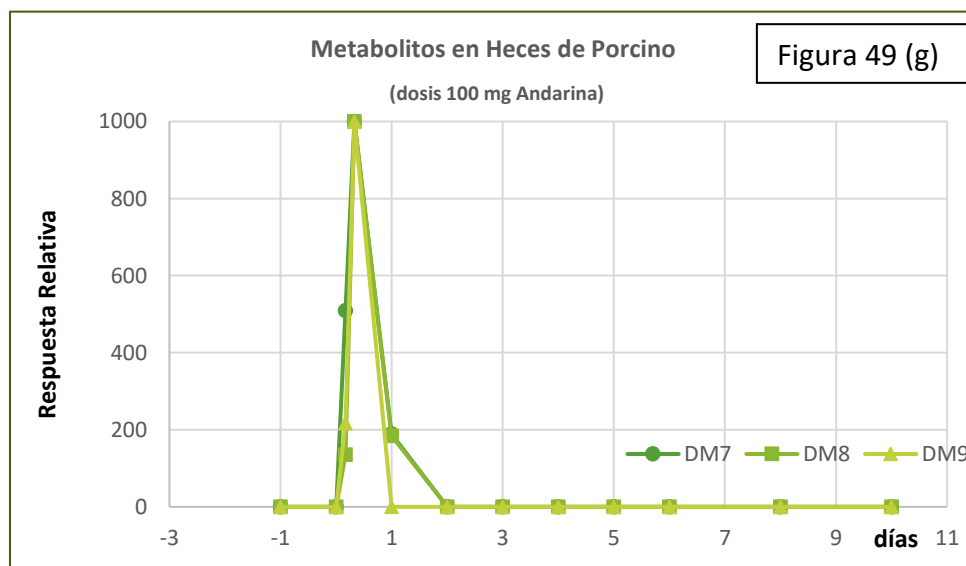
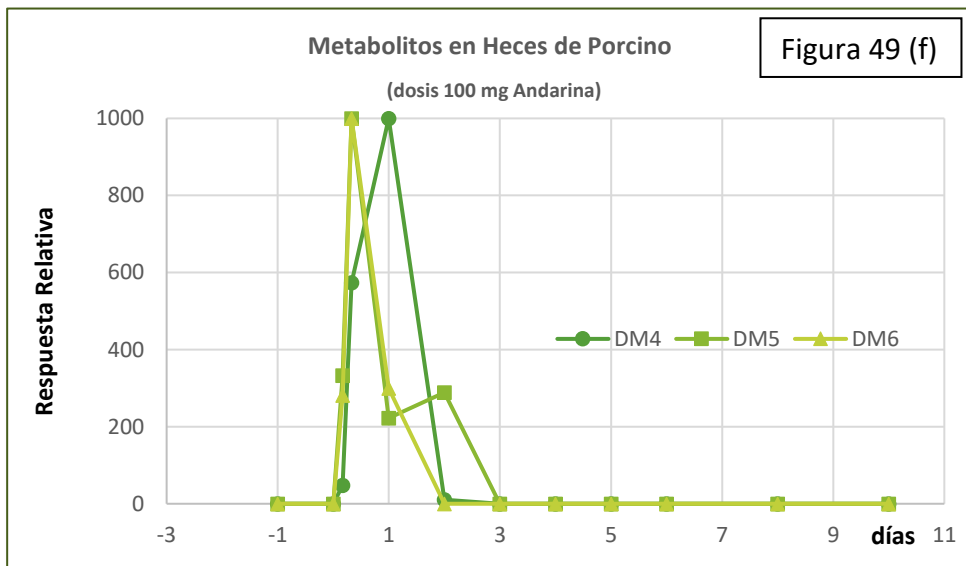
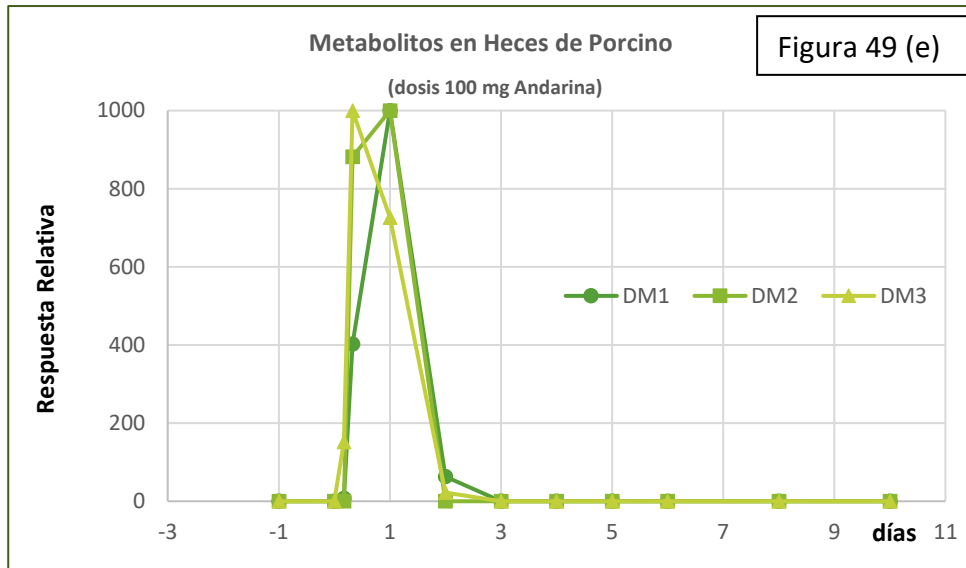


Figura 49. Perfiles de excreción de metabolitos de Andarina.

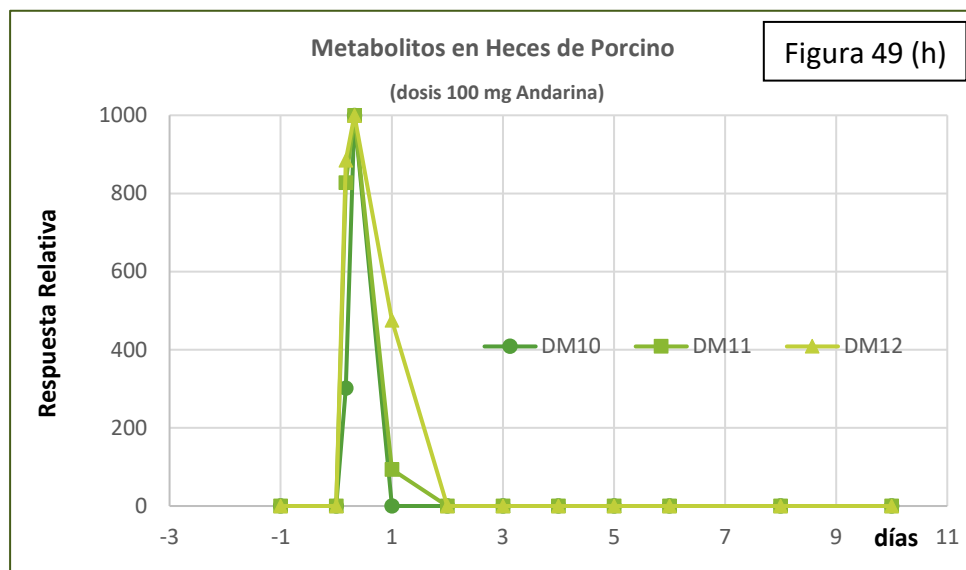




Las Figura 49 (a), (b), (c) y (d) presentan las variaciones de respuestas relativas en el tiempo de los metabolitos encontrados en orinas del porcino tratado con Andarina. Se puede ver que el aumento de las señales es muy rápido al igual que la disminución, solo pasan algunas horas hasta ser indetectable. Solo DM8, DM9 y DM10 presentan su máximo valor en el día 1, los demás metabolitos presentan su máximo a las 8 horas post-administración. Este hecho podría indicar que el máximo de Andarina y sus metabolitos se daría entre las 8 h y las 24 h como sucede en otros animales [56, 71]. En el Anexo XI (pág. 217) se presentan tablas con los datos usados para la construcción de las figuras.



Las Figura 49 (e), (f), (g) y (h) presentan las variaciones de respuestas relativas en el tiempo de los metabolitos encontrados en heces del porcino tratado con Andarina. En heces las curvas son similares a las descritas para los metabolitos en orina, se pueden ver incrementos y descensos abruptos que dibujan picos agudos mostrando una rápida eliminación de Andarina y sus metabolitos. Solo DM1, DM2 y DM4 muestran sus señales máximas a las 24 horas post-administración y el resto de los metabolitos muestran sus máximos antes (8 h).



Conclusiones parciales:

- Se desarrolló un método rápido para la determinación de Bicalutamida y Andarina en suero, mostrando resultados satisfactorios de Exactitud, Precisión y Linealidad. El método permite gran flujo de trabajo y es ideal para el análisis rutinario. Su límite de cuantificación fue 2 ng/ml.

- Se estableció la variación de concentración sérica de Bicalutamida, tras la administración de una dosis oral: presentando un máximo a las 24 h seguido de un lento descenso con concentraciones detectables hasta el último día de ensayo en porcinos (día 10) y bovinos (día 11).

- En el porcino, Andarina presenta un máximo sérico (478,1 ng/ml) entre las 4 a 8 h y una rápida disminución que muestra resultados no detectables al día 3.

- Se estableció el perfil de eliminación fecal y urinaria para los animales tratados con Bicalutamida y con Andarina. En las excretas de los porcinos y los bovinos tratados, se encontraron metabolitos de Fase I y Fase II provenientes de ambas drogas. La información recopilada con la cromatografía y los detectores de espectrometría de masas fue utilizada para proponer estructuras de los metabolitos encontrados para Bicalutamida y para Andarina (excepto para DM 4).

- En las excretas de bovinos Angus se encuentran los metabolitos de Bicalutamida descritos para bovinos Montbeliard (M1-M5). En el cerdo, se observó la ausencia del metabolito M5.

- El porcino tratado con Casodex® presentó metabolitos detectables en orina hasta el día 6 y en heces hasta el día 8.

- Los bovinos tratados con Casodex® presentaron metabolitos detectables con diferentes periodos de tiempo: con 200 mg en orina hasta el día 7 y en heces hasta el día 9; con 100 mg en orina hasta el día 5 y en heces hasta el día 7 (para raza Angus; raza Montbeliard presento metabolitos en ambas matrices hasta el día 7); con dosis 5 dosis diarias de 50 mg en orina y heces hasta el día 11. Sin embargo, en todos los animales fue mejor el desempeño de Bicalutamida (sin modificación) como “analito marcador” de administración de Casodex, en algunos animales permaneciendo más tiempo y en otros por tener una mayor señal.

- En el porcino tratado con Andarina se identificaron 12 metabolitos mostrando una intensa metabolización. Se determinó el perfil urinario y fecal de eliminación tras la administración oral de 100 mg.

- Los metabolitos de Andarina en las excretas, muestran un máximo antes de las 24 h. disminuyendo rápidamente, mostrando concentraciones detectables en orina y heces durante 48 h. Esta corta permanencia plantea un gran desafío analítico para el control de esta sustancia en prácticas ganaderas, en las matrices estudiadas.

Evaluación de Metabolitos Candidatos para el control de prácticas ganaderas

Analizando los perfiles de excreción de metabolitos discutidos previamente en las Figura 24 (pág. 96), Figura 48 (pág. 128) y Figura 49 (pág. 135) se puede determinar la ventana temporal en cual es posible detectar Andarina y Bicalutamida y metabolitos identificados.

La ausencia de patrones para la mayoría de los metabolitos encontrados plantea una limitante para su empleo como control de abuso. Sin embargo, como la legislación europea y argentina vigente prohíbe uso de promotores de crecimiento en prácticas ganaderas, la presencia de la droga o sus metabolitos indican una violación a las normativas. Es por ello que trabajar con respuestas relativas de metabolitos brindaría información suficiente para indicar el abuso de estas drogas en prácticas ganaderas desde un laboratorio, como ocurre con Zeranol [89] u otras sustancias en competencias deportivas [51, 68].

En este trabajo se han encontrado metabolitos con diferentes comportamientos analíticos (intensidad y duración de señal). Por esta razón y para evaluar la utilidad de cada metabolito se construyeron gráficos comparativos de *abundancias relativas* (áreas cromatográficas) de cada metabolito excretado durante todos los ensayos (Figura 51. Abundancia relativa de los metabolitos porcinos de Bicalutamida obtenidos en excretas. y Figura 52). Estos gráficos pretenden mostrar la sensibilidad de cada metabolito indicando la “facilidad de visualizar el pico cromatográfico” debido a que generan mayor área en comparación con otros metabolitos.

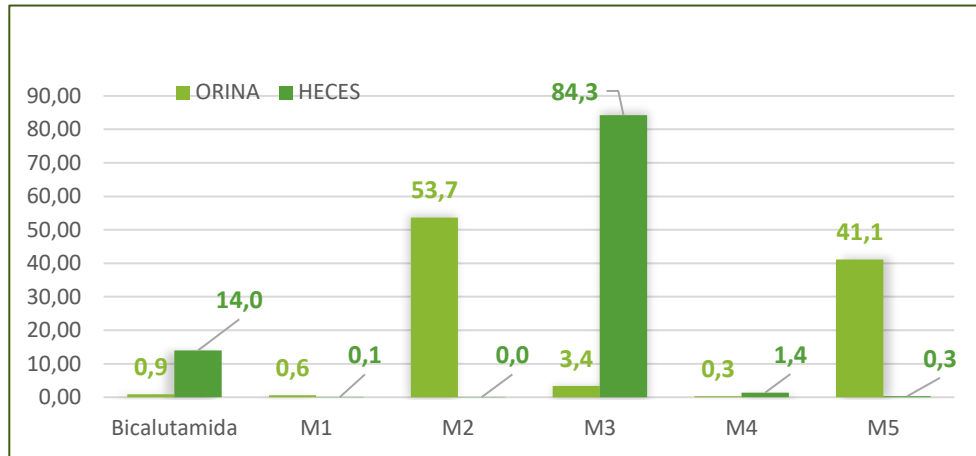


Figura 50. Abundancias relativas de los metabolitos bovinos de Bicalutamida obtenidos en excretas.

La Figura 50 presenta las *abundancias relativas* de Bicalutamida y sus metabolitos excretados (en heces y orinas) en bovinos tratados con distintas dosis de Casodex[®]. En esta figura se puede ver una marcada diferencia entre la abundancia de algunos metabolitos en orina y en heces. Esta “excreción diferencial” de cada metabolito permitiría concentrar los esfuerzos de análisis según la matriz que se tome para el laboratorio. Esto es importante destacar dado que las dosis administradas en este trabajo son elevadas y suponiendo que el abuso se realice con menores dosis, solo buscar aquellos metabolitos más “detectables” podría hacer la diferencia entre detectar o no el caso. En el caso de materia fecal, son mayores los porcentajes de Bicalutamida (14,0 %) y de M3 (84 %). En orina, la situación es distinta, los más *abundantes* fueron M2 (53,7 %) y M5 (41,1 %).

La Figura 51 presenta las *abundancias relativas* obtenidas para Bicalutamida y sus metabolitos en las excretas del porcino tratado con Casodex[®]. Se observa que Bicalutamida es más abundante en heces (81,7 %) que en orina (72,6 %). Además, en heces, M3 (17,4 %) tiene la mayor abundancia; en orina, predominan M2 (16,4 %) y M1 (10,2 %). Finalmente se observa que M4 tiene una baja “aparición”.

En la Figura 52 se grafican las *abundancias relativas* para Andarina y sus 12 metabolitos encontrados en las excretas del porcino tratado con Andarina.

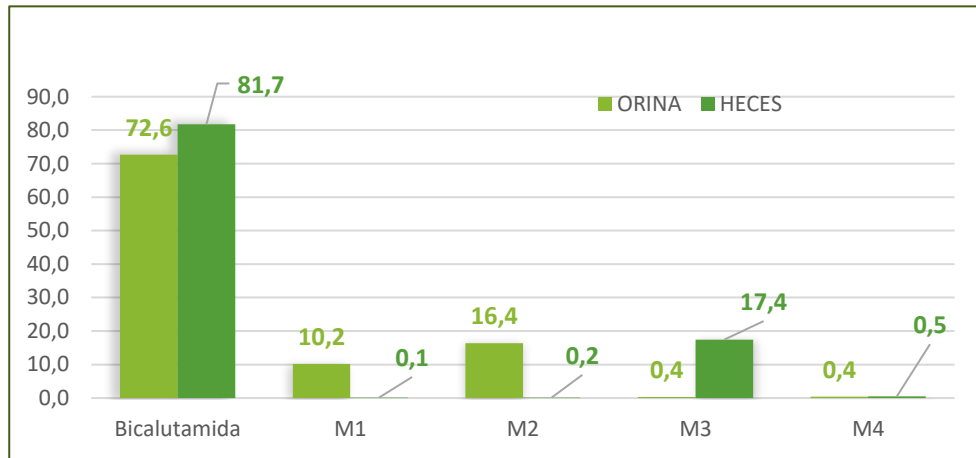


Figura 51. Abundancia relativa de los metabolitos porcinos de Bicalutamida obtenidos en excretas.

En heces, se puede ver que Andarina (59,8 %) es el analito más abundante y con un porcentaje similar entre sí pero mucho menor se encuentran DM1 (7,8 %), DM2 (7,3 %), DM3 (7,7 %) y DM4 (6,0 %). En orina, Andarina (25,2 %) y DM3 (25,1 %) presentan las mayores *abundancias*; DM5 (13,4%) y DM6 (10,5 %) y DM7 (6,7 %) tienen abundancias menores, pero podrían ser usadas con fines de control.

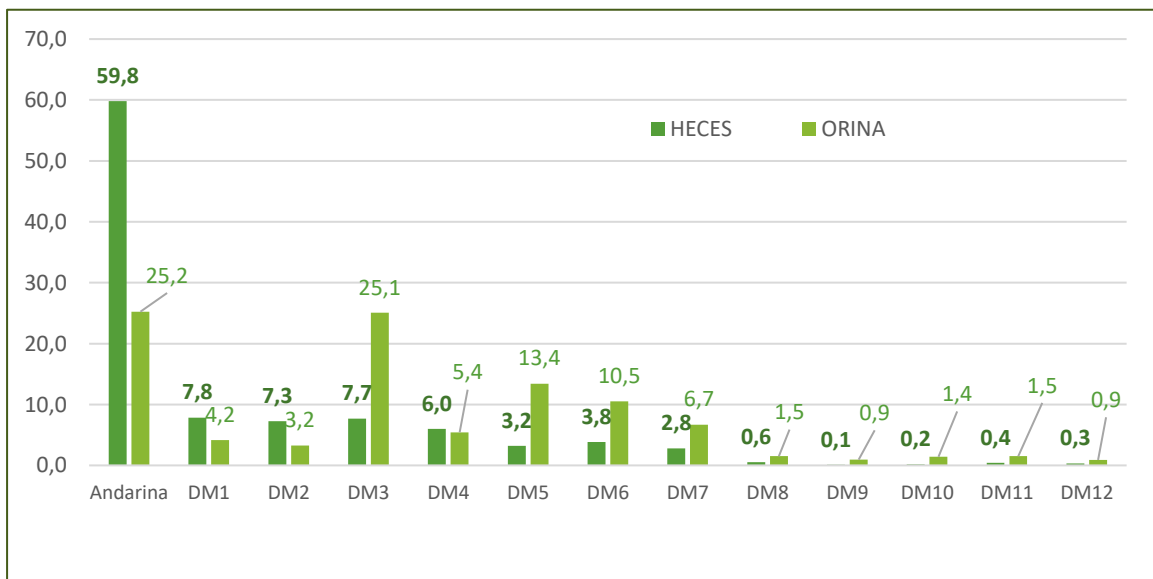


Figura 52. Abundancia relativa de los metabolitos porcinos de Andarina en excretas.

Conclusiones Parciales

- Para bovinos tratados con Casodex® el metabolito “más detectable” en heces fue M3 seguido por Bicalutamida. En tanto, que en orina fueron M2 y M5.

- En el caso de porcinos tratados con Casodex® es más detectable Bicalutamida en orina y heces como indicador de abuso. En heces, también se podría monitorear M3, en tanto que en orina convendría buscar M1 y M2.

- En el caso de porcinos tratados con Andarina en orina y heces se debe buscar Andarina. En abundancia relativa en heces, le siguen en importancia DM1, DM2 y DM3. En orina los metabolitos más abundantes fueron DM3, DM5 y DM6.

- La materia fecal liofilizada mostró su valor como matriz analítica para el control de administración de Bicalutamida y Andarina en las prácticas ganaderas.

Conclusiones Generales

Este trabajo constituye el primer estudio científico realizado con administración oral de Bicalutamida en animales productores de alimentos.

Se desarrollaron y se evaluaron métodos analíticos para el estudio de Enobosarm, Andarina, Bicalutamida e Hidroxyflutamida, en orina y heces. Los métodos mostraron las características necesarias para su empleo rutinario en laboratorios de control de productos alimenticios.

Se desarrollaron y se evaluaron métodos analíticos para el estudio de Andarina y Bicalutamida en suero. Logrando buenas características analíticas para el control de estas drogas en cerdos y bovinos.

Luego de la administración oral de Casodex[®], se detectaron metabolitos de Fase I y Fase II en heces y orinas de cuatro bovinos y un porcino. Siendo el primer trabajo científico publicado en destacar la utilidad de la materia fecal como matriz de análisis válida para el control del uso de Bicalutamida en prácticas ganaderas.

Luego de la administración oral de Andarina, se detectaron metabolitos de Fase I y Fase II en heces y orinas de un porcino.

Se propusieron estructuras químicas para 16 de los 17 metabolitos hallados, basadas en la información obtenida por técnicas de cromatografía líquida acoplada a detectores de espectrometría de masas.

En las excretas de los bovinos tratados con Casodex[®] se observaron 5 metabolitos de Bicalutamida, de los cuales 2 fueron reportados por primera vez en este trabajo. Se estableció el perfil de excreción de los 5 metabolitos (heces y orina), para obtener las respectivas ventanas temporales y se evaluó la intensidad de señal para proponerlos como indicadores útiles para el control de prácticas ganaderas. Los seleccionados fueron Bicalutamida y M3 en heces; Bicalutamida, M2 y M5 en orina. En el caso de Bicalutamida se destaca su utilidad en orina, a pesar de no poseer gran señal puesto que es posible cuantificar su concentración utilizando un patrón comercial.

En las excretas del porcino tratado con Casodex[®] se determinaron 4 de los 5 metabolitos observados en bovinos. Se determinaron los respectivos

perfiles de excreción. Además, se evaluó la ventana temporal y la magnitud de cada señal, para proponer los siguientes candidatos: en heces M3 y Bicalutamida y en orina M1, M2 y Bicalutamida.

En bovinos y porcinos tratados con Casodex® también se determinó la variación de la concentración sérica.

En las excretas del porcino tratado con Andarina se determinó la presencia de 12 metabolitos. Mediante la evaluación de los respectivos perfiles de concentración en el tiempo, las ventanas temporales y la intensidad de la señal se concluye que es mejor buscar Andarina en cualquier matriz. Los metabolitos más abundantes encontrados en heces son DM1, DM2 y DM3; en orina son DM3, DM5 y DM6.

Bibliografía

1. Alimentarius, C.d.C., ed. *Producción de alimentos de origen animal*. 2° ed. 2009: Roma, Italia.
2. Duff, G.C., *Integrating Lifetime Nutrition: From Cow/Calf to Stocker to Feedlot*. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 2007. **23**(2): p. 177-191.
3. Dunshea, F.R., et al., *Effects of dietary factors and other metabolic modifiers on quality and nutritional value of meat*. Meat Science, 2005. **71**(1): p. 8-38.
4. Dervilly-Pinel, G., et al., *Assessment of two complementary liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry metabolomics strategies for the screening of anabolic steroid treatment in calves*. Analytica Chimica Acta, 2011. **700**(1–2): p. 144-154.
5. Anderson, P.T., B.J. Johnson, and M. Dikeman, *GROWTH OF MEAT ANIMALS | Metabolic Modifiers*, in *Encyclopedia of Meat Sciences (Second Edition)*. 2014, Academic Press: Oxford. p. 62-69.
6. Fraser, D., ed. *EL BIENESTAR ANIMAL Y LA INTENSIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL*. Servicio de Gestión de las Publicaciones de la FAO ed. Documentos de la FAO sobre etica. Vol. 2. 2006, Servicio de Gestión de las Publicaciones de la FAO.
7. Méndez, M.D.S.M.R., *Agroforestería para la producción animal en América Latina*, M.D.S.M.R. Méndez, Editor. 1999, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación - FAO: Roma, Italia.
8. Figueroa, J.B.M.R.F.M.E., ed. *Buenas Prácticas Pecuarias (BPP) para la producción y comercialización porcina familiar*. 1° ed. 2012, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación - FAO: Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina.
9. Stover, M.G., R.R. Watson, and R.J. Collier, *Chapter 2 - Pre- and Probiotic Supplementation in Ruminant Livestock Production*, in *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics*. 2016, Academic Press. p. 25-36.
10. Dikeman, M.E., *Effects of metabolic modifiers on carcass traits and meat quality*. Meat Science, 2007. **77**(1): p. 121-135.
11. Murdoch, G.K., E.K. Okine, and R.J. Christopherson, *Chapter 5 Metabolic modifiers in animal nutrition: potential benefits and risks*, in *Biology of*

- Growing Animals*, J.Z. R. Mosenthin and T. Żebrowska, Editors. 2006, Elsevier. p. 135-178.
12. Handelsman, D.J., *Androgen misuse and abuse*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2011. **25**(2): p. 377-389.
 13. Passantino, A., *A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine*, in *Steroid Hormones in Food Producing Animals*, C.C. Perez-Marin, Editor. 2012, INTECH.
 14. Penot, M., *Développement méthodologique pour l'étude des cinétiques et du métabolisme d'un Modulateur Spécifique des Récepteurs Androgènes : l'ENOBOSARM*, in *Chimie des Molécules Bioactives Spécialité Stratégie et Qualité en Chimie Analytique*. 2014, ONIRIS: Laboratoire d'étude des résidus et contaminants dans les aliments - Nantes - France. p. 52.
 15. HALL, J.E., GUYTON, A.C., *Tratado de Fisiología Médica*. 13ra ed. 2016, Barcelona, España: Elsevier España.
 16. Gao, W., J. Kim, and J.T. Dalton, *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Nonsteroidal Androgen Receptor Ligands*. Pharmaceutical research, 2006. **23**(8): p. 1641-1658.
 17. Kicman, A.T., *Pharmacology of anabolic steroids*. British Journal of Pharmacology, 2008. **154**(3): p. 502-521.
 18. Narayanan, R., et al., *Selective androgen receptor modulators in preclinical and clinical development*. Nuclear Receptor Signaling, 2008. **6**: p. e010.
 19. Dotson, J.L. and R.T. Brown, *The History of the Development of Anabolic-Androgenic Steroids*. Pediatric Clinics of North America, 2007. **54**(4): p. 761-769.
 20. Clark, A.S. and L.P. Henderson, *Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids*. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2003. **27**(5): p. 413-436.
 21. Kanayama, G., et al., *Treatment of anabolic–androgenic steroid dependence: Emerging evidence and its implications*. Drug and Alcohol Dependence, 2010. **109**(1–3): p. 6-13.
 22. Negro-Vilar, A., *Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs): A Novel Approach to Androgen Therapy for the New Millennium*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1999. **84**(10): p. 3459-3462.
 23. Dalton, J.T., et al., *Discovery of Nonsteroidal Androgens*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998. **244**(1): p. 1-4.

24. Sydor, A.R.J., *Développement méthodologique associé à l'étude de la cinétique de l'enobosarm et de ses métabolites dans les fèces de veaux*, in *ECOLE NATIONALE VETERINAIRE, de l'AGROALIMENTAIRE ET DE L'ALIMENTATION*. 2015, ONIRIS NANTES ATLANTIQUE. p. 99.
25. Aikawa, K., et al., *Synthesis and biological evaluation of novel selective androgen receptor modulators (SARMs). Part I*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2015. **23**(10): p. 2568-2578.
26. Bhasin, S. and R. Jasuja, *Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs) as Function Promoting Therapies*. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 2009. **12**(3): p. 232-240.
27. Antignac, J.-P., et al., *Analytical strategies for the direct mass spectrometric analysis of steroid and corticosteroid phase II metabolites*. *Steroids*, 2005. **70**(3): p. 205-216.
28. Gomes, R.L., et al., *Analysis of conjugated steroid androgens: Deconjugation, derivatisation and associated issues*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2009. **49**(5): p. 1133-1140.
29. Gao, W., C.E. Bohl, and J.T. Dalton, *Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor*. *Chemical reviews*, 2005. **105**(9): p. 3352-3370.
30. Boyle, G.W., et al., *Metabolism of Casodex in laboratory animals*. *Xenobiotica*, 1993. **23**(7): p. 781-798.
31. McKillop, D., et al., *Metabolism and enantioselective pharmacokinetics of Casodex in man*. *Xenobiotica*, 1993. **23**(11): p. 1241-1253.
32. Lunglmayr, G., *Casodex (ICI 176,334), A New, Non-Steroidal Anti-Androgen. Early Clinical Results*. *Hormone Research in Paediatrics*, 1989. **32**(suppl 1)(Suppl. 1): p. 77-81.
33. Tyrrell, C.J., et al., *Casodex 10-200 mg daily, used as monotherapy for the treatment of patients with advanced prostate cancer. An overview of the efficacy, tolerability and pharmacokinetics from three phase II dose-ranging studies*. *Casodex Study Group*. *Eur Urol*, 1998. **33**(1): p. 39-53.
34. Soloway, M.S., et al., *Bicalutamide in the Treatment of Advanced Prostatic Carcinoma: A Phase II Noncomparative Multicenter Trial Evaluating Safety, Efficacy and Long-Term Endocrine Effects of Monotherapy*. *The Journal of Urology*, 1995. **154**(6): p. 2110-2114.
35. Chodak, G., et al., *Single-agent therapy with bicalutamide: a comparison with medical or surgical castration in the treatment of advanced prostate carcinoma*. *Urology*, 1995. **46**(6): p. 849-55.

36. Mahler, C. and L. Denis, *Clinical profile of a new non-steroidal antiandrogen*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1990. **37**(6): p. 921-924.
37. Kennealey, G.T. and B.J. Furr, *Use of the nonsteroidal anti-androgen Casodex in advanced prostatic carcinoma*. Urol Clin North Am, 1991. **18**(1): p. 99-110.
38. Verhelst, J., et al., *Endocrine profiles during administration of the new non-steroidal anti-androgen Casodex in prostate cancer*. Clin Endocrinol (Oxf), 1994. **41**(4): p. 525-30.
39. Gao, W. and J.T. Dalton, *Expanding the therapeutic use of androgens via selective androgen receptor modulators (SARMs)*. Drug discovery today, 2007. **12**(5-6): p. 241-248.
40. Marhefka, C.A., et al., *Design, Synthesis, and Biological Characterization of Metabolically Stable Selective Androgen Receptor Modulators*. Journal of Medicinal Chemistry, 2004. **47**(4): p. 993-998.
41. Chen, J., J. Kim, and J.T. Dalton, *Discovery AND Therapeutic Promise OF Selective Androgen Receptor Modulators*. Molecular interventions, 2005. **5**(3): p. 173-188.
42. Cockshott, I., *Bicalutamide*. Clinical Pharmacokinetics, 2004. **43**(13): p. 855-878.
43. Furr, B.J., *"Casodex" (ICI 176,334)--a new, pure, peripherally-selective anti-androgen: preclinical studies*. Horm. Res., 1989. **32**: p. 69-76.
44. Thevis, M., et al., *Ultrahigh pressure liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in human sports drug testing: Possibilities and limitations*. Journal of Chromatography A, 2013. **1292**(0): p. 38-50.
45. Thevis, M.S., Wilhelm, *Targeting new performance enhancing drugs in doping controls: Selective androgen receptor modulators (SARMs)*. Spectroscopy Europe, 2010. **22**(4): p. 6.
46. Gomez, C., et al., *Analytical strategies based on mass spectrometric techniques for the study of steroid metabolism*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2014. **53**(0): p. 106-116.
47. Kuuranne, T., et al., *Aryl-propionamide-derived selective androgen receptor modulators: liquid chromatography-tandem mass spectrometry characterization of the in vitro synthesized metabolites for doping control purposes*. Drug Metab Dispos, 2008. **36**(3): p. 571-81.

48. Krug, O., et al., *Characterization of In Vitro Synthesized Equine Metabolites of the Selective Androgen Receptor Modulators S24 and S4*. Journal of Equine Veterinary Science, 2012. **32**(9): p. 562-568.
49. de Rijke, E., et al., *Selective androgen receptor modulators: in vitro and in vivo metabolism and analysis*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2013. **30**(9): p. 1517-26.
50. Thevis, M., et al., *Characterization of in vitro generated metabolites of the selective androgen receptor modulators S-22 and S-23 and in vivo comparison to post-administration canine urine specimens*. Drug Test Anal, 2010. **2**(11-12): p. 589-98.
51. Thevis, M. and W. Schänzer, *Analytical approaches for the detection of emerging therapeutics and non-approved drugs in human doping controls*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014. **101**(0): p. 66-83.
52. Thevis, M., et al., *Mass spectrometric characterization of urinary metabolites of the selective androgen receptor modulator andarine (S-4) for routine doping control purposes*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2010. **24**(15): p. 2245-2254.
53. Thevis, M., et al., *Detection of the arylpropionamide-derived selective androgen receptor modulator (SARM) S-4 (Andarine) in a black-market product*. Drug Test Anal, 2009. **1**(8): p. 387-92.
54. Thevis, M., et al., *Trafficking of drug candidates relevant for sports drug testing: Detection of non-approved therapeutics categorized as anabolic and gene doping agents in products distributed via the Internet*. Drug Testing and Analysis, 2011. **3**(5): p. 331-336.
55. Grata, E., et al., *SARM-S4 and metabolites detection in sports drug testing: A case report*. Forensic Science International. **213**(1): p. 104-108.
56. Hansson, A., et al., *Characterization of equine urinary metabolites of selective androgen receptor modulators (SARMs) S1, S4 and S22 for doping control purposes*. Drug Testing and Analysis, 2015. **7**(8): p. 673-683.
57. Waltner-Toews, D. and S.A. McEwen, *Residues of hormonal substances in foods of animal origin: a risk assessment*. Preventive Veterinary Medicine, 1994. **20**(3): p. 235-247.
58. Bischoff, F., *Carcinogenic Effects of Steroids*, in *Advances in Lipid Research*, P. Rodolfo and K. David, Editors. 1969, Elsevier. p. 165-244.
59. Christian, G.D., *QUÍMICA ANALÍTICA*, McGRAW-HILL, Editor. 2009: México, D. F.

60. Skoog, D.A.H., J. F.; Nieman, T. A., *Espectrometría de masas molecular*. Principios de Análisis instrumental. 2001, Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España.
61. MacLaferty, F.W.T., F., *Interpretation of mass spectra*. University Science Books. 1993, California.
62. Barceló, D.H., M.C., *Trace determinations of pesticides and their degradations products in waters*. Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry Vol. 19. 1997, Amsterdam: Elsevier Science.
63. Lee, P.W., *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals*. Vol. 1 2003, John Wiley & Sons Ltd.
64. Rydevik, A., et al., *Isolation and characterization of a β -glucuronide of hydroxylated SARM S1 produced using a combination of biotransformation and chemical oxidation*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014. **98**(0): p. 36-39.
65. Thevis, M., M. Kamber, and W. Schänzer, *Screening for metabolically stable aryl-propionamide-derived selective androgen receptor modulators for doping control purposes*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006. **20**(5): p. 870-876.
66. Kim, J., et al., *Absorption, distribution, metabolism and excretion of the novel SARM GTx-024 [(S)-N-(4-cyano-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-cyanophenoxy)-2-hydroxy-2-methylpropanamide] in rats*. Xenobiotica, 2013. **43**(11): p. 993-1009.
67. Thevis, M., et al., *Mass spectrometric characterization of urinary metabolites of the selective androgen receptor modulator S-22 to identify potential targets for routine doping controls*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2011. **25**(15): p. 2187-2195.
68. Grata, E., et al., *SARM-S4 and metabolites detection in sports drug testing: A case report*. Forensic Science International, 2011. **213**(1): p. 104-108.
69. Virus, E.D., T.G. Sobolevsky, and G.M. Rodchenkov, *Introduction of HPLC/orbitrap mass spectrometry as screening method for doping control*. Journal of Mass Spectrometry, 2008. **43**(7): p. 949-957.
70. Yin, D., et al., *Pharmacology, Pharmacokinetics, and Metabolism of Acetothiolutamide, a Novel Nonsteroidal Agonist for the Androgen Receptor*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2003. **304**(3): p. 1323.
71. Perera, M.A., et al., *In Vivo Metabolism and Final Disposition of a Novel Nonsteroidal Androgen in Rats and Dogs*. Drug Metabolism and Disposition, 2006. **34**(10): p. 1713-1721.

72. Yi, P., et al., *Disposition and Metabolism of LY2452473, a Selective Androgen Receptor Modulator, in Humans*. Drug Metabolism and Disposition, 2012. **40**(12): p. 2354-2364.
73. Yang, J., Wu, Z., Wu, D., Darby, M. V., Hong, S. S., Miller, D. D., Dalton, J. , *"Pharmacokinetics, biodistribution and metabolism of a novel selective androgen receptor modulator designed for prostate cancer imaging"*. International Journal of Oncology, 2010. **36**(1): p. 213-222.
74. Kim, B.S., J.; Lee, S.; Yu, K.; Hyun S., *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Determination of Bicalutamide in Human Plasma and Application to a Bioequivalence Study*. Journal of Bioanalysis & Biomedicine, 2011. **3**(5): p. 98-102.
75. Wenqing Gao, B.S., *Pharmacology Of Selective Androgen Receptor Modulators (SARMS)*. 2004, The Ohio State University.
76. Wu, D., et al., *PHARMACOKINETICS AND METABOLISM OF A SELECTIVE ANDROGEN RECEPTOR MODULATOR IN RATS: IMPLICATION OF MOLECULAR PROPERTIES AND INTENSIVE METABOLIC PROFILE TO INVESTIGATE IDEAL PHARMACOKINETIC CHARACTERISTICS OF A PROPANAMIDE IN PRECLINICAL STUDY*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2006. **34**(3): p. 483-494.
77. Sharma, K., et al., *Development and validation of a highly sensitive LC-MS/MS-ESI method for the determination of bicalutamide in mouse plasma: application to a pharmacokinetic study*. Biomedical Chromatography, 2012. **26**(12): p. 1589-1595.
78. Zheng, H., et al., *Determination of 2-hydroxyflutamide in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS): Application to a bioequivalence study on Chinese volunteers*. Journal of Chromatography B, 2010. **878**(19): p. 1611-1615.
79. Lozano, A., et al., *Identification and measurement of veterinary drug residues in beehive products*. Food Chemistry, 2019. **274**: p. 61-70.
80. Anastassiades, M., K. Maštovská, and S.J. Lehotay, *Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides*. Journal of Chromatography A, 2003. **1015**(1): p. 163-184.
81. Animal, O.-O.M.d.S., *Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres, (mamíferos, aves y abejas)*. 2004. **1**.
82. McKillop, D., et al., *Enantioselective metabolism and pharmacokinetics of Casodex in the male rat*. Xenobiotica, 1995. **25**(6): p. 623-633.
83. Gao, W., et al., *Interspecies differences in pharmacokinetics and metabolism of S-3-(4-acetylamino-phenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-N-(4-*

- nitro-3-trifluoromethylphenyl)-propionamide: the role of N-acetyltransferase*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2006. **34**(2): p. 254-260.
84. Kearbey, J.D., et al., *Pharmacokinetics of S-3-(4-acetylamino-phenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-N-(4-nitro- 3-trifluoromethyl-phenyl)-propionamide in rats, a non-steroidal selective androgen receptor modulator*. Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems, 2004. **34**(3): p. 273-280.
 85. Garg, N., et al., *Structural elucidation of major selective androgen receptor modulator (SARM) metabolites for doping control*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2018. **16**(5): p. 698-702.
 86. Rydevik, A., et al., *The fungus Cunninghamella elegans can produce human and equine metabolites of selective androgen receptor modulators (SARMs)*. Xenobiotica, 2013. **43**(5): p. 409-420.
 87. Li, H., et al., *Modified metabolites mapping by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry using full scan/all ion fragmentation/neutral loss acquisition*. Journal of Chromatography A, 2018.
 88. Araujo, P., et al., *A simple liquid extraction protocol for overcoming the ion suppression of triacylglycerols by phospholipids in liquid chromatography mass spectrometry studies*. Talanta, 2016. **148**: p. 463-471.
 89. E. Salvat, A., et al., *Zearalenone content in animal fodder samples in relation to weather conditions in Colonia Benítez, northeastern Argentina*. Vol. 45. 2016.
 90. A. Zwir-Ferenc, M.B., *Solid Phase Extraction Technique - Trends, Opportunities and Applications*. Polish Journal Environmental Studies, 2006. **15**(5): p. 677-690.
 91. Kohn, M.H. and R.K. Wayne, *Facts from feces revisited*. Trends in Ecology & Evolution, 1997. **12**(6): p. 223-227.
 92. Delafosse, A., et al., *Cryptosporidium parvum infection and associated risk factors in dairy calves in western France*. Preventive Veterinary Medicine, 2015. **118**(4): p. 406-412.
 93. Cho, Y.-I., et al., *Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea*. Veterinary Microbiology, 2013. **166**(3): p. 375-385.
 94. Colabufo, N.A., et al., *Bicalutamide failure in prostate cancer treatment: Involvement of Multi Drug Resistance proteins*. European Journal of Pharmacology, 2008. **601**(1-3): p. 38-42.

95. Weltring, A., et al., *Simultaneous measurement of endogenous steroid hormones and their metabolites with LC–MS/MS in faeces of a New World primate species, Cebus capucinus*. *Physiology & Behavior*, 2012. **105**(2): p. 510-521.
96. De Clercq, N., et al., *Development and validation of a high-resolution mass-spectrometry–based method to study the long-term stability of natural and synthetic glucocorticoids in faeces*. *Journal of Chromatography A*, 2014. **1336**: p. 76-86.
97. Van de Wiele, M., et al., *Determination of 16 β -hydroxystanozolol in urine and faeces by liquid chromatography–multiple mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2000. **904**(2): p. 203-209.
98. Blackwell, B.R., et al., *Transformation kinetics of trenbolone acetate metabolites and estrogens in urine and feces of implanted steers*. *Chemosphere*, 2015. **138**: p. 901-907.
99. Berendsen, B.J.A., et al., *The analysis of animal faeces as a tool to monitor antibiotic usage*. *Talanta*, 2015. **132**: p. 258-268.
100. Touma, C. and R. Palme, *Measuring Fecal Glucocorticoid Metabolites in Mammals and Birds: The Importance of Validation*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009. **1046**(1): p. 54-74.
101. Gregory, K.E., et al., *Method Development for Fecal Lipidomics Profiling*. *Analytical Chemistry*, 2013. **85**(2): p. 1114-1123.
102. Yen, S., et al., *Metabolomic Analysis of Human Fecal Microbiota: A Comparison of Feces-Derived Communities and Defined Mixed Communities*. *Journal of Proteome Research*, 2015. **14**(3): p. 1472-1482.
103. Goymann, W., *On the use of non-invasive hormone research in uncontrolled, natural environments: the problem with sex, diet, metabolic rate and the individual*. *Methods in Ecology and Evolution*, 2012. **3**(4): p. 757-765.
104. Millspaugh, J.J. and B.E. Washburn, *Within-sample variation of fecal glucocorticoid measurements*. *General and Comparative Endocrinology*, 2003. **132**(1): p. 21-26.
105. Palme, R., et al., *Excretion of infused 14C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock*. *Animal Reproduction Science*, 1996. **43**(1): p. 43-63.
106. Wasser, S.K., et al., *Excretory Fate of Estradiol and Progesterone in the African Elephant (*Loxodonta africana*) and Patterns of Fecal Steroid Concentrations throughout the Estrous Cycle*. *General and Comparative Endocrinology*, 1996. **102**(2): p. 255-262.

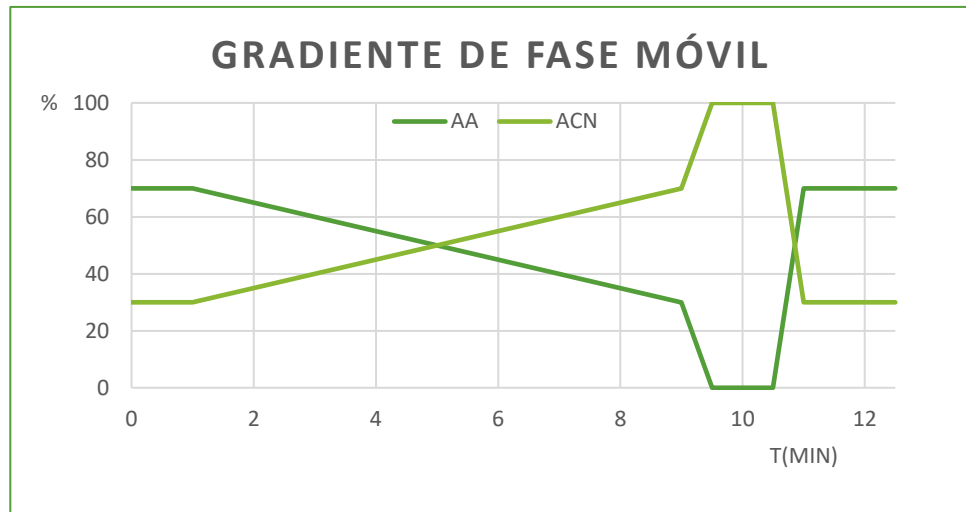
107. Möstl, E. and R. Palme, *Hormones as indicators of stress*. Domestic Animal Endocrinology, 2002. **23**(1): p. 67-74.
108. Schwarzenberger, F., et al., *Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals*. Animal Reproduction Science, 1996. **42**(1): p. 515-526.
109. Groh, H., K. Schade, and C. Hörhold-Schubert, *Steroid metabolism with intestinal microorganisms*. Journal of Basic Microbiology, 2007. **33**(1): p. 59-72.
110. Pettitt, B.A., C.J. Wheaton, and J.M. Waterman, *Effects of storage treatment on fecal steroid hormone concentrations of a rodent, the Cape ground squirrel (*Xerus inauris*)*. General and Comparative Endocrinology, 2007. **150**(1): p. 1-11.
111. Lynch, J.W., et al., *Concentrations of four fecal steroids in wild baboons: short-term storage conditions and consequences for data interpretation*. General and Comparative Endocrinology, 2003. **132**(2): p. 264-271.
112. Millspaugh, J.J. and B.E. Washburn, *Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation*. General and Comparative Endocrinology, 2004. **138**(3): p. 189-199.
113. Khan, M.Z., et al., *A matter of time: evaluating the storage of fecal samples for steroid analysis*. General and Comparative Endocrinology, 2002. **128**(1): p. 57-64.
114. Terio Karen, A., et al., *Comparison of different drying and storage methods on quantifiable concentrations of fecal steroids in the cheetah*. Zoo Biology, 2002. **21**(3): p. 215-222.

Anexo I

Método Cromatográfico

En esta etapa del trabajo el sistema cromatográfico utilizado para el desarrollo del método de control de SARMs se puede resumir de la siguiente manera:

- Columna ACQUITY UPLC BEH C18 (1,7 μm ; 2,1 x 100 mm)
- Volumen de Inyección: 2 μl
- Fase Móvil: Ácido Fórmico 0,1% (AA) / Acetonitrilo (ACN)
- Flujo: 0,6 ml/min



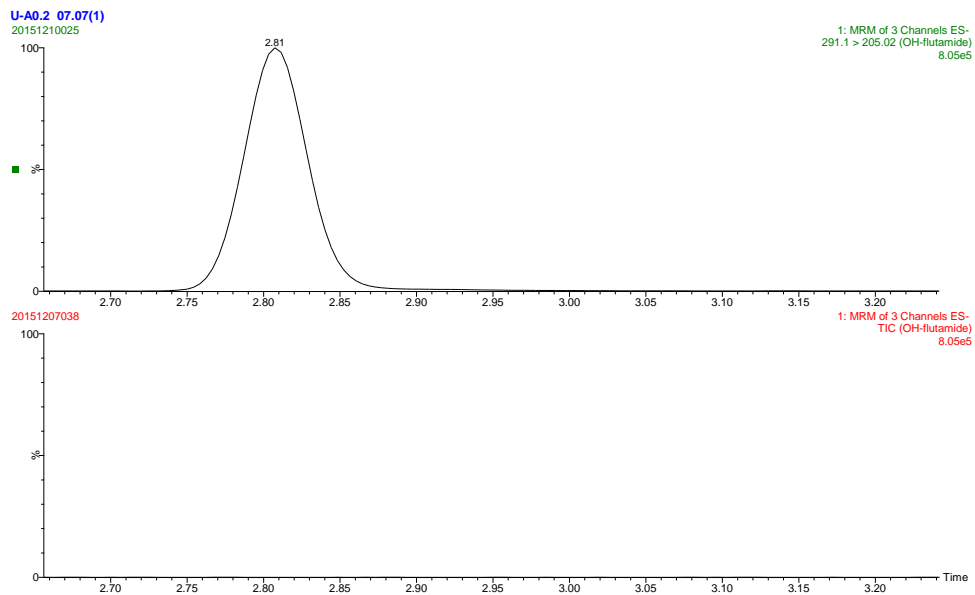
- Configuración del detector de espectrometría de masas

Parámetro	Valor
Ionización Electrospray	ESI -
Temperatura de la fuente	150 °C
Voltaje del capilar	- 2 kV
Source offset	30 V
Temperatura de desolvatación	450 °C
Flujo de nitrógeno en el cono	150 l/h
Flujo de desolvatación	650 l/h
Presión de nebulización	7 Bar
Flujo de gas de colisión	0,15 l/min

Cromatografía

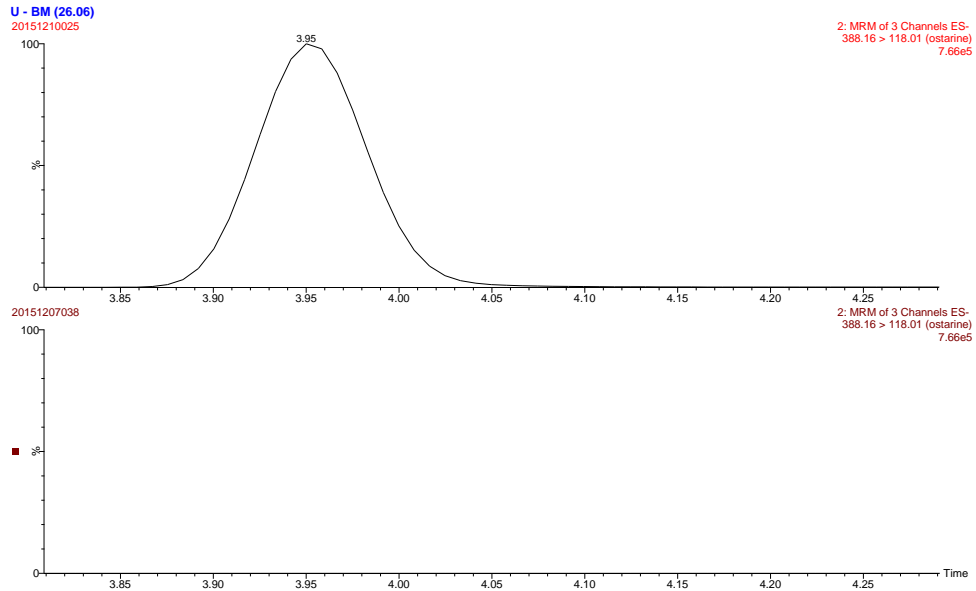
A continuación, se presentan cromatogramas comparando la respuesta obtenida entre una muestra que no contiene el analito (muestra *blanco*) y otra muestra a la que se le añadió una cantidad conocida de los analitos. De esta forma se puede evaluar la *especificidad* y la *selectividad* del método. En métodos basados en espectrometría de masas, estos parámetros son provistos por las transiciones (MRM).

Cromatograma de 2 muestras de orina: abajo una muestra blanco y arriba se añadió 0,2 ng/ml de Hidroxiflutamida. Se observa claramente un pico en el cromatograma superior y la ausencia de pico en el otro cromatograma. Entonces podemos decir que el método es *específico* y *selectivo* por los cromatogramas y también que recupera el analito a la concentración ensayada. En este caso se presenta la *transición*: 291,1>205,02

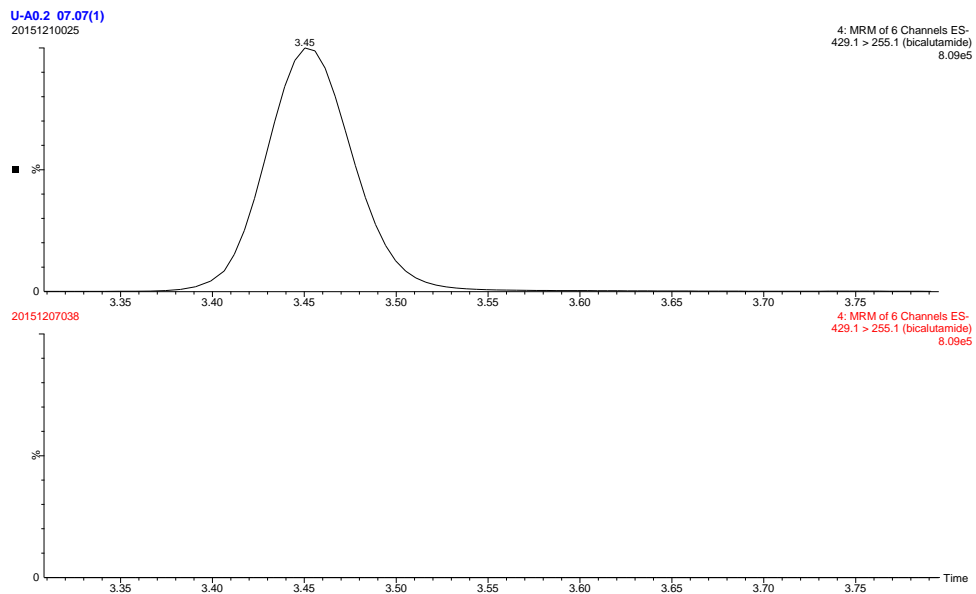


A continuación, esta situación se repite para los demás analitos en orina empleando la misma concentración añadida. De esta forma se puede llegar a las mismas conclusiones, en relación a la especificidad, la selectividad y la recuperación del método.

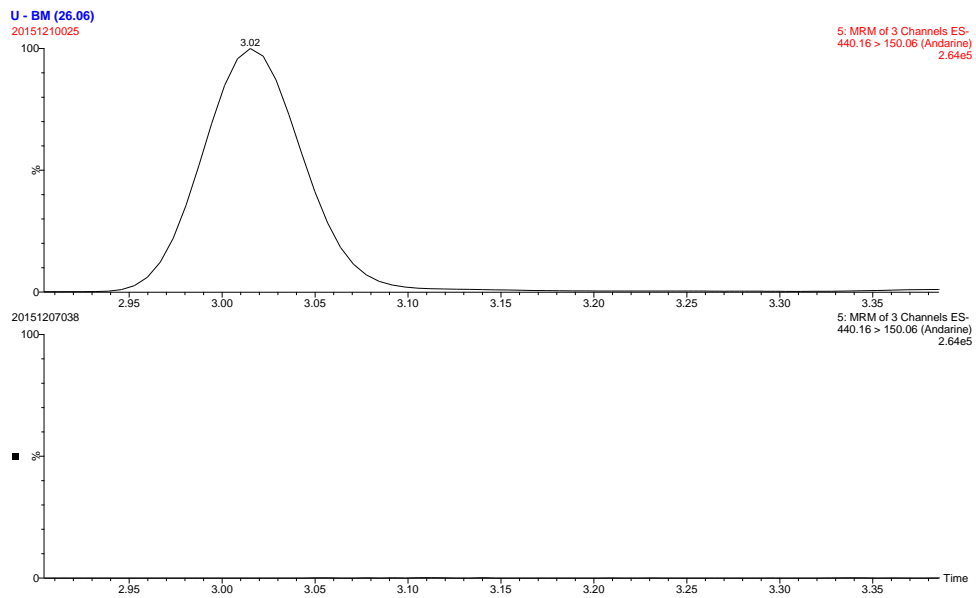
- Enobosarm: se grafica la transición 388,16>118,01



- Bicalutamida: se grafica la transición 429,1>255,1

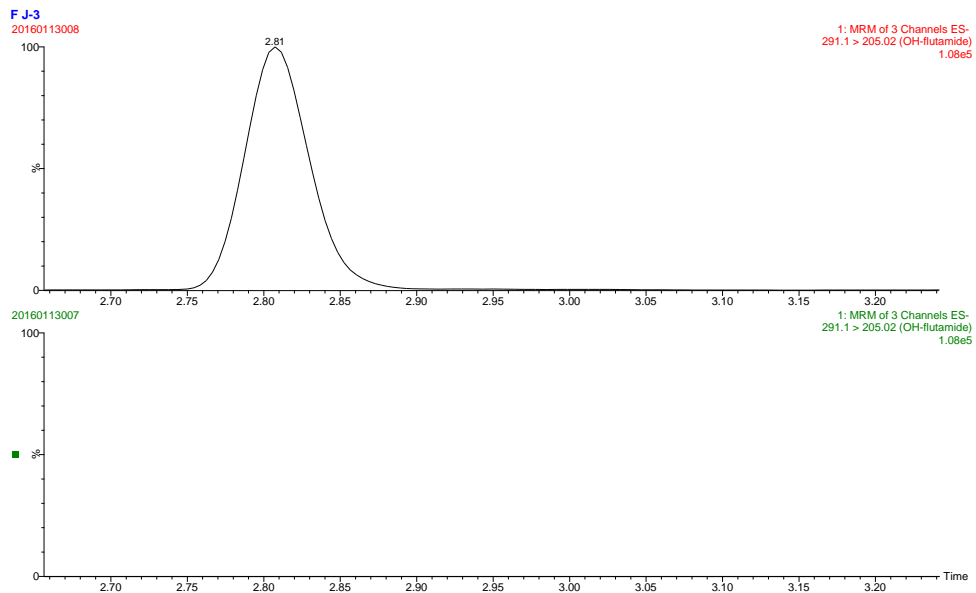


- Andarina: se grafica la transición 440,16>150,06

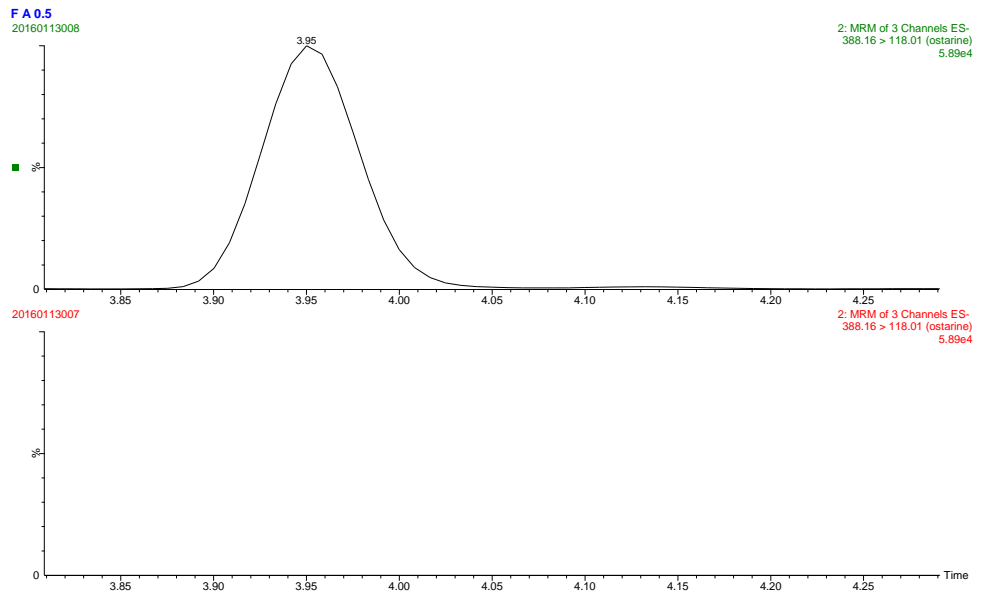


En el caso de las *muestras de heces* la concentración que se presenta, en los siguientes cromatogramas, es 0,5 ng/g. Las imágenes son similares a las que se obtuvieron para orina: en el cromatograma superior se observa claramente la presencia del analito (pico) y en el inferior la ausencia de señal (interferencias).

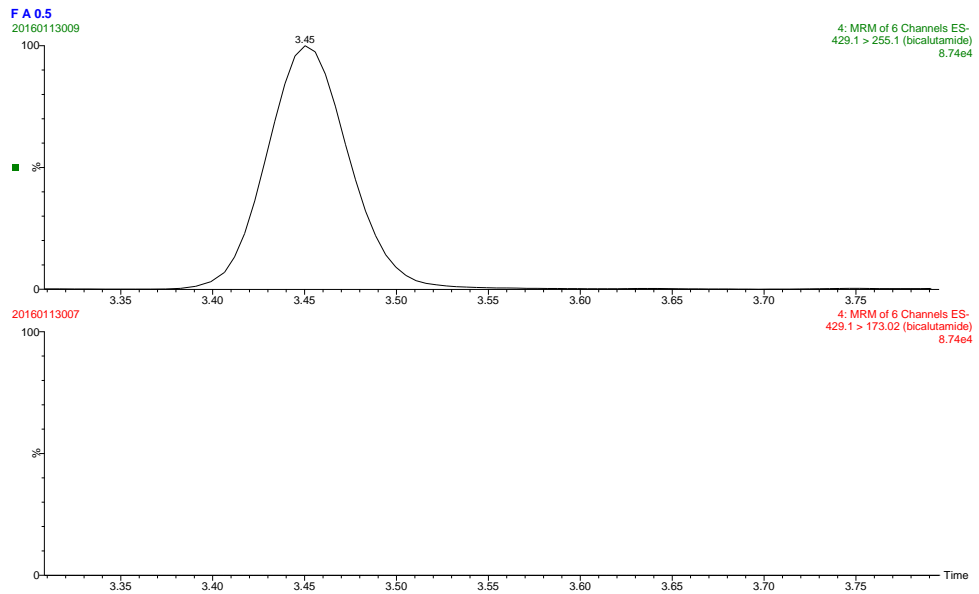
- Hidroxiflutamida (291,1>205,02)



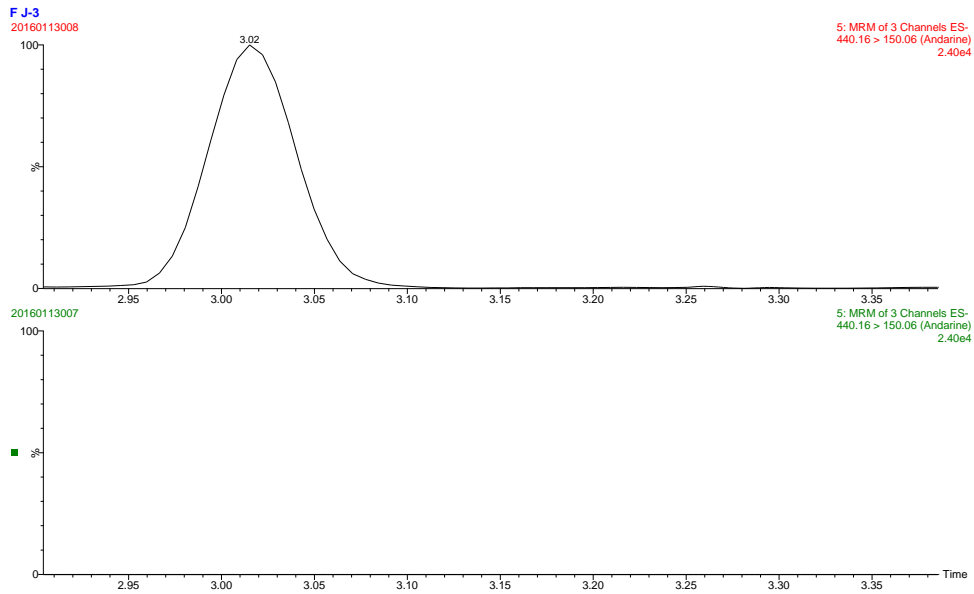
- Enobosarm (388,16>118,01)



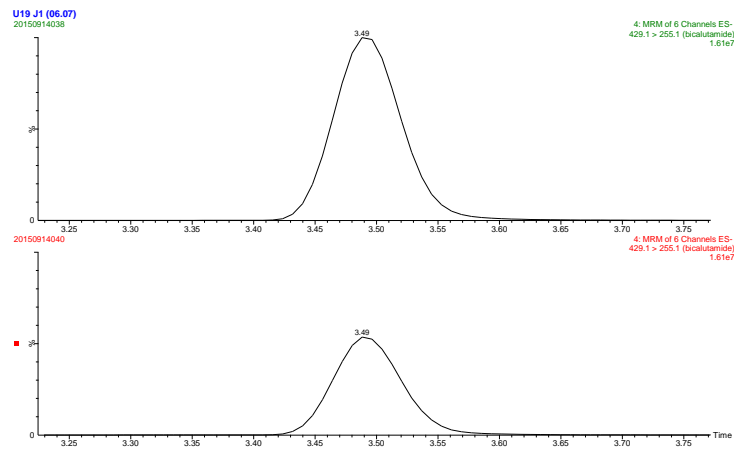
- Bicalutamida (429,1>255,1)



- Andarina (440,16>150,06)

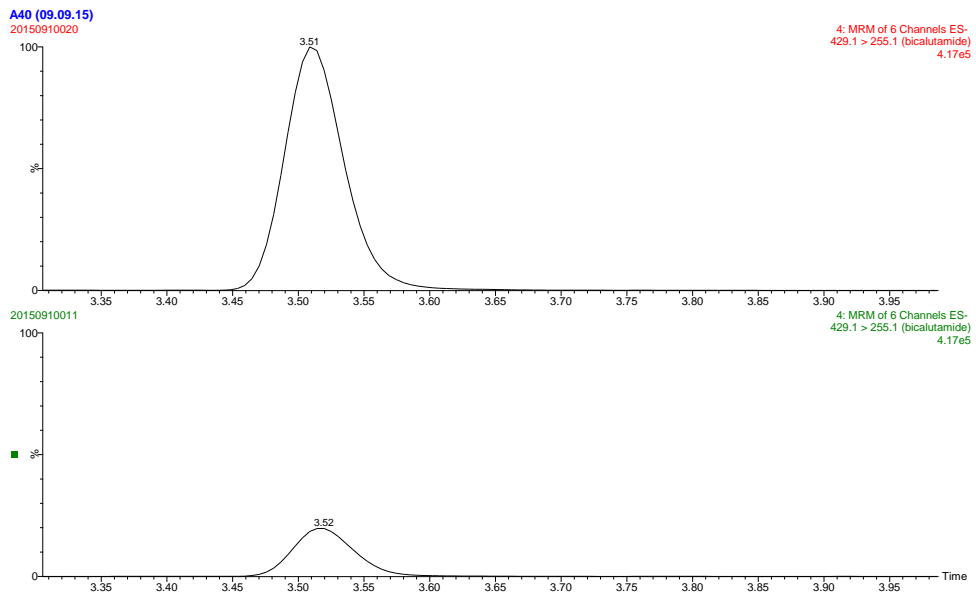


A continuación, se presenta una muestra de orina con el agregado de Bicalutamida (arriba) y una muestra de orina de un animal tratado (con una dosis de Casodex®).



Se puede ver claramente que ambos cromatogramas presentan el mismo pico correspondiente a Bicalutamida (429,1>255,1).

La siguiente comparación, presenta la misma situación muestra blanco con adición de analito y una muestra de un animal tratado, pero en este caso las muestras son de materia fecal.



Anexo II

Extracción en fase sólida (SPE)

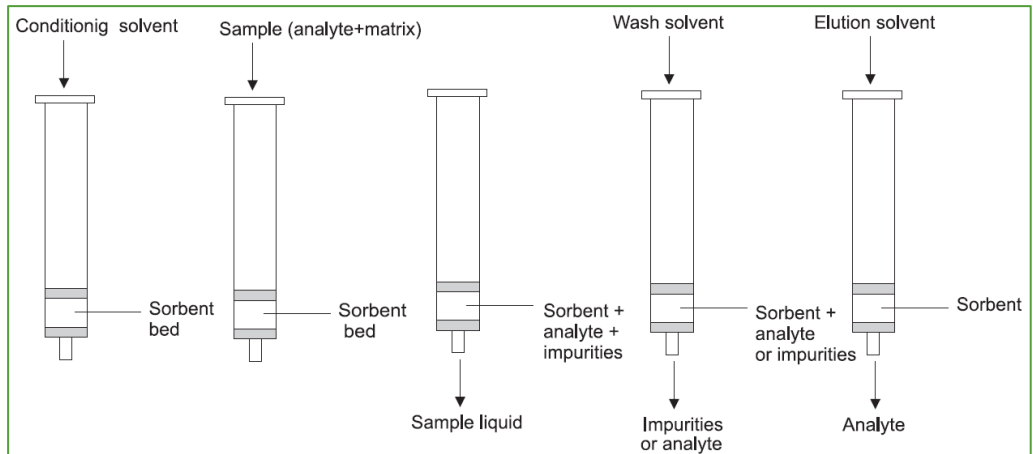
En este trabajo se utilizó SPE, que es una técnica que permite eliminar interferencias y concentrar los analitos. Normalmente se usa una cámara de vacío y una sustancia adsorbente sólida (de aquí el nombre de la técnica) en un soporte que se conoce como cartucho o columnita.



Fotografía del instrumental necesario para la realización de SPE

Las etapas de la extracción en fase sólida pueden resumirse en (1) Acondicionamiento del adsorbente: se humedece con solventes para promover solo adsorción de los analitos (reduciendo adsorción de solventes del extracto); (2) Siembra de la Muestra, en nuestro caso fue: (a) para orina: la dilución con buffer y metanol, (b) para heces: el extracto obtenido de la extracción líquido; (3) Lavado de la columna: se agrega un solvente que pueda remover interferencias que están adsorbidas pero de polaridad diferente a los analitos; (4) Elución: se agrega un solvente que por su afinidad con los analitos o adsorbentes sea capaz de remover los analitos del cartucho SPE [90].

Esquema genérico de trabajo con SPE [90]



Consideraciones para el procesamiento de Heces

Puesto que la toma de muestra es no-invasiva y que las heces constiuyen una de las principales vías de excreción se puede obtener información del estado del organismo incluso de animales salvajes [91]. En la actualidad, el uso de materia fecal con fines clínico-analíticos (microbiológicos [92, 93], endócrino/reproductivos [94-96], zootécnicos [97], farmacológicos [98, 99], etc. [100-102]) continúa siendo frecuente.

A pesar de la facilidad en su toma de muestra, la materia fecal no es una matriz ideal para análisis químicos. En el caso del análisis de esteroides, existe gran variabilidad durante la cuantificación [103, 104], los analitos no están homogéneamente distribuidos [105, 106] pueden ser hidrolizados [105, 107, 108] o incluso sufrir otras modificaciones químicas [109].

Considerando estas situaciones, fue necesario analizar las diferentes alternativas de conservación y evaluar su practicidad. Las alternativas estudiadas para la conservación incluyeron congelación (-20 o -80 °C) [110, 111]; tratamiento térmico para la reducción de carga bacteriana [112]; conservación con etanol [113] y deshidratación en estufa o por liofilización [114]. Luego de evaluar ventajas, desventajas y las posibilidades instrumentales, se decide aplicar liofilización para el procesamiento de heces.

Esquema de liofilización de heces

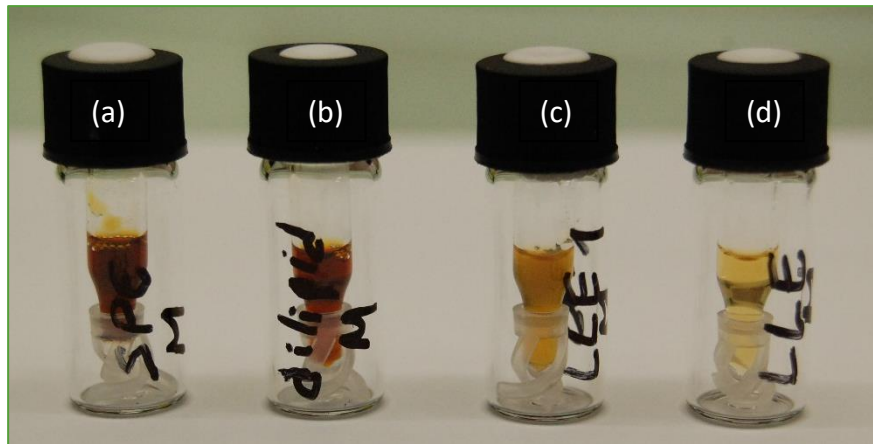
1. Luego de la toma de muestra, se mezcla y se congela a -20 °C.
2. Se descongela a temperatura ambiente.
3. Se toma una porción y se coloca en forma de una fina capa en una placa de petri y se congela a -20 °C.



4. Se coloca en el liofilizador. En 24 h la muestra debe estar liofilizada.



El extracto final obtenido con el método aplicado a las muestras de heces provee un líquido cristalino de color amarillo. Sin embargo, trabajos previos comparan la performance de diferentes alternativas [24]: (a) Solo SPE; (b) Delipidación con diclorometano + SPE; (c) Solo Extracción líquido-líquido; (d) Extracción líquido-líquido + SPE. Realizando inspección visual de los extractos obtenidos con cada uno de los protocolos: es evidente que solo (d) es límpido y que el trabajo con los otros 3 extractos requerirán una mayor frecuencia en los trabajos de mantenimiento en los instrumentos dado por el mayor contenido de sustancias.



Fotografía comparativa de 4 protocolos empleados para el análisis de enobosarm en heces. (a) Solo SPE; (b) Delipidación con diclorometano + SPE; (c) Solo Extracción líquido-líquido; (d) Extracción líquido-líquido + SPE [24].

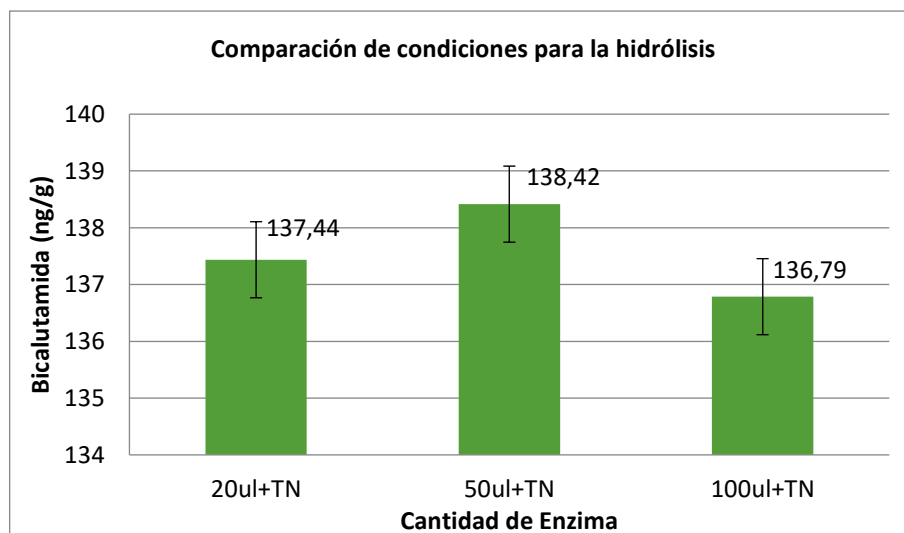
Anexo III

Estudios de Hidrólisis (química y enzimática) y estabilidad de Bicalutamida

Hidrólisis Enzimática

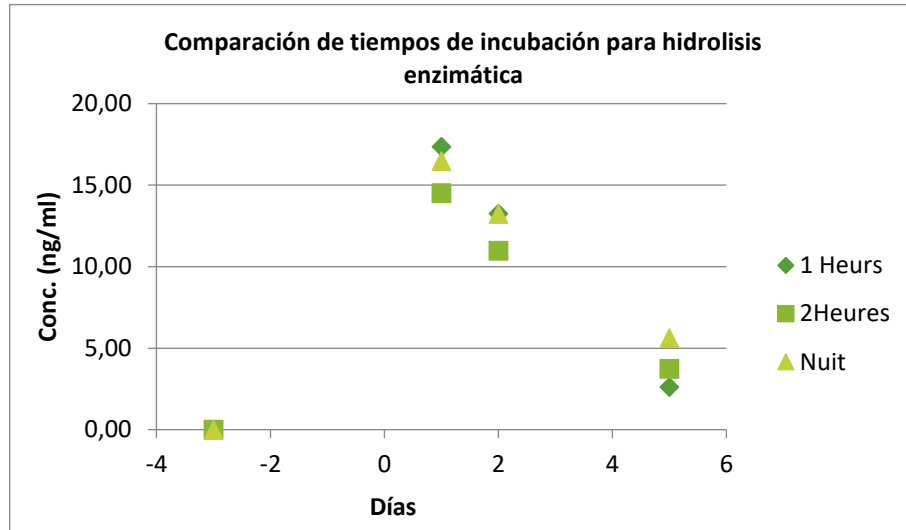
Se trabajó con muestras de orina y heces del animal tratado. Se probaron distintas condiciones (cantidad de enzimas y tiempo de incubación) para estudiar la Hidrólisis de la Bicalutamida conjugada (metabolitos de Fase II).

La siguiente figura muestra los resultados obtenidos utilizando diferentes cantidades de enzimas (expresadas en volumen: 20 μ l; 50 μ l; y 100 μ l) para el análisis de una misma muestra de heces (incubando toda la noche a 50°C). Las líneas verticales de cada barra representan el desvío estándar encontrado del ensayo (0,67 ng/g).



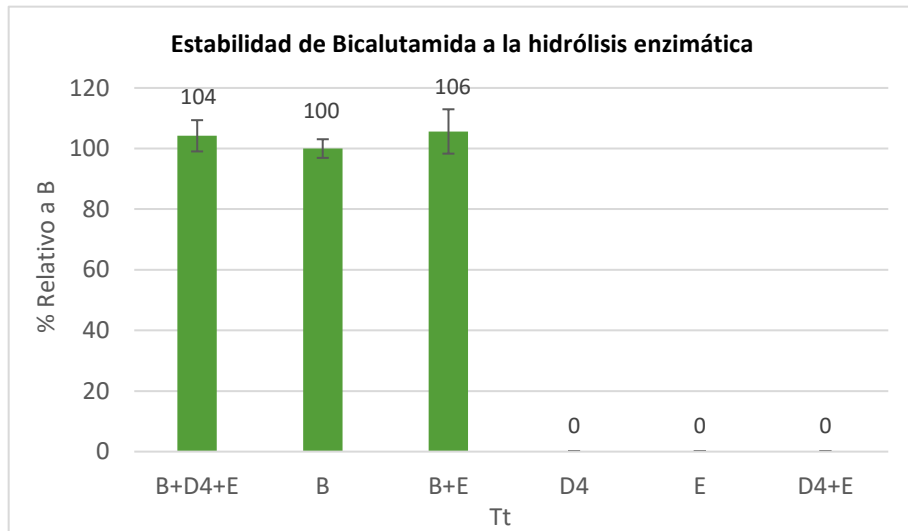
Los resultados muestran que trabajando con 20 μ l de enzima los resultados son equivalentes a trabajar con 50 μ l y tampoco aumentan utilizando 100 μ l. No se observa tendencia y las concentraciones obtenidas con 20 μ l o 50 μ l, no muestran diferencias significativas puesto que se superponen los desvíos estándar.

La siguiente figura muestra las concentraciones de Bicalutamida en orina de diferentes días para diferentes tiempos de incubación: una hora (1 heures), dos horas (2 heures) y durante toda la noche (nuit).



No se observaron marcadas diferencias ni tendencias entre los ensayos para poder seleccionar según la concentración de Bicalutamida liberada. Por razones operativas, se escogió la incubación de toda la noche (50 °C).

Se ensayó de estabilidad de Bicalutamida a la acción enzimática: se buscó conocer si la actividad enzimática altera (aumenta/disminuye) la concentración de Bicalutamida. Con este propósito se incubaron 5 tubos con las siguientes mezclas: Bicalutamida + Bicalutamida-D4 + Enzima (B+D4+E); Bicalutamida (B); Bicalutamida + Enzima (B+E); Bicalutamida-D4 (D4); Enzima (E) y Bicalutamida-D4 + Enzima (D4+E). Luego de la incubación durante la noche (10 horas) se determinaron las concentraciones de Bicalutamida. Considerando que las cantidades de Bicalutamida en cada mezcla fue la misma se construyó la siguiente figura expresando la concentración de Bicalutamida en porcentajes relativos al tubo B (100 %).



Puede observarse escasa diferencia en los porcentajes (desvío estándar) obtenidos en tubos con Bicalutamida y ausencia en tubos donde no se añadió. Estos resultados respaldan la estabilidad de Bicalutamida a la acción enzimática.

Hidrólisis Química

Se probaron 3 métodos de Hidrólisis descritos en la bibliografía consultada [12, 13]. De esta forma se buscó liberar a la Bicalutamida conjugada (metabolitos de Fase II).

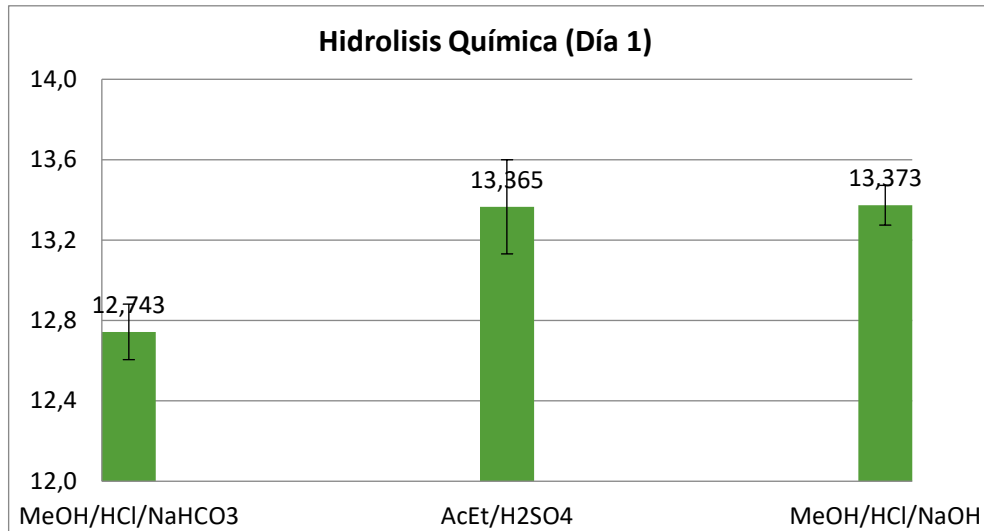
Se trabajó con orina del día 1 en todos los casos para obtener resultados comparables. Cada ensayo se llevó a cabo al menos por duplicado y como máximo 5 veces.

1) Método 1 (MeOH/HCl/NaOH): La muestra de orina fue tratada con el mismo método SPE (Ver Materiales y Método). La modificación para realizar la Hidrólisis se llevó a cabo luego de evaporar los 4 ml de metanol (eluído), los residuos fueron tratados con ácido clorhídrico (HCl) en metanol (MeOH), para detener la reacción se empleó hidróxido sódico (NaOH).

2) Método 2 (MeOH/HCl/NaHCO₃): Se aplica el Método 1, pero para detener la reacción se añade carbonato ácido de sodio (NaHCO₃).

3) Método 3 (AcEt/H₂SO₄): para la hidrólisis se empleó una mezcla de acetato de etilo (AcEt) con ácido sulfúrico (H₂SO₄) y se detiene con NaOH.

Comparación de las concentraciones promedio de Bicalutamida determinadas en orina del día 1.



Los resultados obtenidos con los métodos de Hidrólisis no alcanzaron los valores del método enzimático (17,36 ng/ml).

Con propósito de determinar la ausencia de degradación de la Bicalutamida y de la Bicalutamida-D4 (ISTD) a los agentes químicos, se sometió a Bicalutamida a las condiciones de hidrólisis química. Se prepararon tubos con mezclas conteniendo la misma cantidad de Bicalutamida, similares al ensayo de estabilidad de Bicalutamida a la actividad enzimática. No se observaron alteraciones en la concentración de Bicalutamida (aumento/disminución) en ninguno de los casos. Los datos de estos ensayos no se incluyen dado que el resto del trabajo se realizó por hidrólisis enzimática.

Como conclusiones de estos ensayos se pudo observar que Bicalutamida es resistente a la acción enzimática y a las hidrólisis químicas probadas. Se pudo establecer que la hidrólisis enzimática tiene un mejor desempeño, se fijaron volumen de extracto enzimático y tiempo de incubación.

Anexo IV

Evaluación del método

Las siguientes tablas muestran la señal (S) obtenida luego de añadir los analitos a *muestras blanco* (animales no tratados). Estos datos fueron usados para la construcción de las *curvas de calibración*.

Ensayos con Orina

Curvas de Calibración: se utilizaron para el cálculo de la concentración de los SARMs y se procesaron junto con las muestras.

	Hidroxiiflutamida	Enobosarm	Bicalutamida	Andarina
Concentración (ng/ml)	S (A/IS)	S (A/IS)	S (A/IS)	S (A/IS)
0,25	0,452	0,240	0,329	0,125
0,5	0,762	0,720	0,532	0,302
1	1,490	1,060	1,154	0,470
3	4,386	2,871	2,921	1,079
10	13,230	9,496	10,957	4,264
30	40,991	29,122	29,450	11,635

S (A/IS): es la señal obtenida de la relación entre el área del analito (A) y el área del estándar interno (IS).

	Hidroxiiflutamida	Enobosarm	Bicalutamida	Andarina
Concentración(ng/ml)	S (A/IS)	S (A/IS)	S (A/IS)	S (A/IS)
0,25	0,521	0,331	0,316	0,198
1	0,826	0,546	0,515	0,265
0,5	1,530	0,916	1,077	0,292
3	4,120	3,476	2,540	0,830
10	13,923	11,028	10,499	3,399
30	48,213	28,156	28,824	10,058

	Hidroxiiflutamida	Enobosarm	Bicalutamida	Andarina
Concentración(ng/ml)	S (A/IS)	S (A/IS)	S (A/IS)	S (A/IS)
0,25	0,673	0,392	0,360	0,138
0,5	0,784	0,484	0,688	0,299
1	1,835	1,176	1,150	0,369
3	5,051	2,720	3,296	1,284
10	15,794	9,298	8,721	3,281
30	38,928	31,276	28,351	10,796

Ensayos de Recuperación: se realizan para calcular la recuperación (*exactitud*), la variabilidad (*precisión*) y el límite de cuantificación (*sensibilidad*).

Hidroxiflutamida			
Conc_Nom (ng/ml)	C1	C2	C3
0,25	0,252	0,293	0,255
0,5	0,540	0,538	0,554
1	1,151	1,015	1,041
3	3,555	2,953	2,899
10	9,711	9,810	9,811
30	34,567	29,629	29,182

Enobosarm			
Conc_Nom (ng/ml)	C1	C2	C3
0,25	0,194	0,183	0,194
0,5	0,539	0,581	0,541
1	1,016	1,081	1,115
3	3,199	3,177	3,059
10	11,840	10,677	10,494
30	29,352	33,623	30,420

Bicalutamida			
Conc_Nom (ng/ml)	C1	C2	C3
0,25	0,244	0,270	0,239
0,5	0,520	0,499	0,535
1	1,033	1,063	1,098
3	3,246	3,345	3,063
10	10,281	10,821	10,287
30	30,341	31,137	30,102

Andarina			
Conc_Nom (ng/ml)	C1	C2	C3
0,25	0,179	0,257	0,225
0,5	0,489	0,502	0,391
1	0,809	0,832	1,015
3	3,059	3,203	2,935
10	10,697	10,033	8,203
30	26,509	31,300	27,277

Los resultados se presentan resumidos en la Tabla 14 (pág. 83)

Ensayos con Heces

Curvas de calibración: dado que las concentraciones encontradas en heces variaron en un rango amplio, varios órdenes de magnitud, la pendiente de las curvas cambia y por esta razón se construyó más de una curva para cada analito. A continuación, las tablas correspondientes a los datos obtenidos:

Hidroxi flutamida			
Concentración(ng/ml)	S1 (A/IS)	S2 (A/IS)	S3 (A/IS)
0,5	0,803	0,843	0,883
1	1,580	1,772	1,413
3	4,697	5,032	5,242
10	16,214	16,454	16,734
30	45,851	48,598	45,527
50	75,525	71,865	77,501

Concentración(ng/ml)	S1 (A/IS)	S2 (A/IS)	S3 (A/IS)
100	1,313	1,332	1,283
200	1,696	1,764	1,831
300	2,089	2,159	2,298
500	2,911	2,886	3,162
800	3,996	3,919	4,358
1000	5,185	5,361	5,096
1300	5,975	5,863	6,086
1600	7,006	7,208	7,410

Enobosarm			
Concentración(ng/ml)	S1 (A/IS)	S2 (A/IS)	S3 (A/IS)
0,5	0,511	0,501	0,524
1	1,079	1,112	1,0116
3	3,012	3,171	3,047
10	14,201	14,113	13,919
30	37,728	37,477	37,594
50	56,210	57,299	58,666

Concentración(ng/ml)	S1 (A/IS)	S2 (A/IS)	S3 (A/IS)
100	0,065	0,066	0,068
200	0,109	0,113	0,102
300	0,161	0,153	0,169
500	0,261	0,286	0,218
800	0,399	0,402	0,406
1000	0,484	0,464	0,475
1300	0,609	0,615	0,536
1600	0,787	0,691	0,765

Bicalutamida			
Concentración(ng/ml)	S1 (A/IS)	S2 (A/IS)	S3 (A/IS)
0,5	0,6411	0,6357	0,6144
1	1,3367	1,3867	1,3292
3	4,0577	4,1266	4,1212
10	13,5737	14,2111	15,1293
30	34,7732	40,8141	38,7106
50	60,4741	63,3234	58,3000

Concentración(ng/ml)	S1 (A/IS)	S2 (A/IS)	S3 (A/IS)
100	0,2426	0,2735	0,2513
200	0,4319	0,4596	0,4681
300	0,6530	0,6389	0,6451
500	0,9776	1,0022	0,9236
800	1,4252	1,3900	1,4965
1000	1,7101	1,8105	1,8021
1300	2,3373	2,3578	2,3474
1600	2,8973	2,7809	2,5733

Andarina			
Concentración (ng/ml)	S1 (A/IS)	S2 (A/IS)	S3 (A/IS)
0,5	0,1317	0,1064	0,1472
1	0,3814	0,2882	0,3856
3	1,4317	1,4309	1,4170
10	5,2128	5,6285	5,3778
30	13,0808	13,1015	13,4488
50	21,0125	21,0398	21,0182

Concentración (ng/ml)	S1 (A/IS)	S2 (A/IS)	S3 (A/IS)
100	0,0656	0,0675	0,0586
200	0,1040	0,1040	0,0940
300	0,1421	0,1392	0,1243
500	0,2184	0,2047	0,1953
800	0,2760	0,3069	0,2521
1000	0,3286	0,3479	0,3231
1300	0,4458	0,4497	0,4181
1600	0,5500	0,5279	0,4885

Ensayos de Recuperación: debido a que este ensayo tiene como objetivo conocer la exactitud del método en el rango de concentraciones de trabajo, al igual que las curvas de calibración, la recuperación se realizó en todo el rango. A continuación, los resultados obtenidos:

Hidroxiflutamida			
Concentración (ng/ml)	C1	C2	C3
0,5	0,542	0,563	0,495
1	1,085	0,985	0,900
3	3,294	2,936	3,194
10	9,293	10,100	9,837
30	31,498	29,400	34,500
50	53,796	54,000	51,000
100	96,770	93,000	97,000
200	175,610	184,000	214,000
300	333,709	318,000	291,000
500	502,273	480,000	545,000
800	758,659	776,000	752,000
1000	1010,911	900,000	1120,000
1300	1281,476	1248,000	1287,000
1600	1597,087	1520,000	1456,000

Enobosarm			
Concentración (ng/ml)	C1	C2	C3
0,5	0,584	0,498	0,501
1	0,998	1,045	1,087
3	2,871	3,077	2,957
10	9,777	9,185	10,560
30	30,708	26,835	26,793
50	50,290	46,240	51,280
100	111,809	97,684	84,532
200	206,246	199,367	220,841
300	277,474	262,004	306,068
500	507,487	581,649	478,725
800	785,680	795,520	753,920
1000	903,100	983,100	1023,700
1300	1250,600	1369,940	1200,680
1600	1509,280	1685,760	1621,920

Bicalutamida			
Concentración (ng/ml)	C1	C2	C3
0,5	0,486	0,428	0,489
1	1,006	0,984	1,094
3	2,977	3,185	3,214
10	9,412	9,827	10,813
30	25,293	31,239	27,957
50	43,555	49,600	49,630
100	82,651	93,657	102,817
200	191,595	205,869	204,540
300	309,746	304,899	298,260
500	421,100	496,010	440,850
800	811,120	737,440	842,960
1000	932,600	913,300	941,900
1300	1227,590	1158,560	1201,460
1600	1429,760	1558,240	1653,440

Andarina			
Concentración (ng/ml)	C1	C2	C3
0,5	0,470	0,457	0,460
1	1,012	0,930	0,872
3	2,737	3,193	2,650
10	9,526	9,820	8,432
30	27,702	27,732	27,423
50	42,695	45,085	49,620
100	73,555	104,216	100,366
200	216,000	199,915	184,563
300	294,922	316,800	293,474
500	396,650	496,800	406,100
800	746,560	642,400	672,880
1000	941,700	904,100	802,200
1300	1110,070	1174,420	1044,290
1600	1426,240	1317,600	1362,720

Anexo V

Primer ensayo con animales

Perfiles de eliminación

ORINA

A continuación, se presenta la tabla de resultados obtenidos para Bicalutamida en orina de bovino de raza *Montbeliard*:

Día	Libre		Total	
	Conc(ng/ml)	SD (ng/ml)	Conc(ng/ml)	RSD %
-3	nd	nd	nd	-
0	nd	nd	nd	-
0,17	2,82	0,06	2,84	2
0,33	5,50	0,65	8,79	12
1	13,15	0,42	17,36	3
2	9,62	1,56	13,25	16
3	6,95	0,25	11,06	4
4	1,74	0,08	4,55	5
5	2,32	0,17	2,61	7
6	0,95	0,01	1,72	2
7	0,72	0,02	1,24	3

Los valores de concentración, SD (desvío estándar) y RSD fueron calculados por la determinación por quintuplicado de cada día.

HECES

A continuación, se presenta la tabla de resultados obtenidos para Bicalutamida en heces de bovino de raza *Montbeliard*:

Día	Libre		Total	
	Conc (ng/ml)	SD (ng/ml)	Conc(ng/ml)	RSD %
-3	nd	nd	nd	-
0	nd	nd	nd	-
0,17	7,10	0,33	2,83	5
0,34	119,07	3,08	130,33	3
1	1254,11	73,32	1346,66	6
2	776,58	10,12	966,56	1
3	471,25	40,29	491,76	9
4	213,52	22,24	247,92	10
5	112,32	2,55	117,69	2
6	82,00	3,59	60,70	4
7	52,90	1,43	37,35	3

Los valores de concentración, SD (desvío estándar) y RSD fueron calculados por la determinación por quintuplicado de cada día.

De las 2 tablas anteriores se puede concluir que los métodos aplicados (para orina y heces) tiene una buena reproducibilidad si consideramos los RSD cumplen con el criterio establecido (< 20 %).

Anexo VI

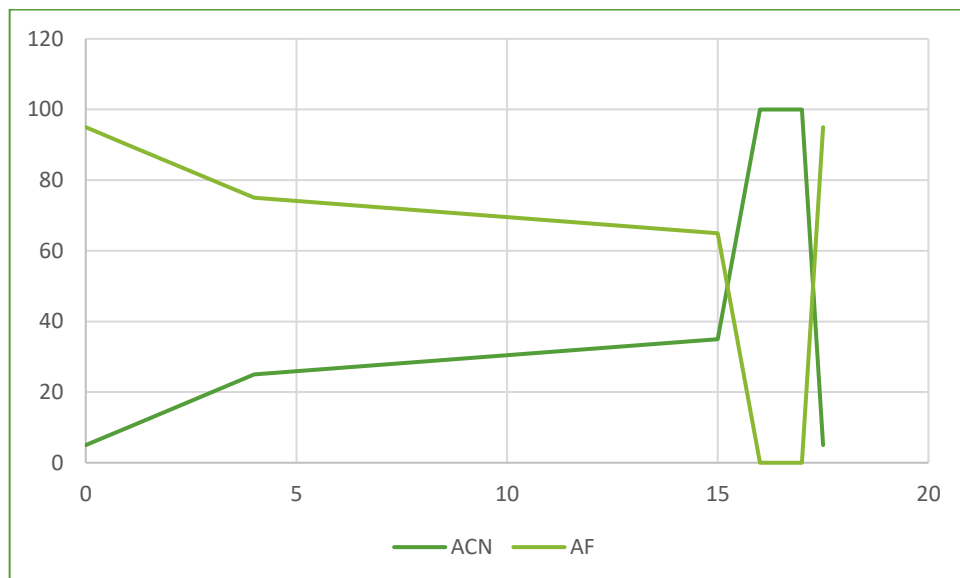
Primer Ensayo Animal: Análisis de Metabolitos

Sistema cromatográfico

Los metabolitos de FASE I son sustancias que fueron modificadas por el organismo para hacerlas más hidrosolubles y poder ser transportadas por el torrente sanguíneo. Por esta razón, los metabolitos de SARMS son sustancias más polares y el gradiente de la fase móvil debe adaptarse con el objetivo de separar este conjunto de compuestos.

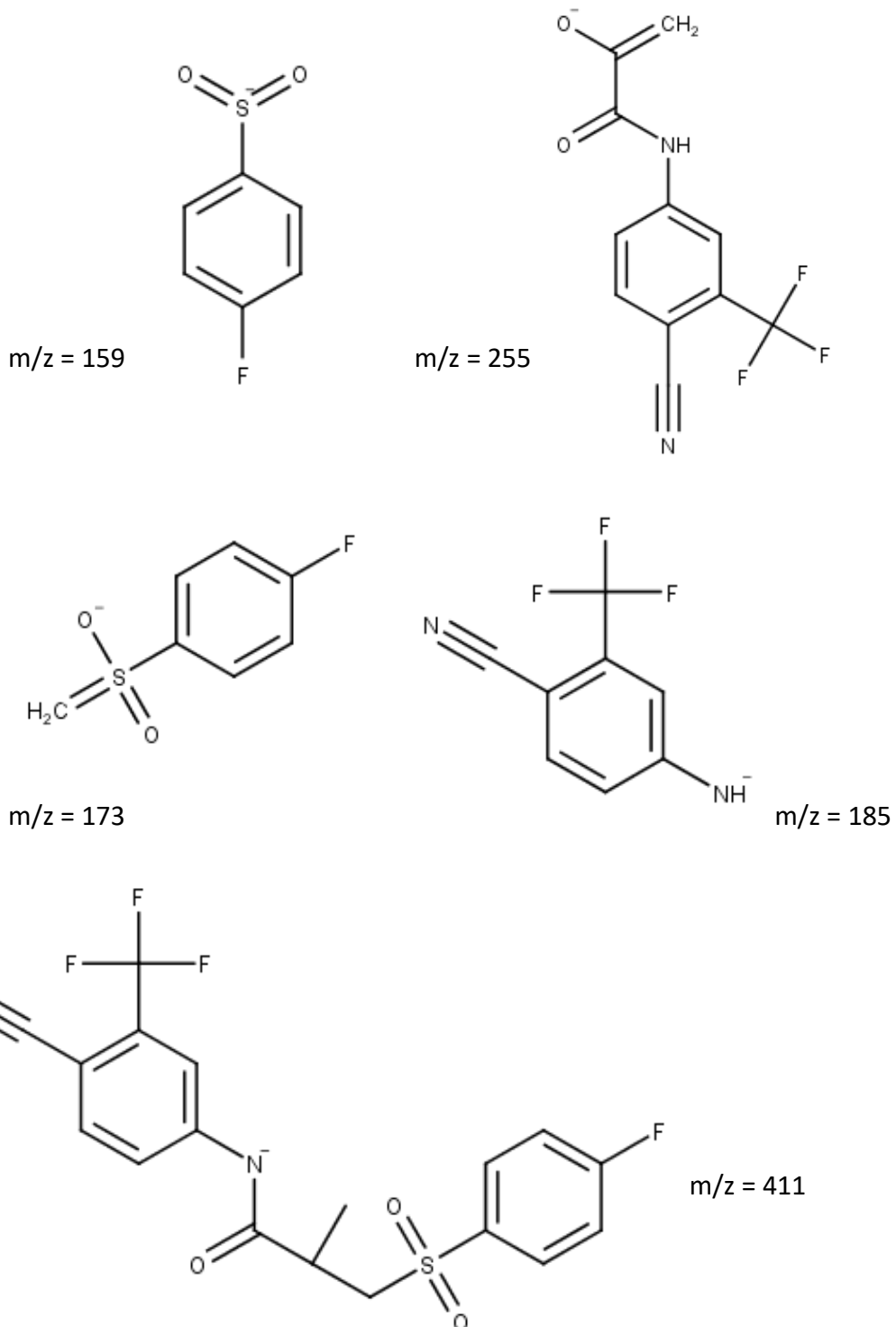
A continuación, se detalla el sistema empleado para el estudio de los metabolitos de FASE I:

- Columna ACQUITY UPLC BEH C18 (1,7 μm ; 2,1 x 100 mm)
- Volumen de Inyección: 2 μl
- Fase Móvil: Ácido Fórmico 0,1% (AF) / Acetonitrilo (ACN)
- Flujo: 0,4ml/min



Fragmentos característicos de Bicalutamida

Estudiando los trabajos previos realizados con administración de Bicalutamida a distintos animales o incubando en una mezcla de extractos enzimáticos (que simulan procesos metabólicos de diferentes especies) [30, 31, 49, 82], se observa que los metabolitos obtenidos presentan espectros de masas donde se encuentran los siguientes fragmentos:



Estos fragmentos están relacionados químicamente con la Bicalutamida (Figura 7 (a); pág. 39) y su presencia podría indicar la fragmentación de Bicalutamida o algún metabolito. La siguiente tabla resume los fragmentos utilizados en trabajos previos para la identificación de los SARMs y sus metabolitos.

Tabla con los iones de interés para el análisis MS de los SARMs

	Enobosarm	Andarina	Bicalutamida	Hidroxi-flutamida
Ion precursor (m/z)	388,1	440,0	428,9	291,1
Iones producto (m/z)	118,1	150,1		155,0
	184,9	205,0	185,1	159,0
	241,1	261,1	255,1	175,0
	269,1	289,1		205,0

Luego los métodos de scan descritos en *Estudio de metabolitos* (pág.87) son utilizados para localizar posibles metabolitos y proponer estructura sobre la base de los fragmentos encontrados (m/z). El primer paso es realizar scan simple variando la energía de cono (sin colisión) y luego aplicar:

- Parent Scan Ion, nos brinda información de posibles iones (m/z) que generan el ion de interés.
- Product Scan Ion, para obtener los iones que son generados de la fragmentación del ion de interés.
- Neutral Scan Ion, para conocer qué fragmentos no cargados (neutros) son generados de la fragmentación del ion de interés.

Con esa información, espectros de masa, fragmentos precursores, fragmentos productos, pérdidas neutras y también información de trabajos previos, se realizó la propuesta de los metabolitos de Fase I de Bicalutamida.

Anexo VII

Ajuste de la energía de cono

Para asegurar una buena sensibilidad de respuesta para los analitos se ajustaron diferentes parámetros del detector de masas analizando una solución estándar de los SARMs, como se indican en los Materiales y Métodos.

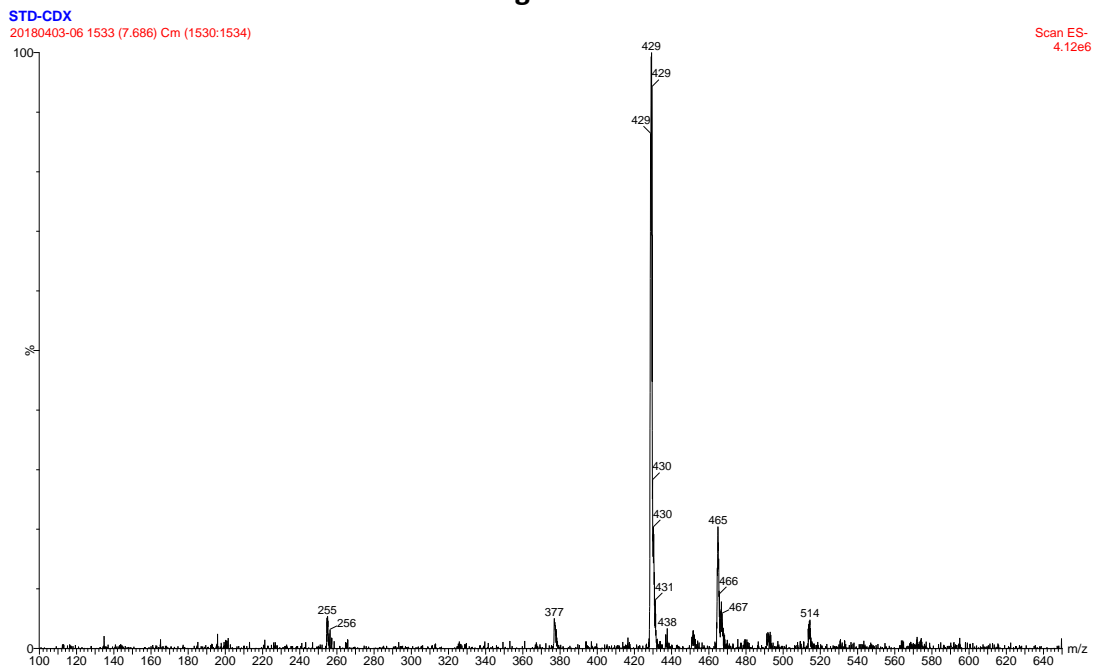
En un detector de Masas con analizador de simple cuadrupolo un parámetro muy importante, por conducir la ionización y fragmentación de las sustancias es la energía de cono (voltaje).

Los valores utilizados en el segundo ensayo con animales, que se detallan en Resultados y Discusión Tabla18 (pág. 105), se determinaron aplicando distintos voltajes durante un análisis cromatográfico y comparando la señal (espectro de masas) obtenida.

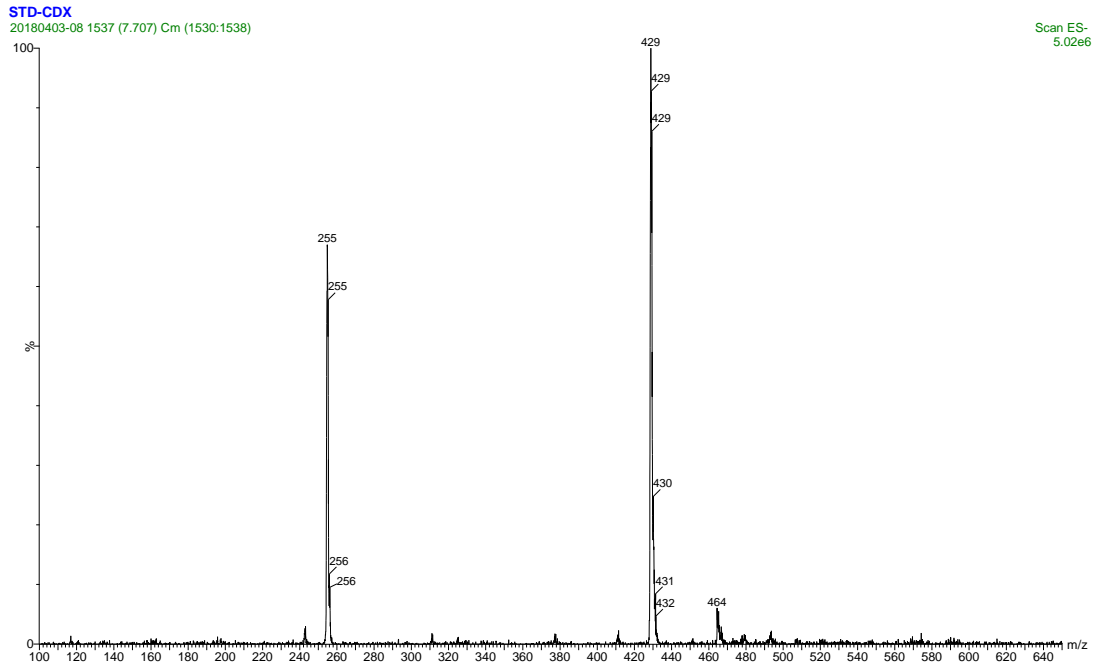
A continuación, se presentan algunos resultados obtenidos durante el ajuste realizado con Bicalutamida, para mostrar la variación de la señal de cada fragmento con la variación de la energía de cono:

Bicalutamida ($m/z = 429$ y $m/z = 255$)

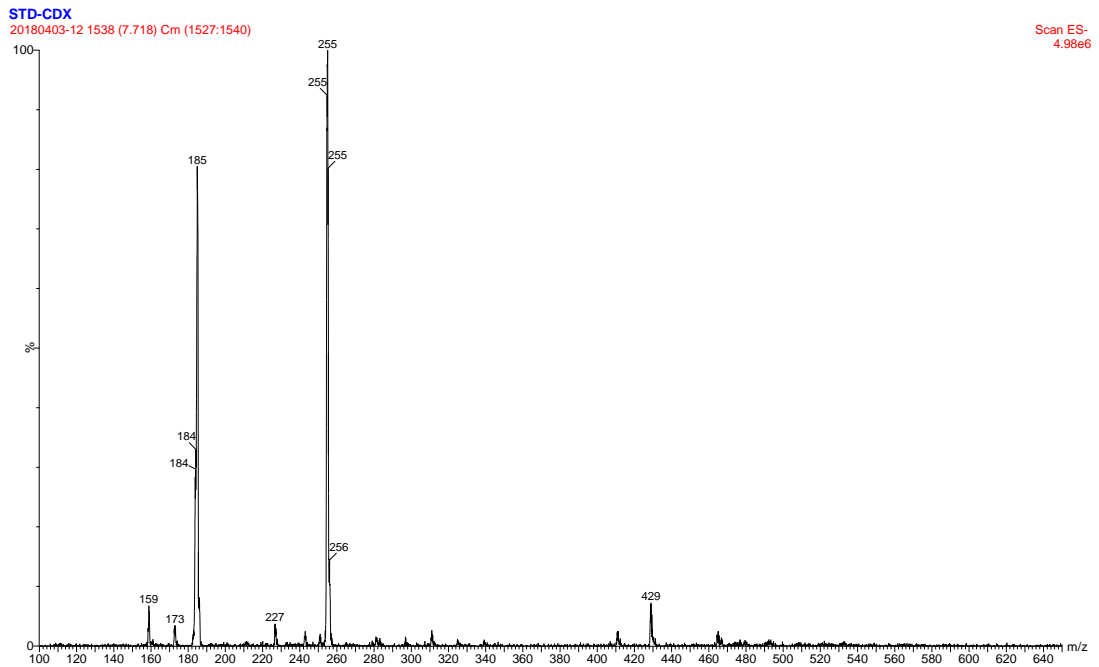
Espectro de masas obtenido de una solución de Bicalutamida (0,05 ug/ml) con una energía de cono - 15 v



Espectro de masas obtenido de una solución de Bicalutamida (0,05 ug/ml) con una energía de cono - 30 v

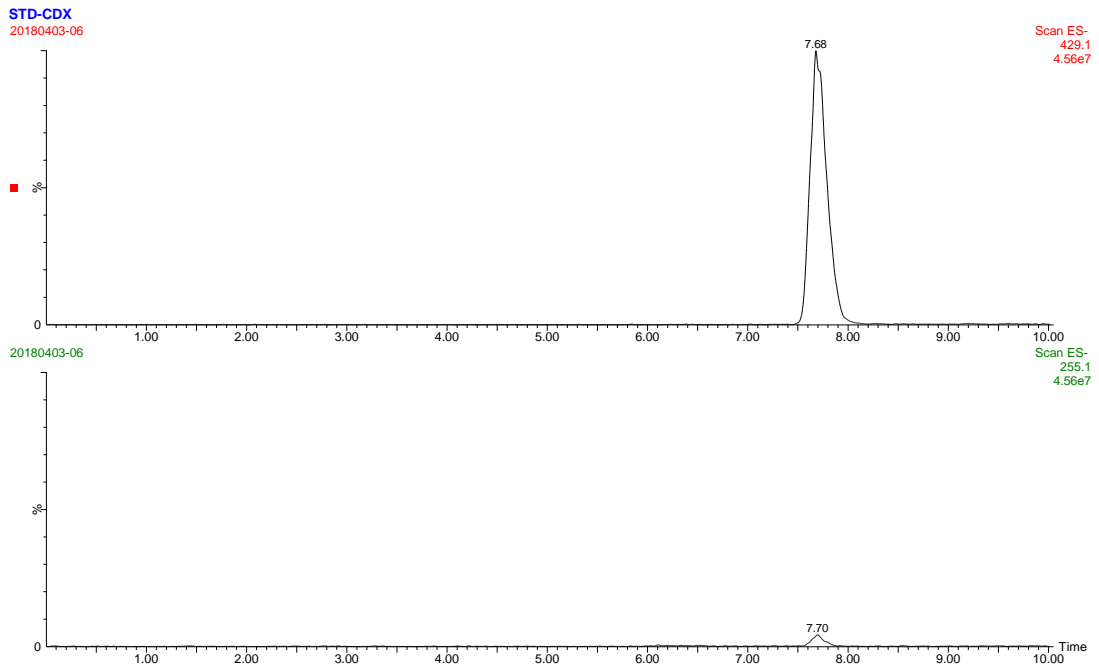


Espectro de masas obtenido de una solución de Bicalutamida (0,05 ug/ml) con una energía de cono - 60 v

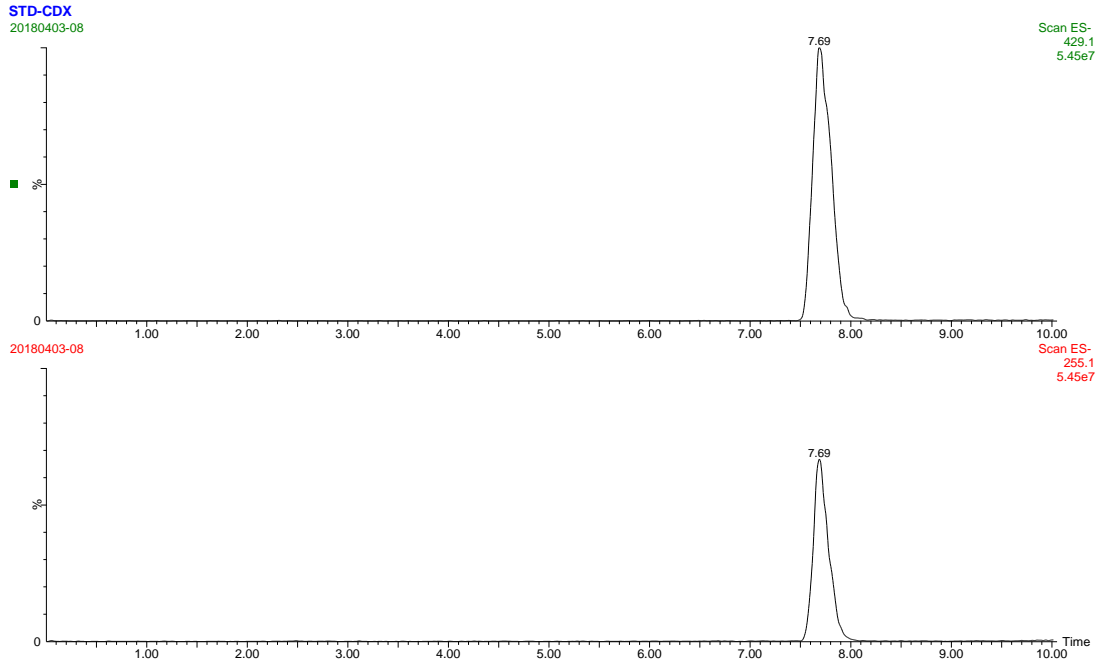


Otra forma de presentar los mismos datos es a través de los cromatogramas la energía de cono empleada:

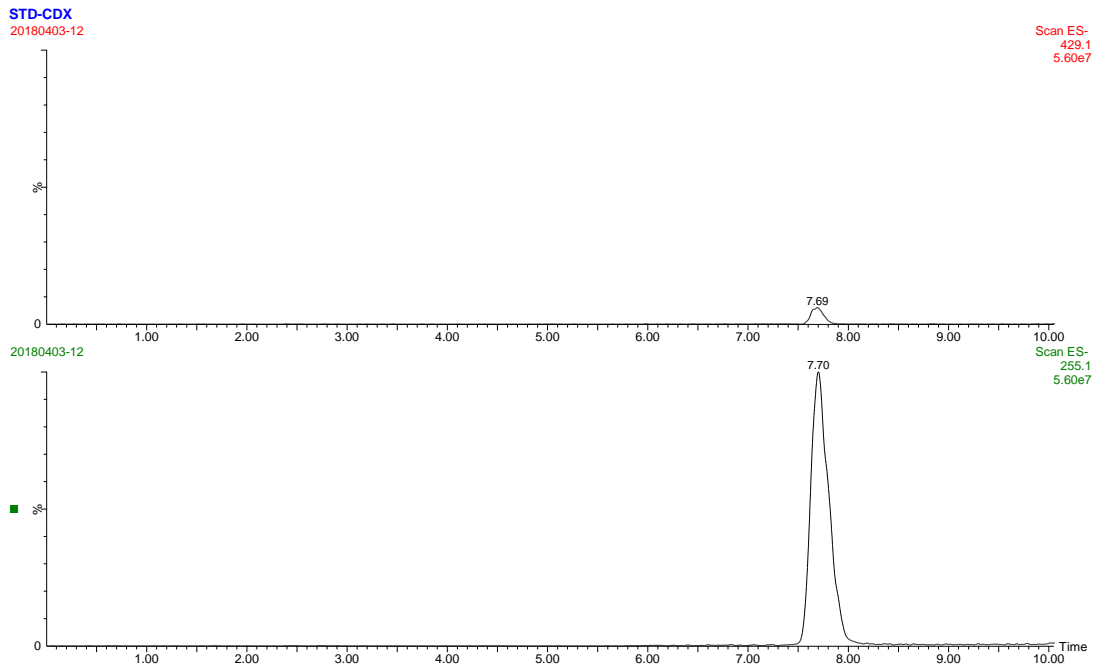
Energía de cono: - 15 v



Energía de cono: - 30 v

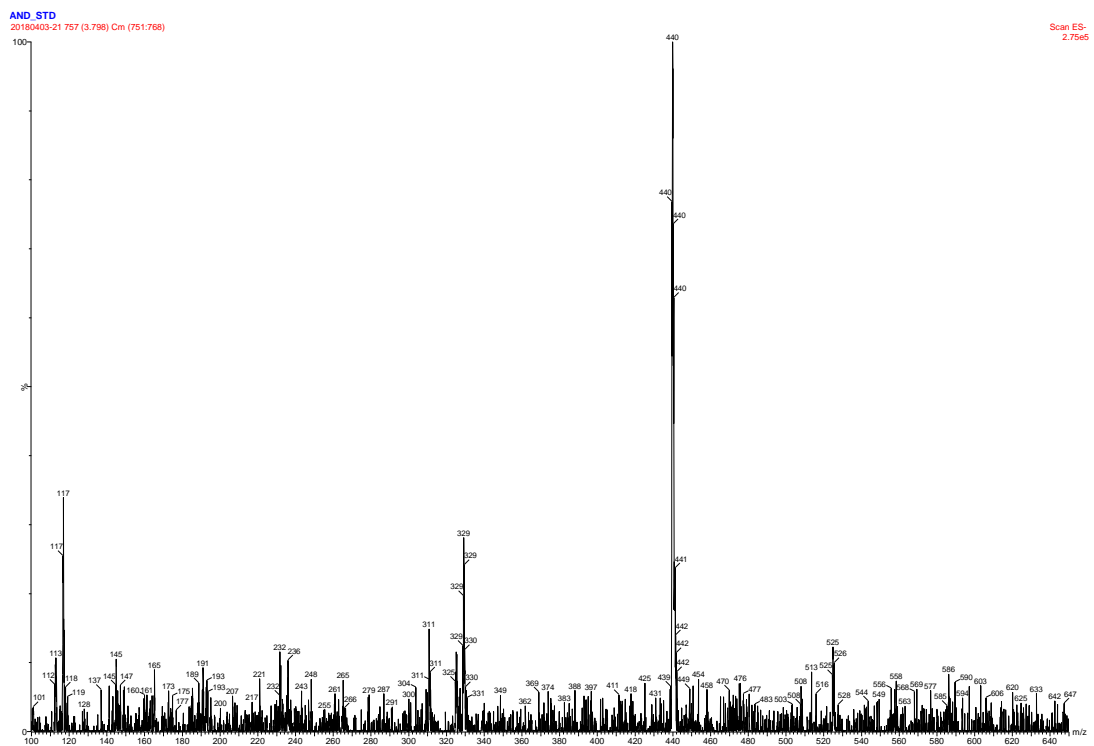


Energía de cono: - 60 v

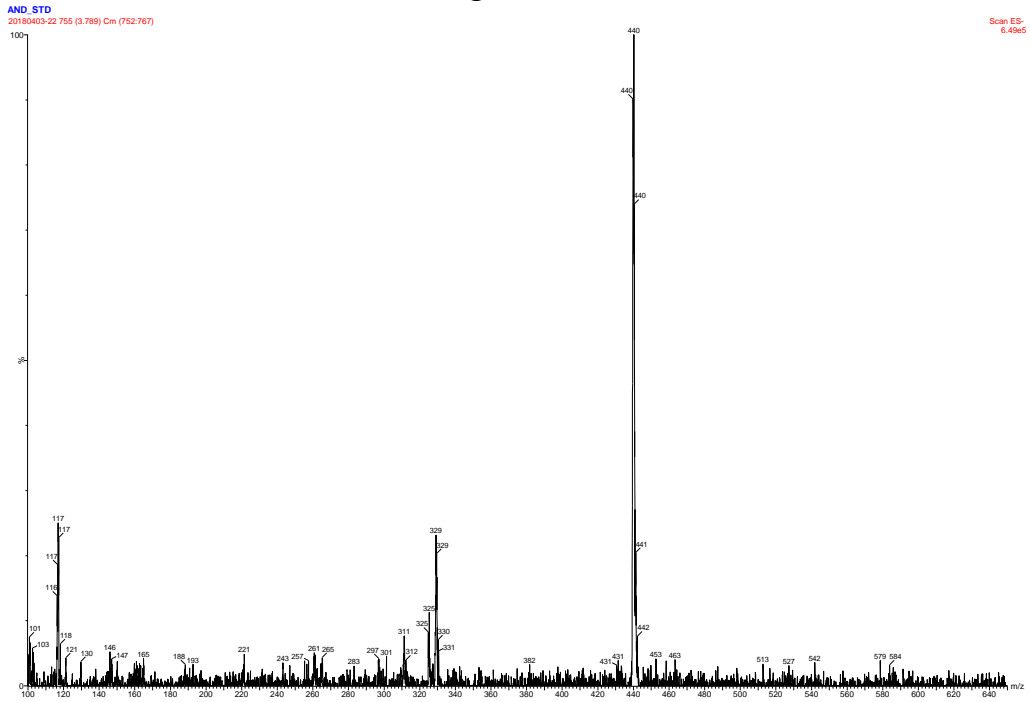


Andarina (m/z = 440 y m/z = 261)

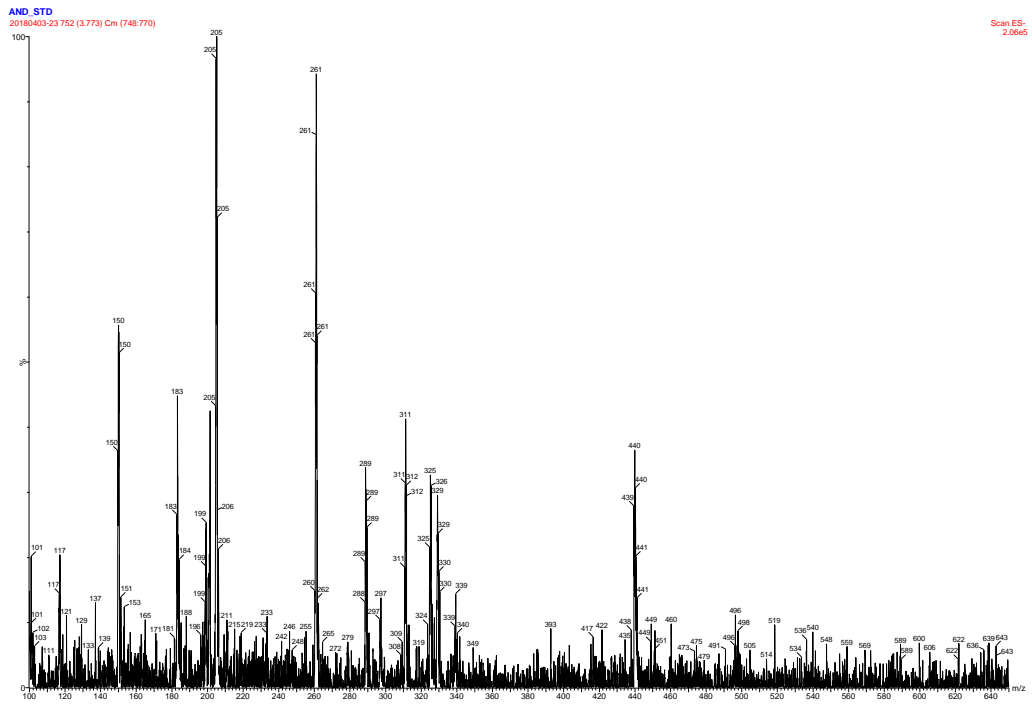
Espectro de masas obtenido de una solución de Andarina (0,05 ug/ml) con una energía de cono - 15 v



Espectro de masas obtenido de una solución de Andarina (0,05 ug/ml) con una energía de cono - 30 v

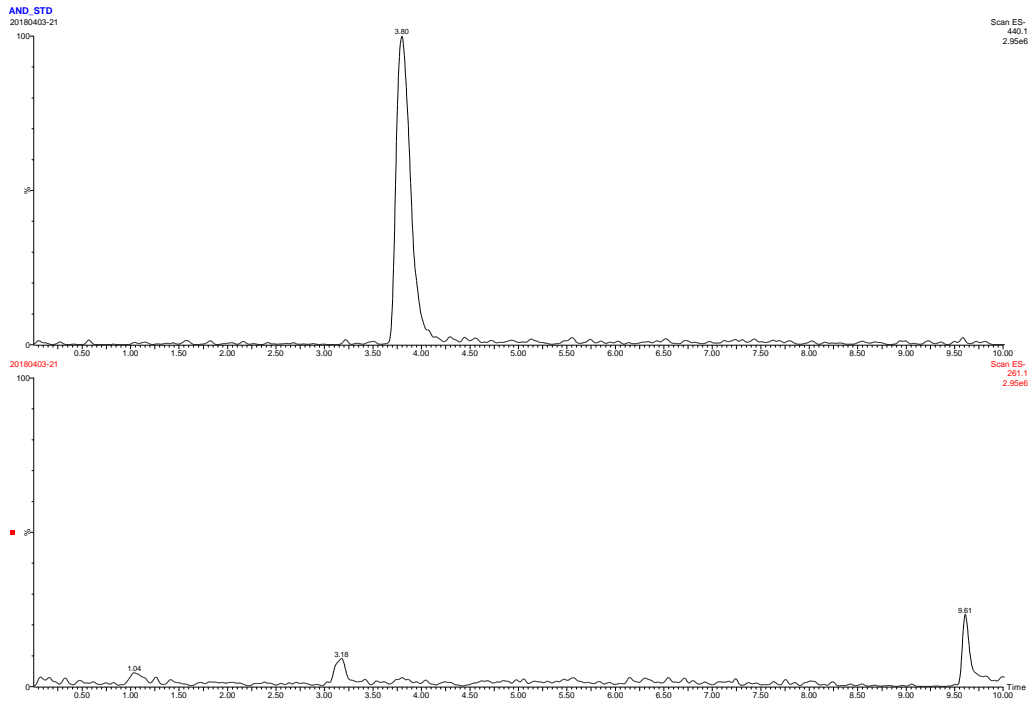


Espectro de masas obtenido de una solución de Andarina (0,05 ug/ml) con una energía de cono - 60 v

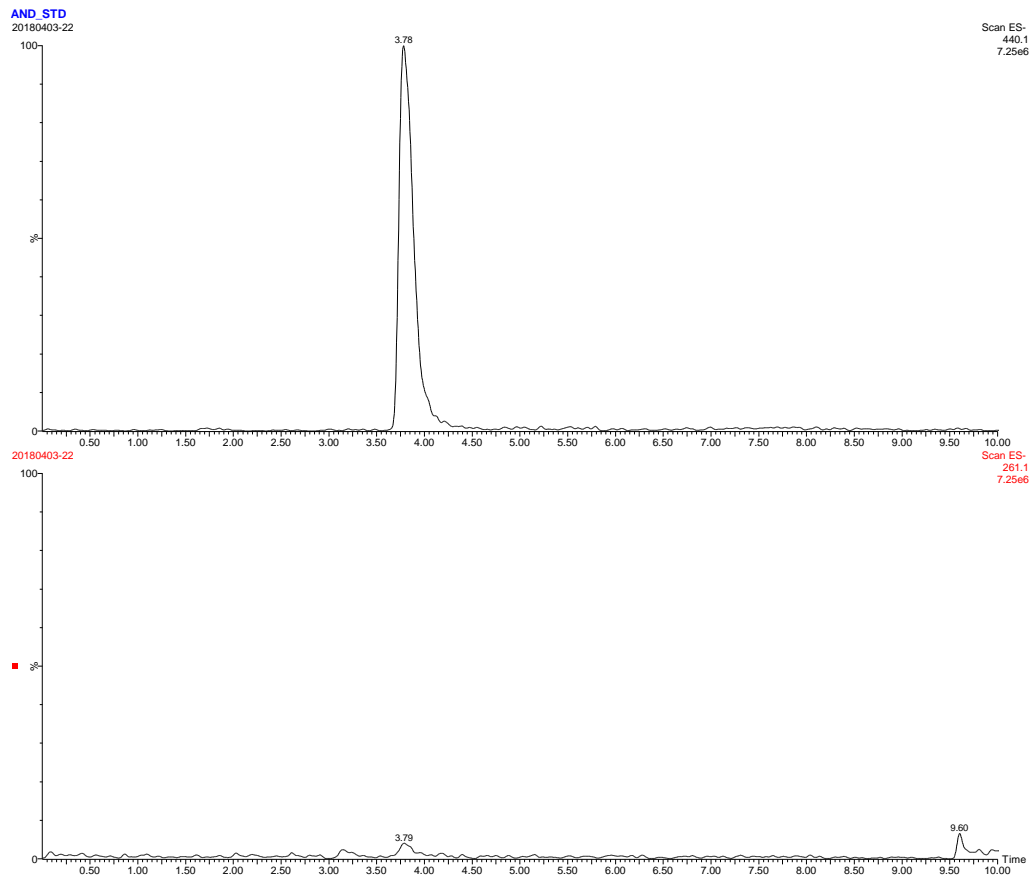


Otra forma de presentar los mismos datos es a través de los cromatogramas la energía de cono empleada:

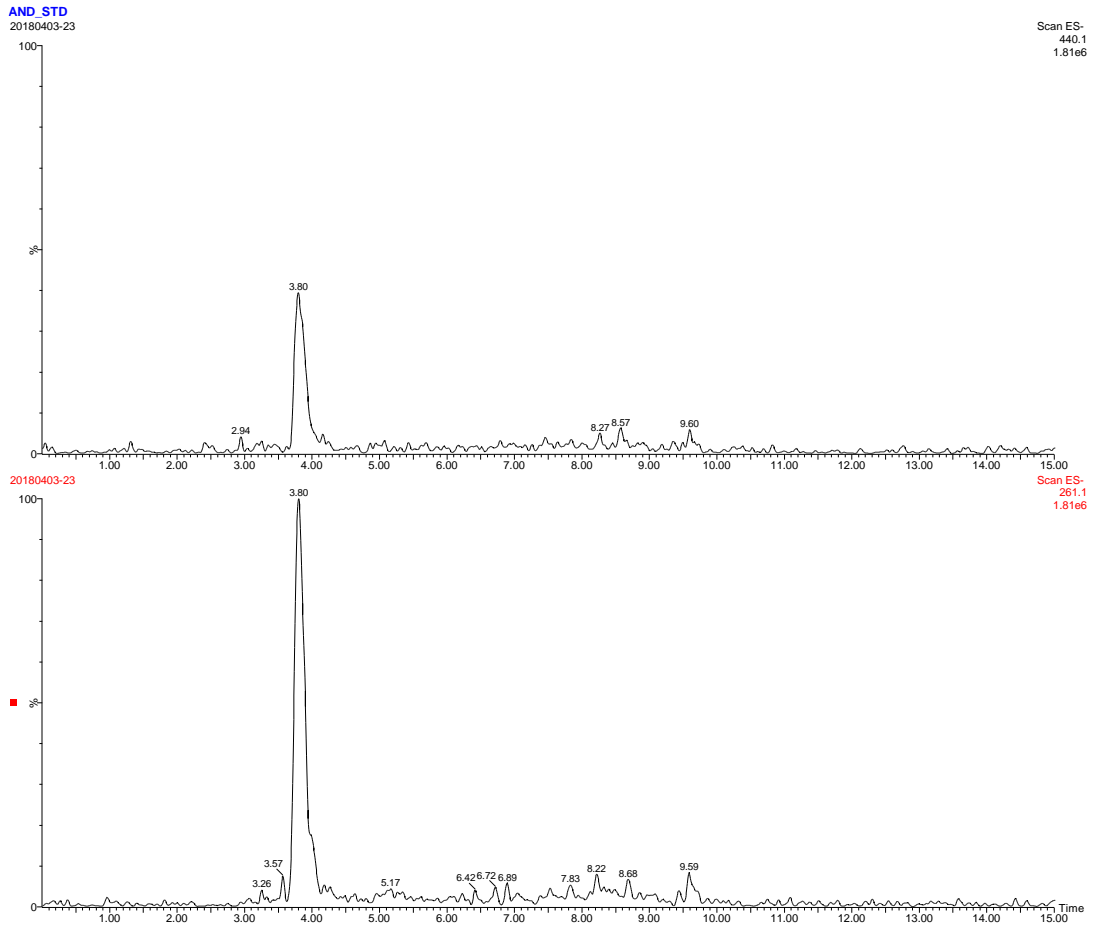
Energía de cono: - 15 v



Energía de cono: - 30 v

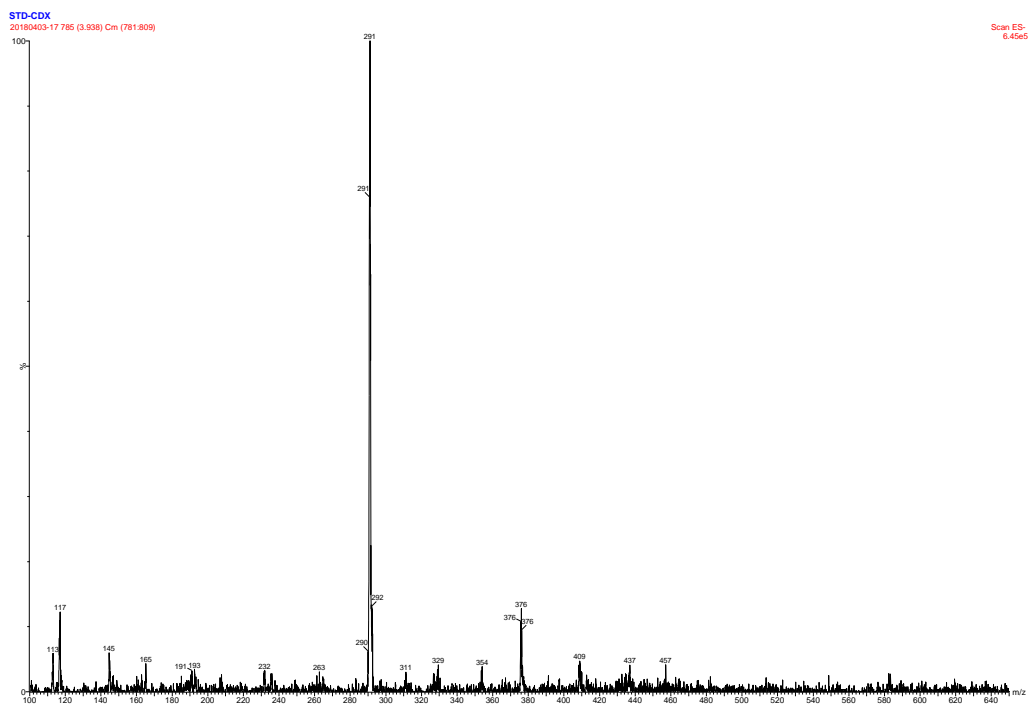


Energía de cono: - 60 v

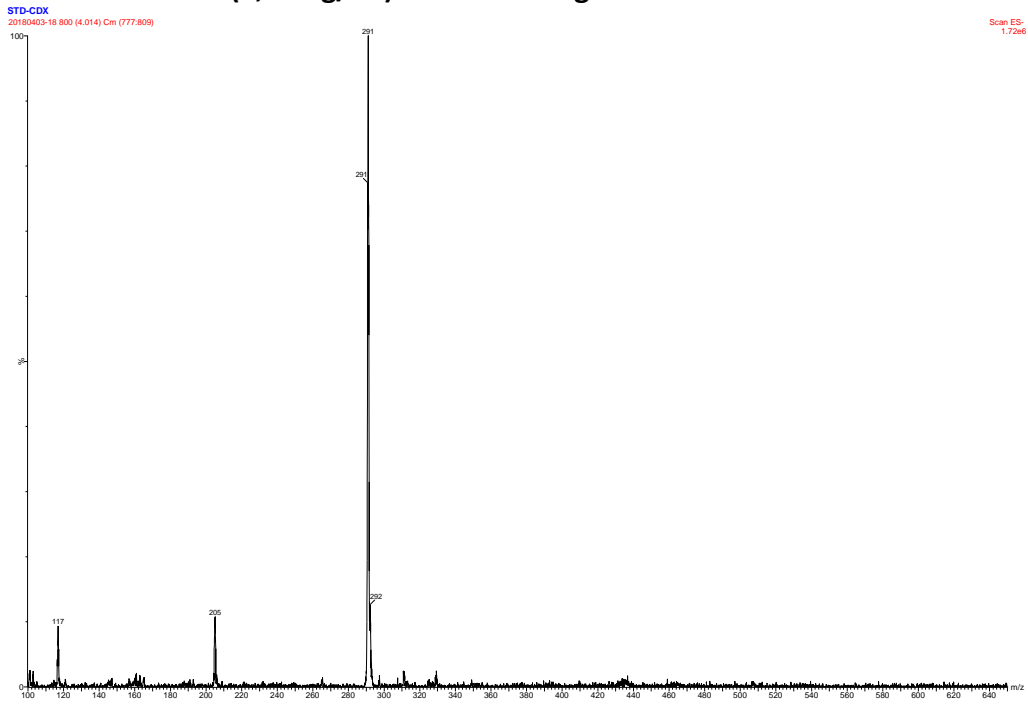


Hidroxiplutamida ($m/z = 291$ y $m/z = 205$)

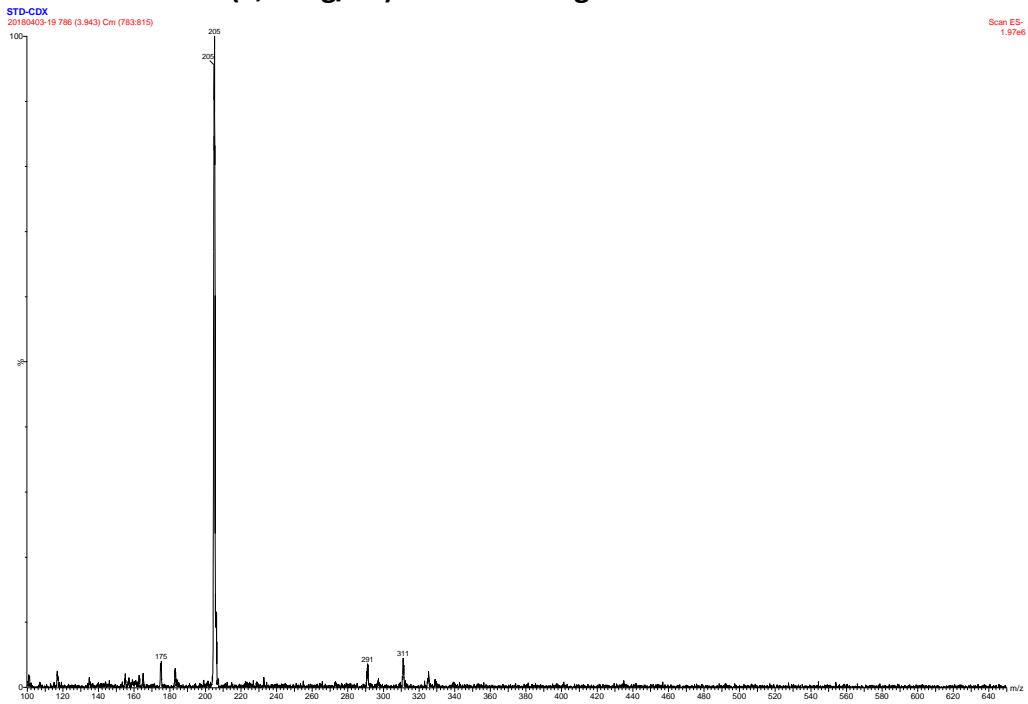
Espectro de masas obtenido de una solución de Hidroxiplutamida (0,05 ug/ml) con una energía de cono - 15 v



Espectro de masas obtenido de una solución de Hidroxiflutamida (0,05 ug/ml) con una energía de cono - 30 v

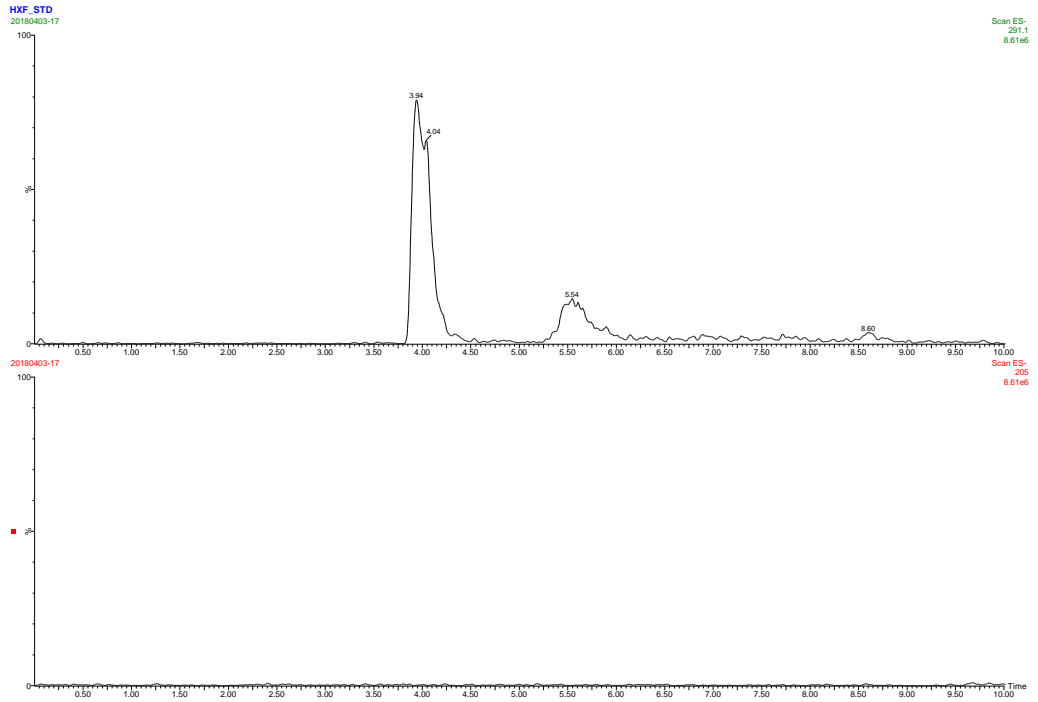


Espectro de masas obtenido de una solución de Hidroxiflutamida (0,05 ug/ml) con una energía de cono - 30 v

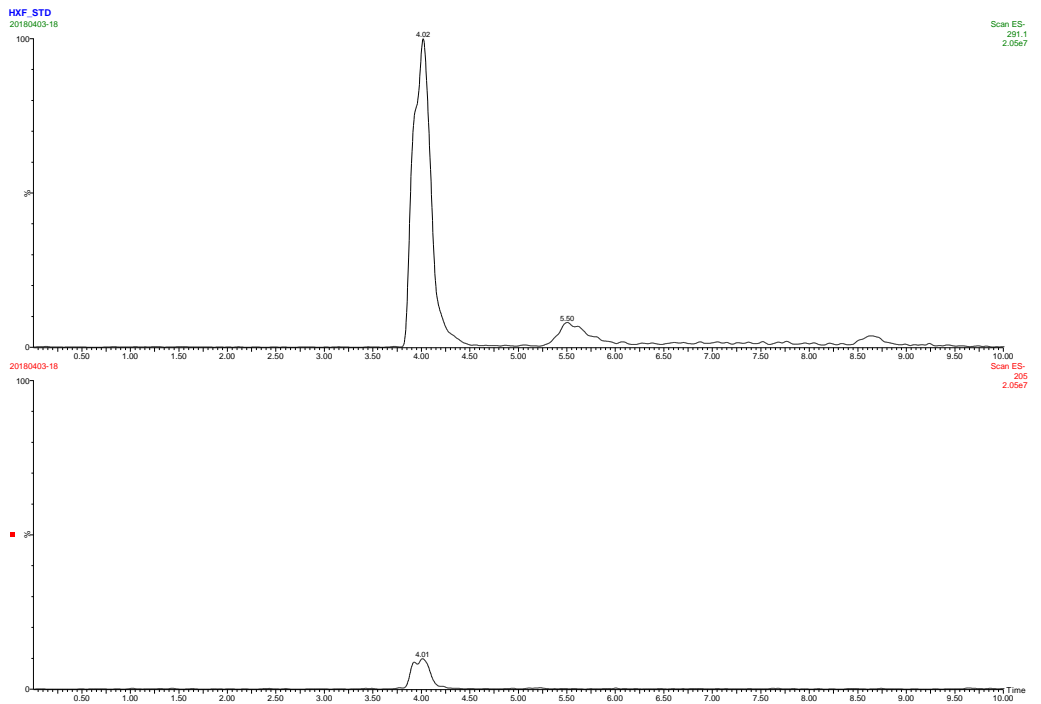


Otra forma de presentar los mismos datos es a través de los cromatogramas la energía de cono empleada:

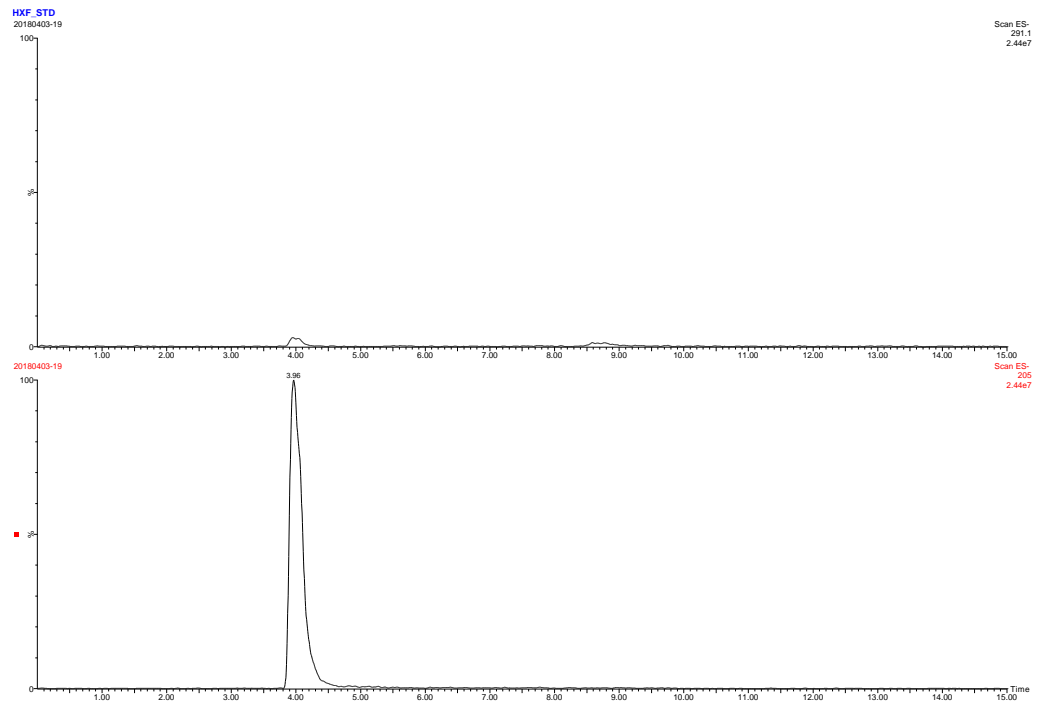
Energía de cono: - 15 v



Energía de cono: - 30 v



Energía de cono: - 60 v



Evaluando los datos cromatográficos, de espectrometría de masas y otros ensayos de infusión directa de las soluciones en el detector se concluyó que la mejor respuesta se obtiene con las energías de cono presentadas en la Tabla18 (pág. 105).

Anexo VIII

Evaluación del método

Las siguientes tablas muestran la señal (S) obtenida luego de añadir los analitos a *muestras blanco* (animales no tratados). Estos datos fueron usados para la construcción de las *curvas de calibración*.

Curvas de Calibración

Se utilizaron para el cálculo de la concentración de Bicalutamida y Andarina, empleando Hidroxiflutamida como ISTD.

Las curvas de calibración se construyeron cubriendo todo el rango de trabajo, pero dado que el rango fue muy amplio durante el trabajo se dividieron en curvas de calibración de concentraciones “bajas” “medias” o “altas” según fuera la concentración que se esperaba encontrar. Por este motivo, los niveles de concentración tienen diferentes cantidades de datos (S1; S2; S3; etc.).

Ensayos con Orina

Bicalutamida					
Conc. (ng/ml)	S1	S2	S3	S4	S5
0,25	0,181	0,159	0,152	0,178	0,107
0,5	0,341	0,312	0,313	0,307	0,289
1	0,691	0,585	0,574	0,629	0,622
3	1,954	2,007	1,718	1,754	1,623
5	3,318	3,189	3,134	3,363	3,645
10	6,755	6,068	6,186	6,331	7,897
20	13,515	13,543	11,899	11,660	13,244
30	17,519	18,410	18,459		
50	30,726	26,018	27,880		
100	56,158	48,922	49,338		
120	73,724	67,022	71,395		
150	85,006	72,998	77,441		
200	119,179	106,962	105,096		

Andarina					
Conc. (ng/ml)	S1	S2	S3	S4	S5
0,25	0,0697	0,0654	0,0619	0,0635	0,0672
0,5	0,1201	0,1245	0,1106	0,1143	0,0962
1	0,2652	0,2333	0,2070	0,2461	0,2244
3	0,7521	0,6504	0,6525	0,7164	0,6249
5	1,1807	1,0562	1,0925	1,1741	1,0743
10	2,3461	2,1699	2,0335	2,2069	2,3032
20	4,6167	4,5403	3,7836	4,0998	3,9200
30	6,4883	6,4516	6,452		
50	10,7944	10,4010	9,977		
100	20,9080	20,1136	18,171		
120	26,1530	22,3141	21,475		
150	32,0452	31,4926	30,084		
200	39,8037	36,3122	34,532		

Ensayos con Heces

Bicalutamida				
conc (ng/g)	S1	S2	S3	S4
1	0,425	0,484	0,469	0,380
2	0,861	0,777	0,792	0,849
5	2,088	2,363	2,009	1,961
10	4,083	4,427	4,735	3,871
15	6,115	6,087	6,483	5,337
20	8,392	9,799	9,484	7,974
50	20,592	23,001	20,060	
100	38,756	40,872	42,544	
150	59,950	70,665	58,626	
200	79,057	79,673	78,491	
300	120,845	128,518	113,353	
600	234,865	228,418	237,497	
1000	391,275	400,793	329,587	
1500	447,762	465,150	492,783	
2000	579,789	585,529	627,470	
2500	732,506	740,058	754,859	
3000	897,140	972,877	993,145	
3500	1004,574	1077,979	1201,122	

Andarina				
conc (ng/g)	S1	S2	S3	S4
1	0,185	0,193	0,165	0,178
2	0,368	0,394	0,368	0,376
5	0,909	1,017	0,912	0,896
10	1,706	1,753	1,853	1,468
15	2,573	2,915	2,538	2,379
20	3,768	3,808	3,437	3,173
50	8,392	9,375	9,041	
100	17,641	17,924	18,427	
150	23,896	28,028	27,872	
200	37,510	36,323	35,795	
300	48,713	58,020	50,854	
600	101,355	102,557	91,779	
1000	171,281	174,899	145,516	
1500	186,179	203,450	213,314	
2000	259,771	270,944	278,896	
2500	333,849	340,841	344,391	
3000	413,268	434,793	434,699	
3500	442,740	470,897	524,969	

Ensayos con Suero

conc (ng/ml)	Bicalutamida			Andarina		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3
1	0,247	0,239	0,235	0,0769	0,0800	0,0741
2	0,467	0,479	0,477	0,1394	0,1556	0,1481
5	1,192	1,262	1,157	0,3404	0,3432	0,3481
10	2,498	3,119	2,752	0,6839	0,7406	0,6649
15	3,636	4,107	3,803	1,0533	1,0836	1,0012
20	4,652	5,687	5,124	1,3051	1,3842	1,4038
50	9,431	8,663	8,582	3,0670	2,848	2,608
100	18,854	18,015	18,063	6,0707	6,052	5,494
150	28,580	26,642	26,634	9,1951	8,472	7,902
200	40,009	34,610	34,922	11,8530	10,152	9,467
300	58,209	49,865	49,413	16,8940	14,906	14,629
600	117,867	111,527	110,559	36,3668	33,846	29,781
1000	190,426	168,023	156,844	58,2987	54,834	47,741

Linealidad

La linealidad fue evaluada en términos de coeficiente de determinación (r^2) obtenido de curvas de calibración construidas. Los parámetros promedios se presentan en las siguientes tablas:

Bicalutamida			
	Orina	Heces	Suero
a	0,617	0,392	0,229
b	0,125	4,231	0,313
r²	0,9951 ± 0,0051	0,9941 ± 0,0057	0,9971 ± 0,002

Andarina			
	Orina	Heces	Suero
a	0,205	0,165	0,053
b	0,382	0,162	0,053
r²	0,9951 ± 0,0058	0,9955 ± 0,0054	0,9982 ± 0,0006

Exactitud

La exactitud se calculó como recuperación porcentual (R%). La R% cada método fue calculada para Bicalutamida y Andarina en el rango de concentraciones encontradas en las muestras analizadas:

Para este propósito se utilizaron como valores verdaderos (100%: conc_nominal) extractos de muestras blanco con adición de soluciones estándares y se aplicó la siguiente fórmula:

$$R\% = (C_{\text{calculada}} / C_{\text{nominal}}) \times 100$$

Ensayos con Orina

Bicalutamida						
conc (ng/ml)	x1	x2	x3	R1	R2	R3
0,5	0,47	0,48	0,42	93,2	96,4	84,4
1	1,13	1,11	1,00	112,5	110,6	99,9
5	5,09	4,74	4,61	101,9	94,8	92,1
10	10,32	11,03	9,77	103,2	110,3	97,7
50	45,58	48,16	43,43	91,2	96,3	86,9
100	106,83	112,76	99,90	106,8	112,8	99,9
200	184,18	206,06	201,88	92,1	103,0	100,9

Andarina						
conc (ng/ml)	x1	x2	x3	R1	R2	R3

0,5	0,42	0,49	0,42	84,0	97,3	84,9
1	1,08	1,04	0,97	108,1	104,4	97,0
5	4,54	4,03	4,11	90,8	80,6	82,2
10	9,27	8,62	8,13	92,7	86,2	81,3
50	53,06	49,70	51,47	106,1	99,4	102,9
100	106,17	98,34	101,14	106,2	98,3	101,1
200	185,07	210,30	195,67	92,5	105,2	97,8

Ensayos con heces

conc (ng/g)	Bicalutamida					
	x1	x2	x3	R1	R2	R3
2	1,89	2,02	1,79	94,3	101,2	89,6
5	4,74	4,99	4,28	94,7	99,8	85,5
10	10,11	10,82	10,31	101,1	108,2	103,1
50	51,89	53,73	47,76	103,8	107,5	95,5
100	105,08	102,93	101,15	105,1	102,9	101,1
1000	1028,47	1107,65	1021,46	102,8	110,8	102,1
2500	2620,69	2271,53	2521,14	104,8	90,9	100,8
3500	3692,47	3382,18	3258,06	105,5	96,6	93,1

conc (ng/g)	Andarina					
	x1	x2	x3	R1	R2	R3
2	1,64	1,63	1,76	81,8	81,4	88,2
5	5,00	5,34	5,08	100,1	106,8	101,6
10	9,93	10,60	10,12	99,3	106,0	101,2
50	50,72	45,79	53,21	101,4	91,6	106,4
100	103,46	102,80	98,04	103,5	102,8	98,0
1000	1054,79	990,02	936,36	105,5	99,0	93,6
2500	2505,63	2331,33	2265,96	100,2	93,3	90,6
3500	3671,07	2844,28	3447,62	104,9	81,3	98,5

Ensayos con Suero

Conc_N (ng/ml)	Bicalutamida					
	x1	x2	x3	R1	R2	R3
2	2,17	1,98	1,96	108,3	98,9	97,8
5	5,42	5,28	4,91	108,4	105,6	98,1
10	9,26	8,24	8,62	92,6	82,4	86,2
50	48,47	51,50	43,71	96,9	103,0	87,4
100	110,57	92,37	93,57	110,6	92,4	93,6
200	218,94	209,70	194,31	109,5	104,8	97,2
1000	1060,06	907,34	970,22	106,0	90,7	97,0

Conc_N (ng/ml)	Andarina					
	x1	x2	x3	R1	R2	R3
2	1,99	2,26	2,01	99,6	112,9	100,6
5	4,22	4,74	4,02	84,4	94,7	80,5
10	10,46	10,43	9,87	104,6	104,3	98,7
50	53,79	45,66	48,82	107,6	91,3	97,6
100	106,79	92,37	100,40	106,8	92,4	100,4
200	213,90	200,60	216,06	106,9	100,3	108,0
1000	1041,04	912,06	1013,40	104,1	91,2	101,3

En la siguiente tabla se resumen los rangos de R% y la variabilidad obtenida (RSD %):

	Orina		Heces		Suero	
	Bicalutamida	Andarina	Bicalutamida	Andarina	Bicalutamida	Andarina
R %	84,4 - 112,8	80,6 - 108,1	85,5 - 110,8	81,3 - 106,8	82,4 - 110,6	80,5 - 112,9
RSD %	5,2 - 6,8	3,3 - 8,3	1,9 - 7,7	2,9 - 12,9	5,1 - 10,3	3,2 - 8,5

Precisión

Se evaluó como el Coeficiente de Variación (Relative Standard Deviation porcentual, RSD%) calculado del análisis realizado por triplicado de muestras fortificadas a 0,25; 0,5; 1; 3 y 10 ng/ml para orina mientras que para suero y heces se trabajó a 1; 2; 5; 10 y 20 ppb (suero: ng/ml y para heces: ng/g). Las muestras fueron analizadas por 3 analistas (x1; x2; x3) en 3 días (D1; D2; D3) para calcular las variaciones intra-ensayo e inter ensayo.

Las siguientes tablas presentan los resultados de Conc_Nom. y Conc_Calc.:

Ensayos con Orina

Conc_N (ng/ml) 0,25			
Bicalutamida	D1	D2	D3
x1	0,26	0,24	0,24
x2	0,27	0,25	0,20
x3	0,25	0,23	0,25

Conc_N (ng/ml) 0,50			
Bicalutamida	D1	D2	D3
x1	0,49	0,48	0,50
x2	0,47	0,46	0,52
x3	0,48	0,51	0,53

Conc_N (ng/ml) 1,00			
Bicalutamida	D1	D2	D3
x1	0,95	0,96	0,98
x2	0,97	1,03	1,04
x3	0,95	0,98	1,01

Conc_N (ng/ml) 3,00			
Bicalutamida	D1	D2	D3
x1	2,93	3,03	2,97
x2	2,93	2,91	3,06
x3	2,71	2,94	3,26

Conc_N (ng/ml) 10,00			
Bicalutamida	D1	D2	D3
x1	9,81	9,92	10,33
x2	9,96	10,34	10,12
x3	9,73	9,76	10,26

Conc_N (ng/ml) 0,25			
Andarina	D1	D2	D3
x1	0,23	0,27	0,25
x2	0,24	0,24	0,26
x3	0,25	0,23	0,28

Conc_N (ng/ml) 0,50			
Andarina	D1	D2	D3
x1	0,45	0,52	0,54
x2	0,47	0,50	0,49
x3	0,51	0,49	0,52

Conc_N (ng/ml) 1,00			
Andarina	D1	D2	D3
x1	1,01	1,06	1,03
x2	0,95	0,98	0,98
x3	0,93	0,99	1,07

Conc_N (ng/ml) 3,00			
Andarina	D1	D2	D3
x1	3,16	3,03	2,96
x2	2,93	2,79	2,97
x3	3,18	3,01	2,87

Conc_N (ng/ml) 10,00			
Andarina	D1	D2	D3
x1	9,76	9,92	10,05
x2	9,54	9,96	10,47
x3	9,91	10,32	10,22

Ensayos con heces

<i>Conc_N (ng/ml)</i> 1,00			
<i>Bicalutamida</i>	<i>D1</i>	<i>D2</i>	<i>D3</i>
<i>x1</i>	0,89	1,12	1,01
<i>x2</i>	0,93	1,09	1,02
<i>x3</i>	1,11	1,05	0,99

<i>Conc_N (ng/ml)</i> 2,00			
<i>Bicalutamida</i>	<i>D1</i>	<i>D2</i>	<i>D3</i>
<i>x1</i>	1,98	2,02	1,96
<i>x2</i>	1,94	2,08	1,99
<i>x3</i>	1,86	1,97	2,16

<i>Conc_N (ng/ml)</i> 5,00			
<i>Bicalutamida</i>	<i>D1</i>	<i>D2</i>	<i>D3</i>
<i>x1</i>	4,72	5,06	5,20
<i>x2</i>	4,75	5,21	5,35
<i>x3</i>	5,17	5,27	5,15

<i>Conc_N (ng/ml)</i> 10,00			
<i>Bicalutamida</i>	<i>D1</i>	<i>D2</i>	<i>D3</i>
<i>x1</i>	10,05	9,50	10,13
<i>x2</i>	9,30	9,35	10,71
<i>x3</i>	9,34	10,65	10,62

<i>Conc_N (ng/ml)</i> 20,00			
<i>Bicalutamida</i>	<i>D1</i>	<i>D2</i>	<i>D3</i>
<i>x1</i>	20,20	19,72	21,20
<i>x2</i>	19,86	19,24	20,32
<i>x3</i>	19,13	20,67	20,65

<i>Conc_N (ng/ml)</i> 1,00			
<i>Andarina</i>	<i>D1</i>	<i>D2</i>	<i>D3</i>
<i>x1</i>	0,91	0,79	0,97
<i>x2</i>	0,83	0,86	0,97
<i>x3</i>	0,79	0,93	0,95

<i>Conc_N (ng/ml)</i> 2,00			
<i>Andarina</i>	<i>D1</i>	<i>D2</i>	<i>D3</i>
<i>x1</i>	1,79	1,89	2,02
<i>x2</i>	2,04	1,92	2,12
<i>x3</i>	1,88	1,96	2,14

<i>Conc_N (ng/ml)</i> 5,00			
<i>Andarina</i>	<i>D1</i>	<i>D2</i>	<i>D3</i>
<i>x1</i>	5,16	4,68	5,20
<i>x2</i>	4,94	5,15	5,26
<i>x3</i>	5,21	4,85	4,98

<i>Conc_N (ng/ml)</i> 10,00			
<i>Andarina</i>	<i>D1</i>	<i>D2</i>	<i>D3</i>
<i>x1</i>	9,50	9,71	10,10
<i>x2</i>	9,31	9,70	9,52
<i>x3</i>	9,61	9,89	10,42

<i>Conc_N (ng/ml)</i> 20,00			
<i>Andarina</i>	<i>D1</i>	<i>D2</i>	<i>D3</i>
<i>x1</i>	19,67	19,86	20,23
<i>x2</i>	20,01	19,65	20,82
<i>x3</i>	18,72	21,22	21,12

Ensayos con Suero

Conc_N (ng/ml) 1,00			
Bicalutamida	D1	D2	D3
x1	1,13	0,92	0,98
x2	1,04	0,93	0,98
x3	0,98	0,97	1,11

Conc_N (ng/ml) 2,00			
Bicalutamida	D1	D2	D3
x1	2,04	2,13	1,94
x2	2,03	2,09	1,98
x3	1,92	2,06	2,04

Conc_N (ng/ml) 5,00			
Bicalutamida	D1	D2	D3
x1	5,14	4,98	4,99
x2	4,63	5,25	5,16
x3	4,79	5,35	4,95

Conc_N (ng/ml) 10,00			
Bicalutamida	D1	D2	D3
x1	9,71	10,13	10,25
x2	10,36	10,52	10,77
x3	9,35	9,47	10,59

Conc_N (ng/ml) 20,00			
Bicalutamida	D1	D2	D3
x1	18,40	19,63	21,80
x2	19,64	20,02	19,28
x3	18,81	20,29	22,21

Conc_N (ng/ml) 1,00			
Andarina	D1	D2	D3
x1	1,06	0,94	0,96
x2	1,05	0,92	0,98
x3	1,05	0,94	1,12

Conc_N (ng/ml) 2,00			
Andarina	D1	D2	D3
x1	2,02	2,13	2,17
x2	1,86	2,06	2,03
x3	1,98	2,04	2,12

Conc_N (ng/ml) 5,00			
Andarina	D1	D2	D3
x1	4,97	5,14	5,15
x2	5,21	4,35	5,35
x3	5,33	4,56	4,80

Conc_N (ng/ml) 10,00			
Andarina	D1	D2	D3
x1	9,32	9,94	10,71
x2	9,67	10,53	10,59
x3	10,41	10,68	10,69

Conc_N (ng/ml) 20,00			
Andarina	D1	D2	D3
x1	18,22	20,69	21,21
x2	19,62	21,40	19,47
x3	20,63	20,64	19,69

Las siguientes tablas presentan los resultados de las variaciones (RSD%) intra e inter ensayos:

Bicalutamida en Orina		
Conc (ng/ml)	Intra-Ensayo	Inter-ensayo
0,25	6,86	9,22
0,5	3,31	6,77
1	2,74	4,78
3	4,00	6,99
10	1,95	3,50
Andarina en Orina		
Conc (ng/ml)	Intra-Ensayo	Inter-ensayo
0,25	6,36	9,46
0,5	4,91	6,18
1	4,34	5,74
3	3,84	5,06
10	2,06	4,47

Bicalutamida en Heces		
Conc (ng/ml)	Intra-Ensayo	Inter-ensayo
1	6,94	9,57
2	3,91	5,19
5	3,33	6,46
10	5,13	8,25
20	2,91	4,62
Andarina en Heces		
Conc (ng/ml)	Intra-Ensayo	Inter-ensayo
1	6,06	13,05
2	4,26	9,12
5	3,61	4,66
10	2,92	4,79
20	3,37	5,45

Bicalutamida en Suero		
Conc (ng/ml)	Intra-Ensayo	Inter-ensayo
1	6,48	10,06
2	2,55	5,07
5	3,94	5,84
10	4,46	6,38
20	5,02	9,29
Andarina en Suero		
Conc (ng/ml)	Intra-Ensayo	Inter-ensayo
1	5,26	10,69
2	3,35	6,89
5	6,12	9,13
10	3,84	7,42
20	4,56	6,11

Anexo IX

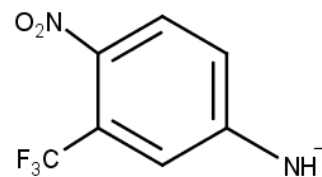
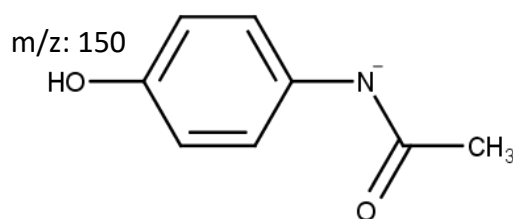
Fragmentos característicos de Andarina

En la introducción de este trabajo se mencionó que Andarina es una sustancia ampliamente estudiada. Esto podría deberse a que ha demostrado efecto anabolizante; reporte de casos de abuso en deporte humano y animal; además de las consideraciones farmacológicas ya mencionadas compartidas por los SARMs derivados de APA (administración oral, vida media prolongada, etc.).

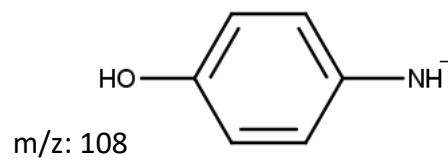
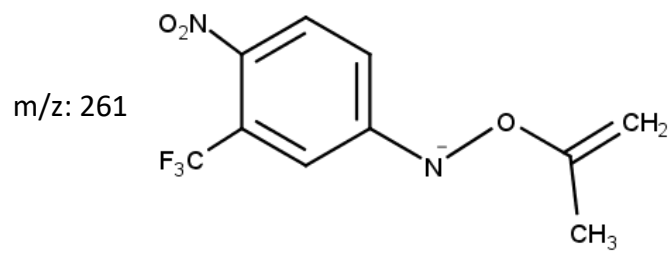
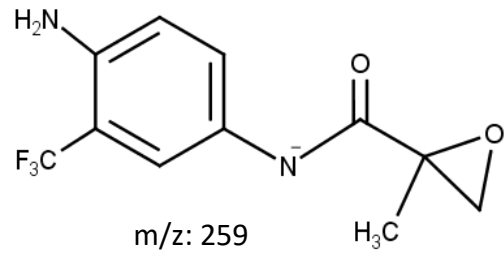
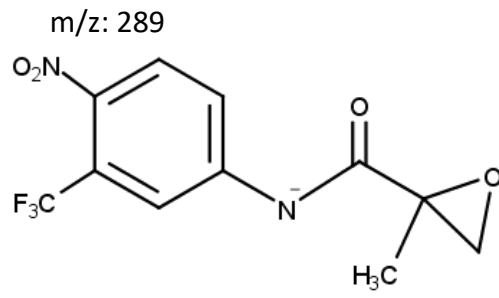
En la bibliografía se presentan estudios metabólicos, farmacocinéticos y farmacodinámicos; algunos son *in vitro* empleando microorganismos y otros utilizan fracciones enzimáticas de animales incluyendo mamíferos para simular la generación de metabolitos. Según la bibliografía hay estudios que *in vivo* con animales de laboratorio y el hombre [47, 49, 56, 71, 84].

En esta etapa del trabajo se consultaron estos estudios con el objetivo de establecer los fragmentos característicos utilizados para la identificación de metabolitos provenientes de Andarina.

Las siguientes estructuras representan los iones característicos utilizados, con su correspondiente relación masa/carga (m/z):



$m/z: 205$



Anexo X

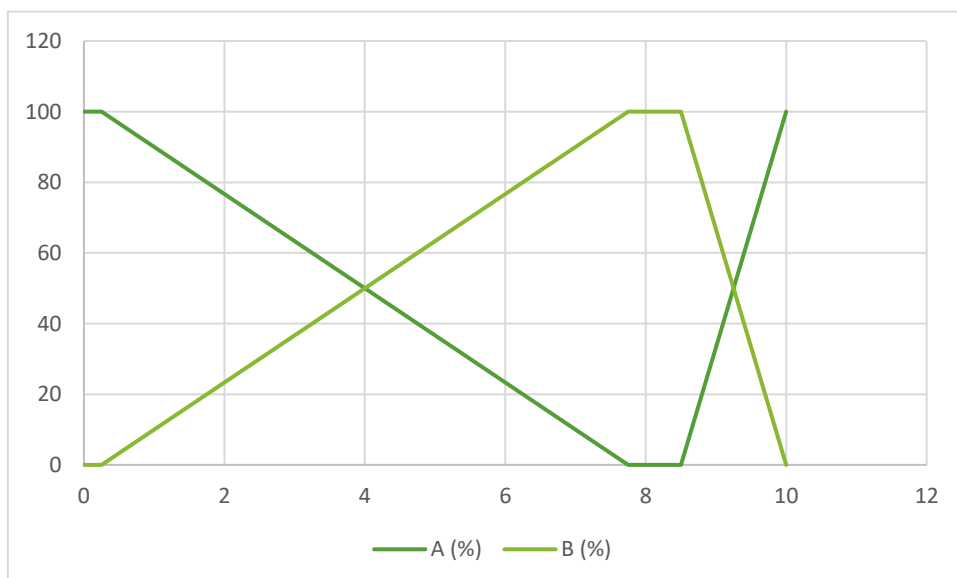
Estudio de Metabolitos (2do ensayo con animales)

Sistema Cromatográfico

A continuación, se detalla el sistema empleado para el estudio de los metabolitos:

- Columna ACQUITY UPLC BEH C18 (1,7 μm ; 2,1 x 100 mm)
- Volumen de Inyección: 2 μl
- Fase Móvil:
 - %A: Ácido Fórmico 0,1% + Acetonitrilo 10 %
 - %B: Acetonitrilo
- Flujo: 0,45mL/min

T(min)	A (%)	B (%)
0	100	0
0,25	100	0
7,75	0	100
8,5	0	100
10	100	0



Concentraciones de SARMs

Bovino N° 443-Casodex 100 mg					
	Bicalutamida libre	Bicalutamida Total	Bicalutamida libre	Bicalutamida Total	Bicalutamida
Día	Orina (ng/ml)	Orina (ng/ml)	Heces (ng/g)	Heces (ng/g)	Suero (ng/ml)
-1	ND	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND	ND
0,17	1,30	1,50	8,38	26,52	259,18
0,33	10,66	8,27	327,74	376,06	392,20
1	12,67	14,76	1830,85	2050,67	384,64
2	8,06	11,47	671,80	1387,17	340,22
3	6,32	8,93	248,89	471,09	330,94
4	3,36	2,47	132,17	131,07	262,67
5	1,83	1,90	52,22	61,26	231,77
7	0,67	1,65	28,61	27,30	232,63
9	0,70	0,87	3,04	8,84	116,66
11	0,81	0,68	2,25	2,60	71,12

Bovino N° 421-Casodex 200 mg					
	Bicalutamida libre	Bicalutamida Total	Bicalutamida libre	Bicalutamida Total	Bicalutamida
Día	Orina (ng/ml)	Orina (ng/ml)	Heces (ng/g)	Heces (ng/g)	Suero (ng/ml)
-1	ND	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND	ND
0,17	2,52	2,54	9,48	22,68	284,95
0,33	4,80	5,85	2236,76	2394,51	762,94
1	17,74	24,48	1917,96	2244,41	757,13
2	9,79	16,49	466,39	528,35	748,95
3	7,05	7,66	232,63	299,16	623,15
4	5,77	8,59	181,44	224,11	455,21
5	2,38	3,94	129,09	160,48	442,18
7	1,35	2,16	61,44	59,45	325,53
9	0,64	1,01	43,75	37,10	189,87
11	0,63	0,72	11,07	11,48	126,68

Bovino N° 379-Casodex 50 mg x 5 días					
	Bicalutamida libre	Bicalutamida Total	Bicalutamida libre	Bicalutamida Total	Bicalutamida
Día	Orina (ng/ml)	Orina (ng/ml)	Heces (ng/g)	Heces (ng/g)	Suero(ng/ml)
-1	ND	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND	ND
0,17	1,13	0,82	14,98	13,67	143,48
0,33	2,13	1,31	856,68	947,68	327,42
1	10,59	12,05	770,52	1177,22	335,17
2	9,61	12,85	1142,03	1459,46	582,29
3	17,87	15,02	1703,29	1992,08	723,10
4	20,29	25,81	2362,77	2880,20	898,79
5	23,48	28,13	1820,46	1877,54	1081,86
7	16,43	13,04	1040,22	901,32	871,36
9	13,03	17,41	507,59	838,75	804,78
11	5,34	4,92	187,09	267,62	683,23

Porcino N° 334 - Casodex 100 mg					
	Bicalutamida libre	Bicalutamida Total	Bicalutamida libre	Bicalutamida Total	Bicalutamida
Día	Orina (ng/ml)	Orina (ng/ml)	Heces (ng/g)	Heces (ng/g)	Suero (ng/ml)
-1	ND	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND	ND
0,17	40,04	37,52	13,91	14,06	448,16
0,33	77,17	84,24	115,33	174,92	691,99
1	86,16	82,57	1035,64	1387,37	873,21
2	69,09	78,29	409,10	533,86	812,59
3	64,84	67,87	329,85	320,95	806,49
4	22,80	34,25	313,34	342,09	724,56
5	16,64	27,34	137,07	144,66	583,04
6	10,45	11,84	111,10	123,32	344,19
8	7,54	6,21	49,51	57,99	282,05
10	2,73	3,16	29,85	35,57	81,34

Porcino N° 330-Andarina 100 mg					
	Andarina libre	Andarina Total	Andarina libre	Andarina Total	Andarina
Día	Orina (ng/ml)	Orina (ng/ml)	Heces (ng/g)	Heces (ng/g)	Suero (ng/ml)
-1	ND	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND	ND
0,17	17,26	21,51	563,65	602,26	478,13
0,33	43,36	46,81	1598,24	1612,92	392,75
1	18,35	21,47	1512,96	1595,68	153,86
2	3,86	5,91	189,14	228,15	18,03
3	ND	ND	ND	4,60	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND	ND	ND

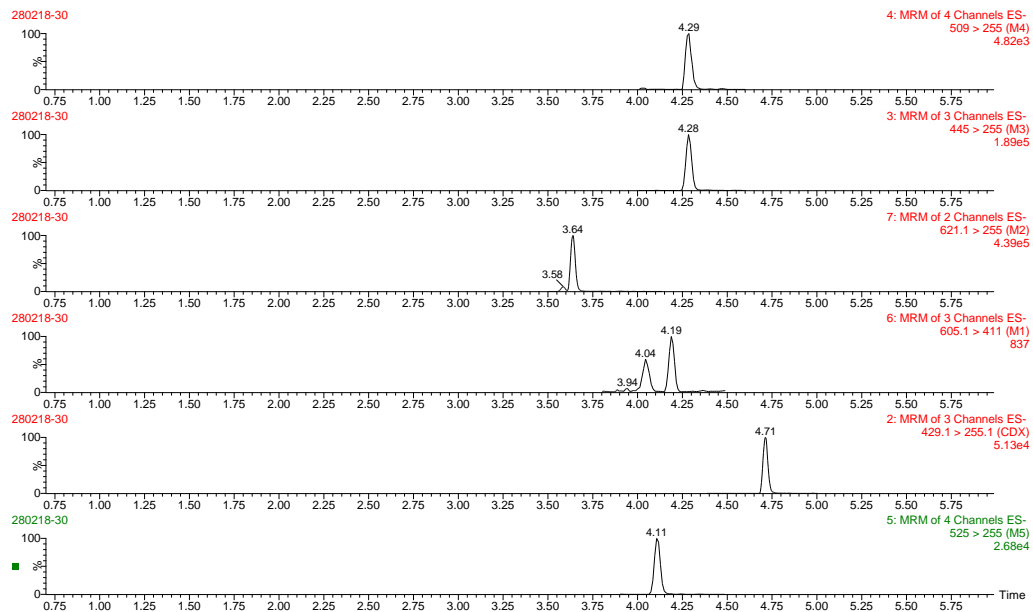
Metabolitos de Bicalutamida

Bovinos

En el segundo ensayo con animales se administró Casodex[®] a bovinos y al igual que durante el primer ensayo con bovinos, se encontraron los mismos metabolitos: M1, M2, M3, M4 y M5.

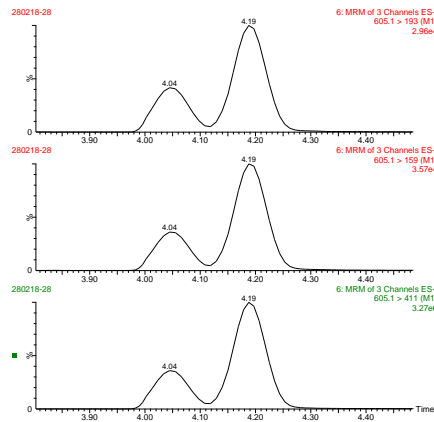
Los iones (m/z) se detallaron en la Tabla 19 y la Figura 33 presenta un cromatograma compuesto construido con algunos SRM utilizados para la identificación. A modo de ejemplo, a continuación, se presentan otras figuras de los SRM empleados de otros animales.

La figura siguiente muestra la ubicación de cada metabolito. Se puede ver que el primero en salir es M2; que M3 y M4 tienen el mismo tiempo de retención; se ve como M5 sale entre ambos picos correspondientes a M1.

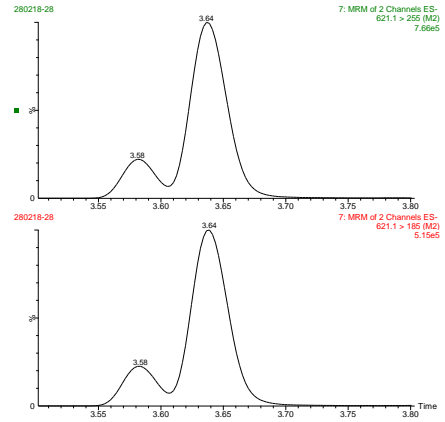


Las siguientes figuras muestran los SRM empleados para la confirmación de metabolitos:

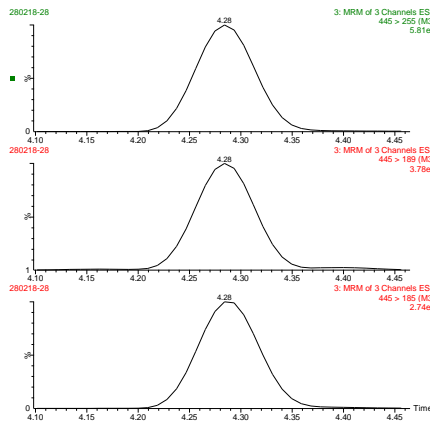
M1:



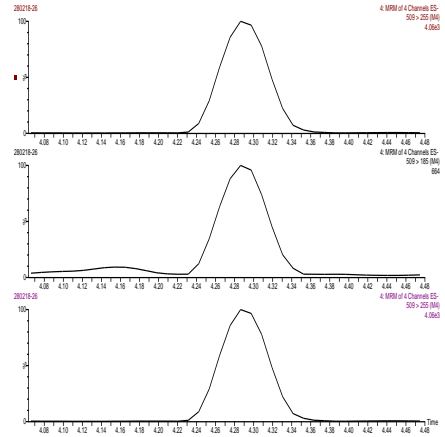
M2:



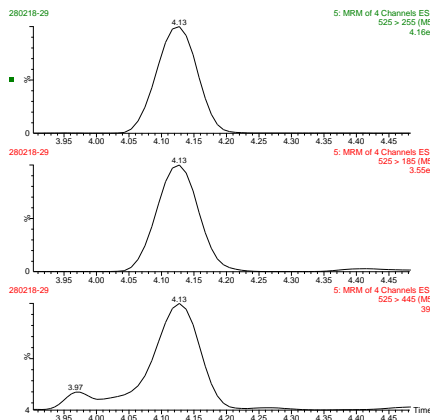
M3:



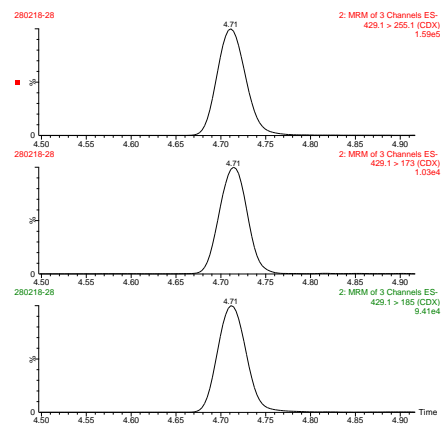
M4:



M5:

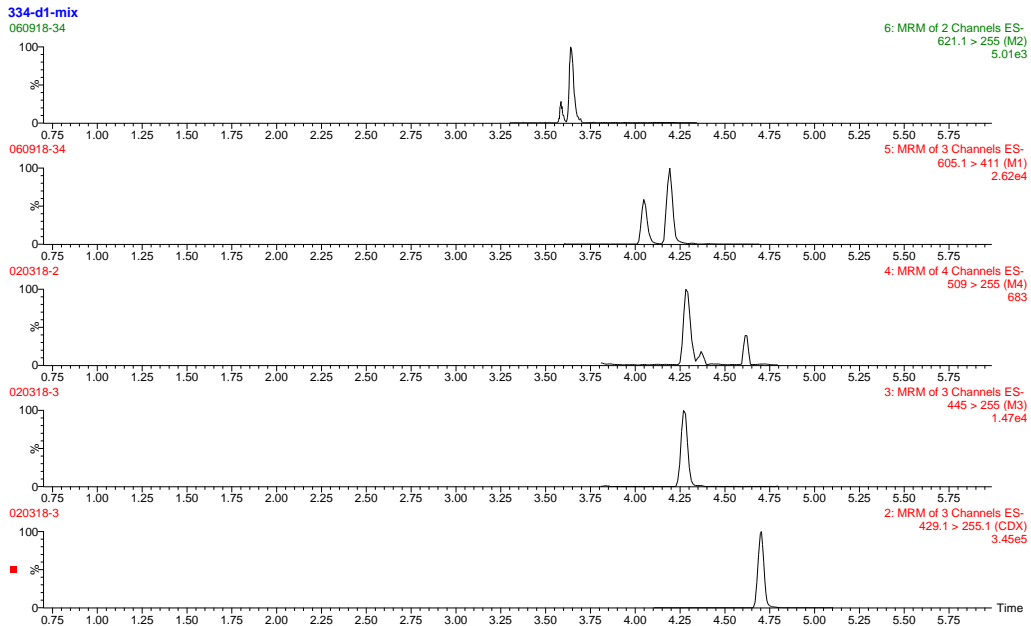


Bicalutamida



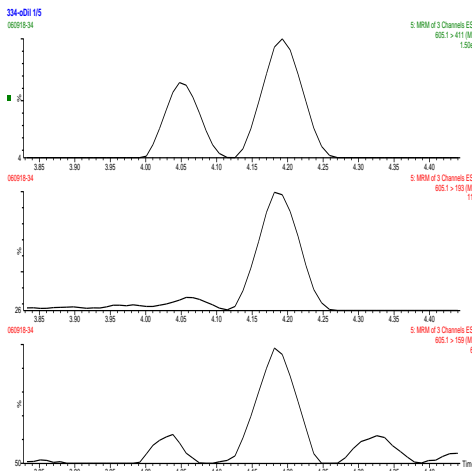
Porcino

Luego de la administración de Casodex® al porcino y el análisis de materia fecal y orina se encontraron los metabolitos M1, M2, M3 y M4 junto con la presencia de Bicalutamida. La siguiente figura muestra los SRM utilizados y los tiempos de retención de cada metabolito encontrado.

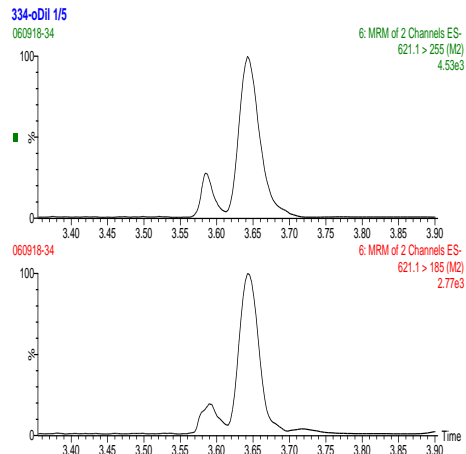


Las siguientes figuras muestran los SRM empleados para la confirmación de metabolitos en el porcino tratado:

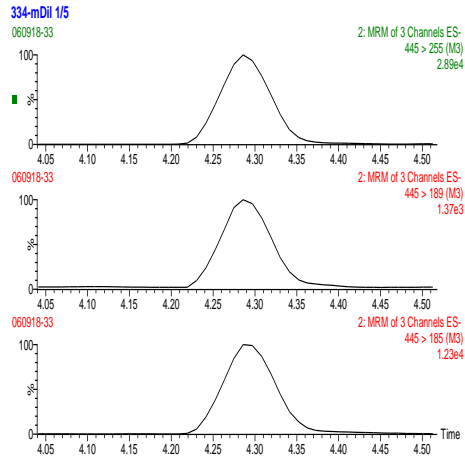
M1:



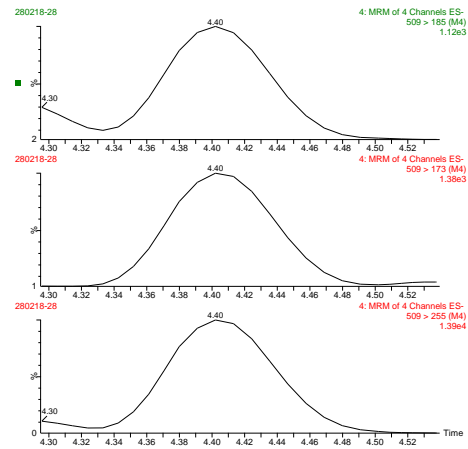
M2:



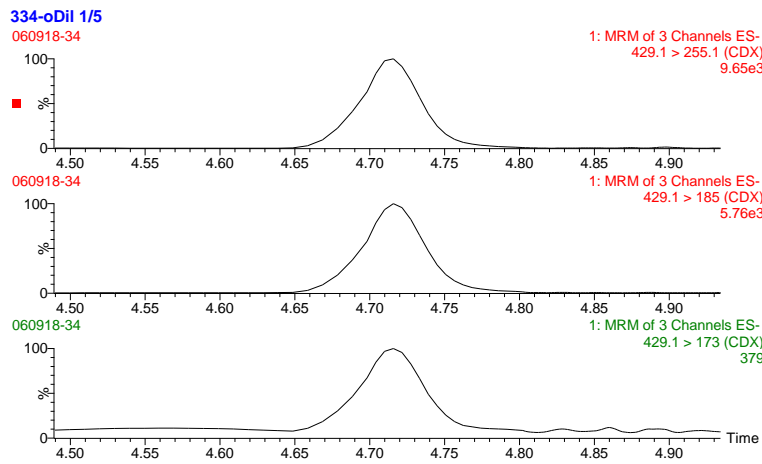
M3:



M4:

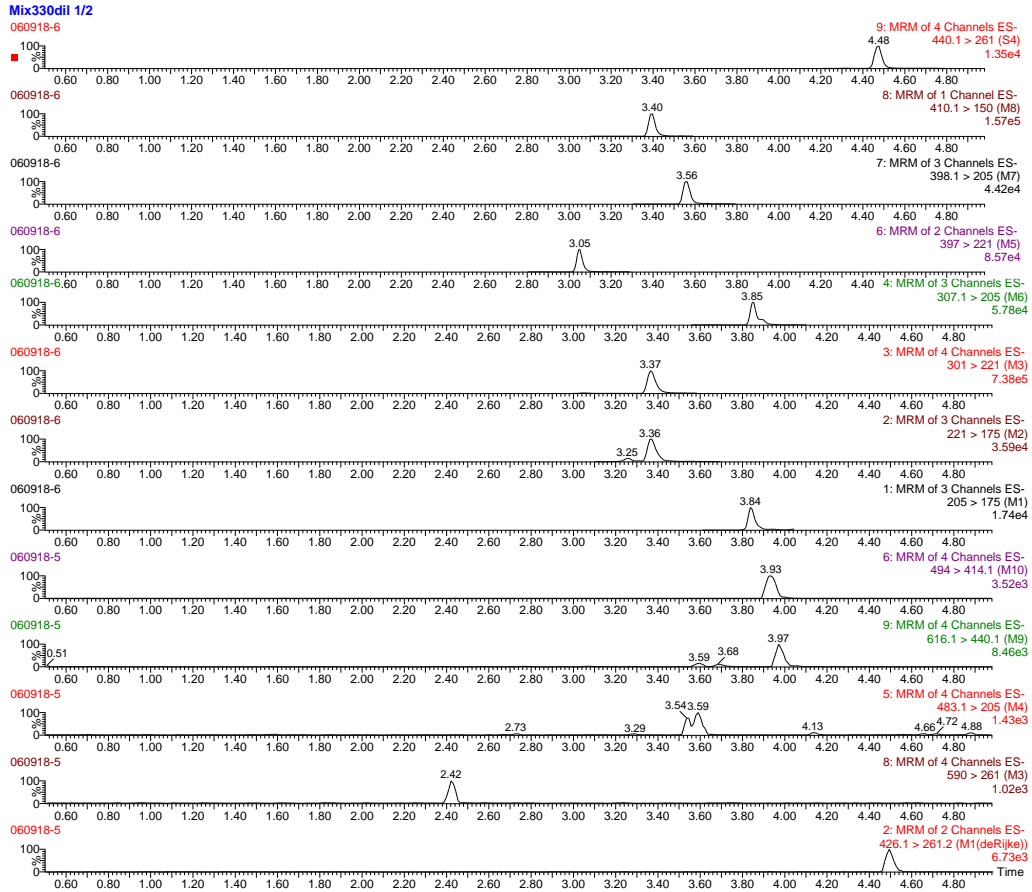


Bicalutamida

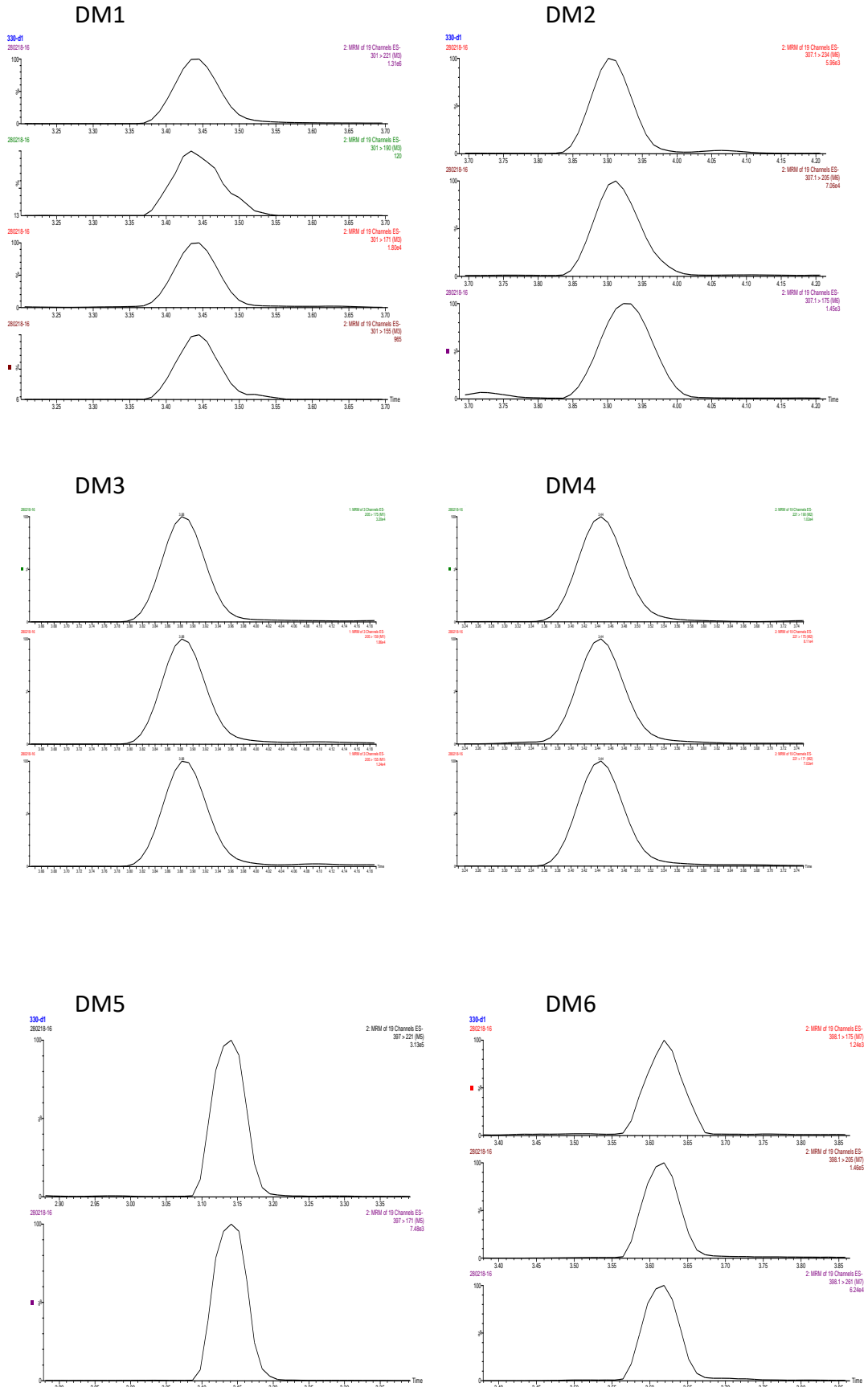


Metabolitos de Andarina en porcino

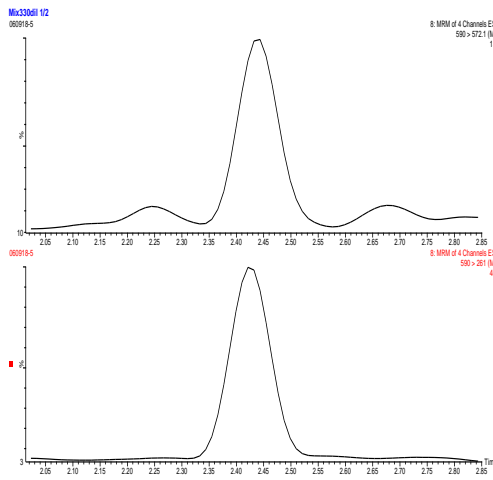
Luego de estudiar orinas y heces del porcino tratado con Andarina se identificaron 12 metabolitos. La siguiente figura muestra los SRM con mejor señal que se utilizaron para determinar los tiempos de retención y finalmente establecer el perfil de eliminación.



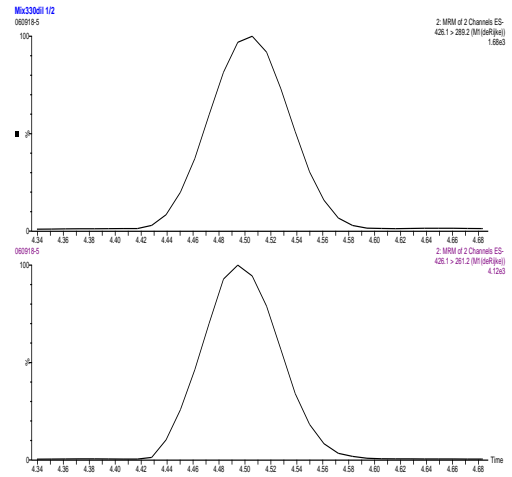
A continuación, se presentan los SRM empleados para la identificación de metabolitos en muestras:



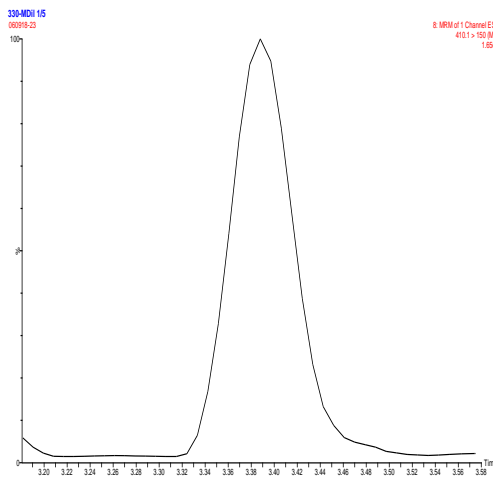
DM7



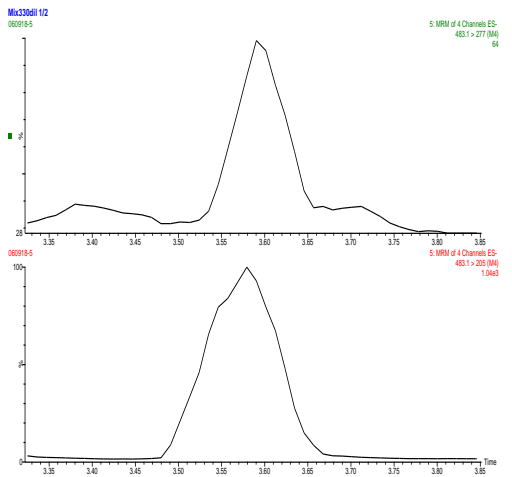
DM8



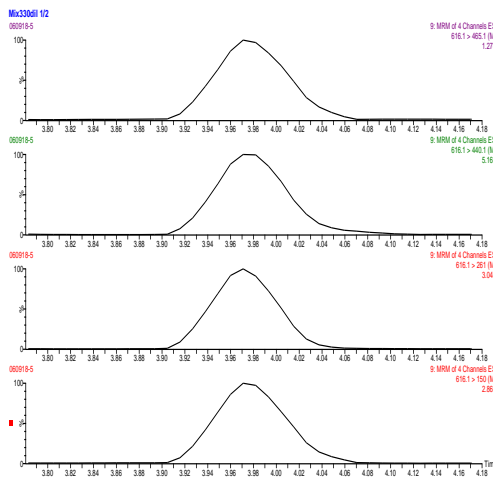
DM9



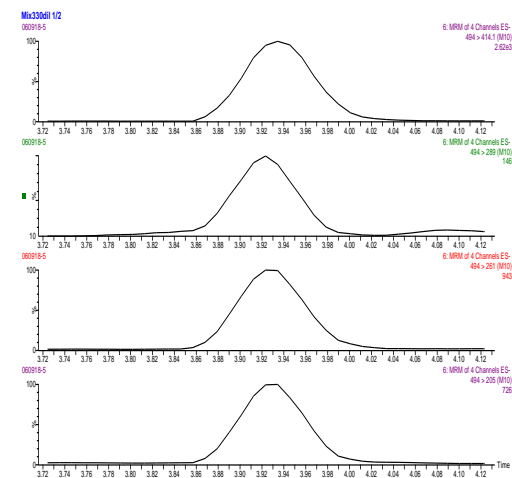
DM10



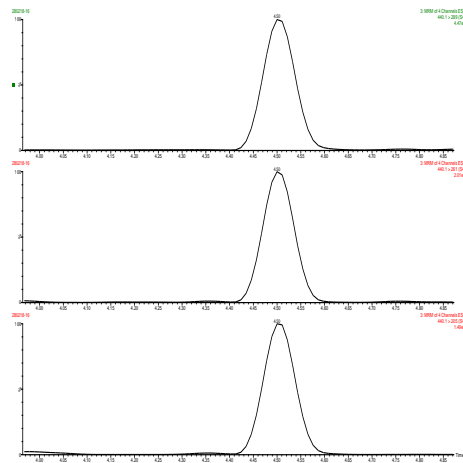
DM11



DM12



Andarina



Anexo XI

Cálculo de parámetros séricos

Una vez obtenidas las concentraciones sérica de los SARMs para cada animal se graficaron las *curvas de concentración sérica en función del tiempo* correspondientes (Figura 28, pág. 108 y Figura 29, pág. 110). El cálculo de los parámetros séricos se realizó a través de un análisis matemático sencillo como se describe a continuación:

Concentración máxima (C_{max}) y Tiempo máximo (T_{max}): se obtuvieron de la curva de concentración sérica correspondiente a cada animal.

Constante de eliminación (λ_z): se estimó como la pendiente de la regresión lineal de la concentración transformada a logaritmo en base 10 en función del tiempo considerando los puntos que se muestran en los gráficos correspondientes (*ver más adelante*).

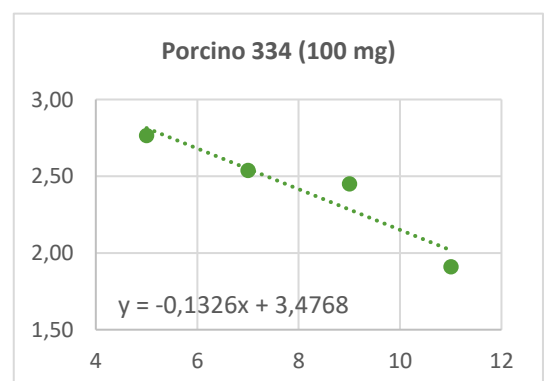
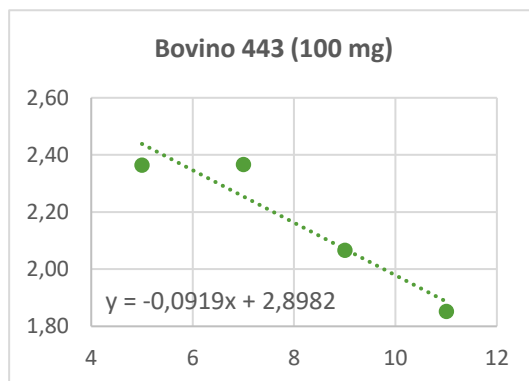
Vida media de eliminación ($T_{1/2}$) se calculó con la siguiente fórmula:

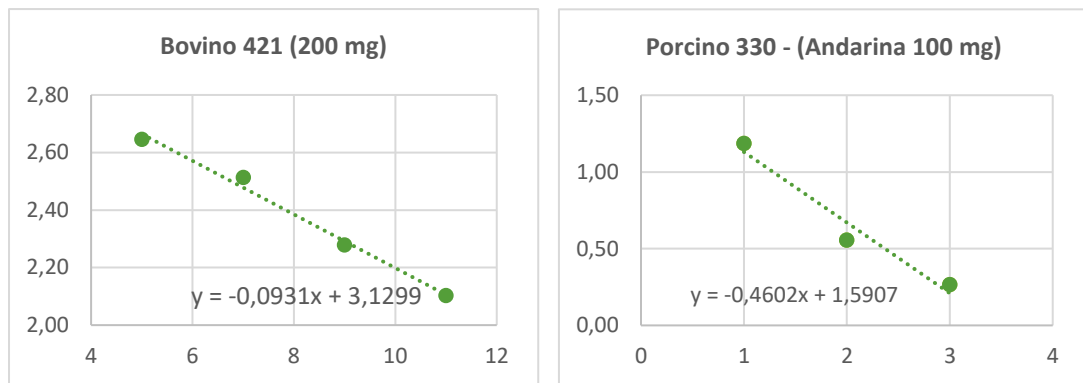
$$T_{1/2} = \frac{\text{Ln}2}{\lambda_z}$$

Área bajo la curva final (ABC_{final}): se calculó por regla trapezoidal lineal, desde el día 0 hasta última concentración cuantificada (utilizando el Software Geogebra Versión 6-0-462-0).

Dado que solo se estudió administración oral de las drogas no se presentarán datos de *Clearance (CL)* ni *Volumen de distribución (V_d)*.

- Gráficos $\log C = f(\text{días})$





Los parámetros fueron calculados para los animales tratados con una única dosis y se presentan en la siguiente tabla:

	Bovino 443 (CDX 100 mg)	Bovino 421 (CDX 200 mg)	Porcino 334 (CDX 100 mg)	Porcino 330 (AND 100 mg)
C_{max} (ng/ml)	392,2	762,9	873,2	47,8
T_{max} (h)	24	24	24	4
λ_z (días ⁻¹)	0,092	0,093	0,616	1,12
$T_{1/2}$ (días)	7,5	7,5	4,0	0,6
ABC_{final} (ng/dL/ml)	2577,89	4643,90	5642,27	40,66

Los resultados obtenidos en la fase de absorción (C_{max} y T_{max}) muestran la absorción de las drogas en los animales tratados.

En el porcino, la comparación en la fase de eliminación ($T_{1/2}$ y λ_z), muestra una mayor eliminación para Andarina que para Bicalutamida.

Estos resultados son consistentes con las concentraciones halladas en orina, heces y suero para ambas drogas correspondientes a la eliminación establecida en este trabajo y las observadas por otros autores [16, 30, 31, 71, 84].

Los datos crudos de concentración sérica determinada para Bicalutamida y Andarina se encuentran a continuación.

Perfil de eliminación de metabolitos

La ausencia de patrones comerciales de los metabolitos de Bicalutamida y Andarina impide cuantificarlos. Por este motivo y para evaluar el perfil de eliminación de cada metabolito junto con la ventana temporal de cada uno de ellos, se calculó la *respuesta relativa* a la máxima respuesta correspondiente a cada metabolito. En las Figura 48 y Figura 49 (pág. 128) se puede ver la variación de la respuesta relativa en el tiempo. En las siguientes tablas se detallan los resultados obtenidos en las excretas según el tratamiento aplicado.

Bicalutamida

	Bovino - 100mg-CDX				Montbeliar	
Orina	Respuesta Relativa					
Día	Bicalutamida	M1	M2	M3	M4	M5
-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0,17	207,6	457,2	351,6	330,2	0,0	430,3
0,34	394,5	645,3	483,4	336,6	11,0	552,6
1	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0	6,8	1000,0
2	767,6	546,7	516,9	937,5	0,3	558,9
3	493,0	691,6	404,9	165,2	1000,0	309,9
4	126,7	168,6	105,7	98,3	56,0	33,8
5	162,7	222,5	169,6	94,1	10,2	35,3
6	67,6	100,0	64,6	34,6	34,1	14,6
7	50,5	69,5	46,4	6,6	131,2	8,8

Heces	Respuesta Relativa					
Día	Bicalutamida	M1	M2	M3	M4	M5
-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0,17	75,6	928,5	0,0	0,7	0,0	66,1
1	1000,0	159,5	1000,0	1000,0	857,3	1000,0
2	651,0	53,1	211,3	495,3	887,4	667,9
3	398,1	121,8	307,7	268,8	1000,0	542,0
4	192,3	133,8	78,5	72,4	349,1	125,9
5	97,1	71,3	0,0	40,1	169,7	56,4
6	52,9	52,8	0,0	13,0	64,9	18,9
7	25,5	74,8	0,0	42,6	0,0	21,1

	Bovino - 100mg-CDX			Angus		
Orina	Respuesta Relativa					
Día	Bicalutamida	M1	M2	M3	M4	M5
-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0,17	101,46	209,93	99,58	237,93	ND	166,65
0,34	559,92	262,68	253,42	374,69	177,47	548,32
1	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00
2	777,24	120,85	353,26	820,11	438,42	337,42
3	605,06	217,15	175,08	81,37	202,41	175,80
4	167,50	83,30	27,02	64,73	129,11	37,25
5	128,60	22,01	ND	53,89	ND	68,57
7	44,10	ND	ND	ND	ND	ND
9	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Heces	Respuesta Relativa					
Día	Bicalutamida	M1	M2	M3	M4	M5
-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0,17	12,93	83,13	ND	7,80	ND	40,31
0,34	183,39	615,96	17,01	52,48	164,74	110,06
1	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00
2	822,74	291,77	48,01	402,70	169,53	126,69
3	229,73	249,38	10,93	74,93	122,42	160,16
4	112,68	182,04	26,69	17,64	20,53	48,33
5	49,38	17,46	ND	17,67	42,58	82,96
7	32,82	ND	ND	ND	ND	ND
9	9,19	ND	ND	ND	ND	ND
11	3,22	ND	ND	ND	ND	ND

Orina	Bovinos - 200mg-CDX			Angus		
	Respuesta Relativa					
Día	Bicalutamida	M1	M2	M3	M4	M5
-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0,17	103,85	82,14	219,50	56,73	ND	37,22
0,34	238,90	262,56	611,84	131,75	244,97	187,41
1	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00
2	673,39	428,66	709,83	527,05	181,19	662,80
3	312,91	124,24	589,53	90,14	191,10	238,27
4	350,79	56,50	99,29	134,86	132,56	43,38
5	160,82	34,26	59,93	39,03	66,86	ND
7	88,21	ND	40,22	ND	ND	ND
9	41,18	ND	ND	ND	ND	ND
11	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Heces	Respuesta Relativa						
	Día	Bicalutamida	M1	M2	M3	M4	M5
-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0,17	7,33	35,83	1,33	ND	2,28	79,20	
0,34	1000,00	924,54	3,69	1000,00	10,28	158,93	
1	499,08	1000,00	1000,00	851,43	1000,00	985,93	
2	170,74	81,08	15,24	358,40	24,42	1000,00	
3	96,67	86,75	7,58	186,53	8,46	173,43	
4	72,42	26,62	4,71	140,21	8,05	84,18	
5	51,86	50,91	2,98	86,17	7,71	ND	
7	19,21	7,88	4,16	125,55	0,84	ND	
9	11,99	ND	ND	0,32	0,65	ND	
11	3,71	ND	ND	ND	ND	ND	

Orina	Bovinos - 50mg CDX x5			Angus		
	Respuesta Relativa					
Día	Bicalutamida	M1	M2	M3	M4	M5
-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0,17	29,00	23,43	3,98	55,52	25,09	57,11
0,34	46,64	31,56	25,81	181,13	37,83	118,13
1	72,91	538,78	627,30	673,13	428,41	503,37
2	456,74	425,30	661,09	541,85	644,44	706,01
3	534,09	774,76	828,79	711,02	585,89	546,67
4	917,72	874,89	948,97	792,27	909,38	620,91
5	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	801,61	1000,00
7	463,52	460,15	699,27	281,33	1000,00	378,21
9	405,62	369,69	780,08	321,55	752,72	358,75
11	174,86	312,16	75,76	214,75	445,52	213,56

Heces	Respuesta Relativa					
	Día	Bicalutamida	M1	M2	M3	M4
-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0,17	5,30	143,84	69,78	5,42	15,77	73,71
0,34	367,29	130,00	111,78	31,71	26,82	78,61
1	301,23	529,30	189,18	291,46	159,39	521,53
2	488,13	770,04	875,50	485,08	507,81	720,26
3	640,29	760,74	865,43	521,56	839,19	667,64
4	1000,00	815,11	959,03	825,06	988,83	950,19
5	727,67	1000,00	792,83	1000,00	1000,00	1000,00
7	349,32	846,88	1000,00	584,60	769,50	664,65
9	325,07	770,04	816,69	789,59	881,85	369,49
11	103,72	332,83	774,59	328,32	680,56	463,99

Porcino - 100mg-CDX					
Orina	Respuesta Relativa				
Día	Bicalutamida	M1	M2	M3	M4
-3	ND	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND	ND
0,17	62,94	160,25	79,17	61,15	543,52
0,33	147,83	217,45	150,33	129,03	551,28
1	1000,00	1000,00	1000,00	499,30	1000,00
2	185,81	520,22	663,24	1000,00	461,17
3	604,68	235,28	288,77	128,81	562,60
4	84,90	422,11	160,87	303,05	429,81
5	9,94	119,02	142,15	45,90	241,31
6	14,85	58,46	ND	ND	111,64
8	ND	ND	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND	ND	ND

Heces	Respuesta Relativa				
Día	Bicalutamida	M1	M2	M3	M4
-3	ND	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND	ND
0,17	241,00	225,65	17,23	17,89	60,10
0,33	765,38	398,69	37,40	300,03	81,17
1	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00
2	837,08	810,23	321,89	655,72	657,01
3	390,21	888,89	261,18	247,88	347,61
4	197,40	494,56	289,41	81,53	351,68
5	100,17	189,40	193,30	47,00	75,96
6	62,91	299,31	25,80	ND	ND
8	39,33	ND	44,08	ND	ND
10	16,44	ND	ND	ND	ND

Andarina

Porcino - 100mg-AND													
Orina	Respuesta Relativa												
Día	AND	DM1	DM2	DM3	DM4	DM5	DM6	DM7	DM8	DM9	DM10	DM11	DM12
-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0,17	190,43	683,26	113,56	73,33	945,29	345,54	300,37	341,00	108,34	96,65	100,17	134,68	384,99
0,33	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	955,74	907,05	648,95	1000,00	1000,00
1	202,53	518,35	372,55	53,62	464,19	122,87	169,76	520,21	1000,00	1000,00	1000,00	94,28	74,09
2	113,39	43,22	14,14	37,31	ND	42,15	25,12	ND	ND	138,86	48,18	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Heces	Respuesta Relativa													
	Día	AND	DM1	DM2	DM3	DM4	DM5	DM6	DM7	DM8	DM9	DM10	DM11	DM12
-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0,17	37,34	7,28	0,00	151,65	47,92	332,55	281,23	508,80	135,31	216,33	302,03	827,55	884,68	
0,33	1000,00	402,43	881,49	1000,00	573,22	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	
1	123,73	1000,00	1000,00	726,13	1000,00	222,65	299,70	189,56	183,91	ND	ND	93,23	475,52	
2	14,14	63,40	ND	22,33	10,37	288,74	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
3	2,83	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

Anexo XII

Publicaciones

ANALYTICAL STRATEGIES TO DETECT SELECTIVE ANDROGEN RECEPTOR MODULATORS (SARMs) ADMINISTRATION IN BOVINE

Nora CESBRON, Dante ROJAS, Alexandre SYDOR, Mylène PENOT, Stéphanie PREVOST, Gaud DERVILLY-PINEL, Bruno LE BIZEC

LABORATOIRE d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA)
UMR 1278, Orléans, Université d'Orléans, BP 60520, 45 067 Orléans Cedex 3, France
Tél : +33 (0)3 25 39 78 78 - Mtl : +33 (0)3 25 39 78 80
laberca@univ-orleans.fr

Introduction

Selective androgen receptor modulators (SARMs) are a novel class of androgen receptor ligands. They are intended to exhibit the same kind of effects as androgenic drugs, like anabolic steroids, but be much more selective in their action, targeting particular tissues (muscle for example) without any undesirable effects on other tissues. While main applications of these synthetic substances are for therapeutic purposes, they will also have a high potential for misuse in veterinary practice and the sporting world. In order to guaranty the consumers with food from animal origin free from any residues of such compounds, analytical strategies are required to ensure safe food and also enable fair trade between producers. In the current work two SARMs, namely enobosarm and bicalutamide, belonging to the aryl-propionamide group, were investigated to set up analytical strategies enabling detecting both parent compounds and their metabolites in bovine matrices (urine and faeces) after oral administration.

Results and discussion

BICALUTAMIDE excretion

Chromatograms showing bicalutamide excretion in bovine urine and faeces. The x-axis represents retention time (min) and the y-axis represents relative intensity. Both samples show a prominent peak at approximately 10 minutes.

ENOBOSARM excretion

Chromatograms showing enobosarm excretion in bovine urine and faeces. The x-axis represents retention time (min) and the y-axis represents relative intensity. Both samples show a prominent peak at approximately 10 minutes.

Experimental

ENOBOSARM experimental design

Experimental design for Enobosarm: A group of cows is divided into 'Treated' and 'Control' groups. The treated group receives 200 mg of Enobosarm (Enobosarm/Enobosarm) during 22 days. Urine and faeces sampling is performed during this period.

BICALUTAMIDE experimental design

Experimental design for Bicalutamide: A group of cows is divided into 'Treated' and 'Control' groups. The treated group receives 100 mg of Bicalutamide single administration. Urine and faeces sampling is performed.

Residues analysis

Residues analysis flowchart: Urine and faeces are analyzed using Internal Standards (Enobosarm, Bicalutamide) and Enzymatic hydrolysis (Sulfonamide, Glucuronide). The analysis is performed using HPLC/MS/MS with MS/MS MS/MS.

Standardized metabolites (SARM)

Standardized metabolites (SARM): Enobosarm (m/z 338.101144, 338.101144, 338.101144), Bicalutamide (m/z 426.101144, 426.101144, 426.101144).

ENOBOSARM metabolism

Metabolic pathway diagram of Enobosarm showing the conversion of the parent compound into various metabolites through enzymatic reactions.

Full scan and extracted ion chromatograms (EIC) of the main in vivo metabolites of enobosarm. These metabolites are identified in a urine sample (hydrolysis step). The urine was collected three hours after an oral administration of 200 mg of enobosarm. Proposed structure of the parent identified metabolites obtained with previous literature and structural formulas by Protonation from Urine.

Conclusion

Results obtained by complementary analytical strategies allowed demonstrating a strong fecal elimination of SARMs of interest and their metabolites after a high dose oral administration. Bicalutamide was detected in both urine and faeces, mainly under its free form. For enobosarm, this work highlighted the presence of a great amount of conjugated forms of the molecule in the urine, mainly metabolites of phase II reactions, sulfonated and glucuronide-conjugated. Enobosarm can be detected in urine at high concentration up to 9 days when samples undergo hydrolysis. Faeces demonstrated to be the main matrix of excretion of enobosarm since values up to 500 times compared to urine could be detected, during 22 days. Such results are particularly promising in the objective of setting up a confirmatory analytical strategy and a target matrix to highlight SARMs abuse in livestock animals. Next step is to develop a screening tool to detect any SARMs abuse on the basis of a metabolomics approach as already shown efficient for other families of growth promoters.

Paper presented at 11th IAA conference, Eymard sur Jay, The Netherlands, 23rd May 2018



Evaluación de materia fecal como matriz para la detección de SARMs, posibles Contaminantes Emergentes.

Rojas D.¹, Miranda A.², Cristos D.¹, Ruiz M.¹, Palladino M.¹, Carriquiriborde P.³, Dervilly-Pinel G.⁴, Prévost S.⁴, Le Bizec B.⁴, Calzetta Resio A.⁵

¹ Instituto Tecnología de Alimentos (ITA), INTA, Mar del Plata, Argentina. ² Estación Experimental Agropecuaria Angón, INTA, La Plata, Argentina. ³ Centro de Investigaciones del Medio Ambiente - CIMA - Facultad de Exactas, UNLP, Argentina. ⁴ LIRIUM Orléans, LIRIUMCA, Nantes, France. ⁵ Cátedra de Tecnología, Protección e Inspección Veterinaria de los Alimentos, Fac. de Cs. Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina. (Argentina)

Introducción.

Los fármacos veterinarios utilizados en producción animal son metabolizados y pueden ser eliminados a través de las excretas. En los últimos años, han cobrado gran importancia como potenciales contaminantes ambientales. La materia fecal es una matriz de fácil obtención, sin embargo, es subestimada por los laboratorios de control. Los Moduladores Selectivos de Receptores Androgénicos (SARM) son una nueva familia de sustancias no esteroideas que tienen capacidad de unión a Receptores Androgénicos (AR). Idealmente presentan selectividad en su efecto dependiendo del tejido y tienen baja toxicidad (hepática, cardiovascular, etc.). Además, poseen propiedades farmacológicas favorables como alta absorción digestiva facilitando la administración oral y muestran un largo tiempo vida media antes de ser eliminado del organismo. Actualmente se cuenta con poca información a nivel internacional respecto del metabolismo de los SARMs en animales productores de alimentos. La Bicalutamida es un SARM que produciría un aumento de testosterona con efecto anabolizante.

Figura 2. Terneros Aberdeen Angus



Figura 3. Cromatogramas SIM comparativos de Bicalutamida en soluciones estándar, muestras fortificadas y muestras blancas.



Resultados y Discusión.

Se obtuvieron resultados satisfactorios para los criterios establecidos de Linealidad, Exactitud, Precisión, Sensibilidad y Selectividad.

La Figura 3 presenta cromatogramas SIM (single ion monitoring) comparativos entre solución estándar (5 ng/mL), muestra fortificada (2 ng/g) y muestra blanca.

Como se esperaba, no se detectó Bicalutamida antes de la administración. Se observó un rápido aumento de la concentración fecal de ambas formas con un pico máximo a las 24 hs (Total: 2,05 ng/g; Libre: 1,75 ng/g) y una lenta eliminación, no detectándose al día 11.

Conclusiones.

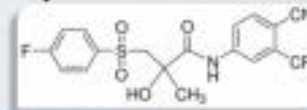
La matriz estudiada mostró su validez para el análisis de este fármaco como posible contaminante emergente. Se pudo determinar la cinética fecal de Bicalutamida en terneros de raza Aberdeen Angus.

La Bicalutamida se pudo detectar en materia fecal durante 9 días post-administración oral y la hidrólisis enzimática evidenció la presencia del fármaco conjugado.

Objetivos.

Los objetivos del trabajo fueron estudiar la cinética de eliminación fecal de Bicalutamida (Figura 1) en bovinos, investigando su forma conjugada (metabolito proveniente de reacciones de Fase II).

Figura 1. Estructura molecular de Bicalutamida



Materiales y Métodos.

En la Estación Experimental ANGEZ (INTA), se administró 100 mg por vía oral a un ternero Aberdeen Angus (Figura 2). Se tomaron muestras diarias, en los 3 días previos a la administración y durante 11 días posteriores. Las muestras fueron liofilizadas para asegurar la estabilidad de la matriz.

En el Laboratorio de Contaminantes Químicos - Instituto Tecnología de los Alimentos (INTA-Carolita, Bs As), el método aplicado consistió en una extracción con solvente y purificación con cartuchos de extracción en fase sólida, finalmente se aplicó cromatografía líquida acoplada a un detector de espectrometría de masas (Bicalutamida Libre).

Para conocer la concentración de los metabolitos de Fase II, se realizó una nueva determinación con hidrólisis enzimática para la liberación del fármaco conjugado (Bicalutamida Total). De esta forma se calculó la concentración de Bicalutamida conjugada (Figura 4).

Los análisis de laboratorio se realizaron con cromatografía líquida acoplada a un detector de espectrometría de masas (ESI-) según los parámetros presentados en la Tabla 2. Se utilizó Hidrosulfatamida como estándar interno (SIT). Las curvas de calibración se construyeron para cada matriz usando como señal (S) la relación de áreas de Bicalutamida con el estándar interno ($S^* = \text{Area}_{\text{Bic}} / \text{Area}_{\text{SIT}}$) en función de su concentración.

Antes de su aplicación, el método propuesto fue evaluado estableciendo criterios de Linealidad ($r^2 > 0,98$), Exactitud ($70 < \text{RE} < 120$), Precisión (CV < 20 %), Sensibilidad (LID: 2 ng/g) y Selectividad.

Figura 4. Curvas de eliminación fecal de Bicalutamida

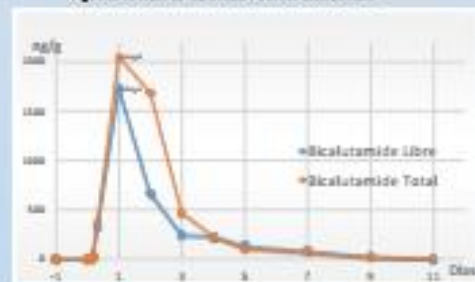


Tabla 2. Parámetros utilizados para la identificación de Bicalutamida e Hidrosulfatamida.

RT (min)	Compuesto	Área	Conc. (ng/g)
4.01	Hidrosulfatamida	291.1	50
4.01	Bicalutamida	306.0	50
6.28	Bicalutamida	678.1	100
6.28	Bicalutamida	256.1	50

Selective androgen receptor modulators: comparative excretion study of bicalutamide in bovine urine and faeces

Dante Rojas,^{a,b} Gaud Dervilly-Pinel,^{a*} Nora Cesbron,^a Mylène Penot,^a Alexandre Sydor,^a Stéphanie Prévost^a and Bruno Le Bizec^a

Besides their development for therapeutic purposes, non-steroidal selective androgen receptor modulators (non-steroidal SARMs) are also known to impact growth-associated pathways as ligands of androgenic receptors (AR). They present a potential for abuse in sports and food-producing animals as an interesting alternative to anabolic androgenic steroids (AAS). These compounds are easily available and could therefore be (mis)used in livestock production as growth promoters. To prevent such practices, dedicated analytical strategies should be developed for specific and sensitive detection of these compounds in biological matrices. The present study focused on Bicalutamide, a non-steroidal SARM used in human treatment of non-metastatic prostate cancer because of its anti-androgenic activity exhibiting no anti-anabolic effects. To select the most appropriate matrix to be used for control purposes, different animal matrices (urine and faeces) have been investigated and SARM metabolism studied to highlight relevant metabolites of such treatments and establish associated detection time windows. The aim of this work was thus to compare the urinary and faecal eliminations of bicalutamide in a calf, and investigate phase I and II metabolites. The results in both matrices showed that bicalutamide was very rapidly and mainly excreted under its free form. The concentration levels were observed as higher in faeces (ppm) than urine (ppb); although both matrices were assessed as suitable for residue control. The metabolites found were consistent with hydroxylation (phase I reaction) combined or not with glucuronidation and sulfation (phase II reactions). Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: SARMs; metabolism; LC-MS/MS; conjugated metabolites

Introduction

Because of their aptitude to act like agonist ligands of androgenic receptors (AR), anabolic androgenic steroids (AAS) exhibit strong anabolic effects in muscles and bones.^[1–3] Their use is of interest in human medicine for the treatment of catabolic and wasting muscle states caused by age or some diseases (hypogonadism, AIDS, or cancer-related muscle wasting). However, as AAS present undesirable physicochemical and pharmacokinetic properties, such as low absorption rate for oral administration, short time actions, and negative effects in human health (cardiovascular system, androgenic tissues, and in some cases, hepatic toxicity),^[4–6] synthetic alternatives were produced to mitigate these adverse effects. In particular, selective androgen receptor modulators (SARMs) have been produced as a novel class of non-steroidal AR ligands.^[7] Known since 1998,^[8] they have been investigated for therapeutic properties in cachexia treatment since 2005.^[2] SARMs action is directed at AR of muscles (growth and strength) and bones (development).^[6,9] The ideal non-steroidal SARMs advantages are tissue-selectivity, good performance to oral administration with long time activity, and low toxicity.^[6,10,11] Several chemical structures have been developed as non-steroidal SARMs: quinolone analogues, hydantoin analogues, tetrahydro-quinolone analogues, and aryl-propionamide analogues.^[1,6] SARMs belonging to the aryl-propionamide group have been the first ones to show an interesting agonistic activity with a tissue-selective action in the steroid signalling pathway.^[1,12–14] While SARMs are on the World

Anti-Doping Agency (WADA) list of prohibited substances,^[4] cases of human doping and misuse by athletes are reported from time to time.^[15–17] SARMs may also exhibit a high potential for misuse in animal husbandry as growth promoters to increase weight gain, improve carcass quality, and reduce production costs.^[7]

While in Europe, growth promoters have been banned for use in food-producing animals since 1988 (Council Directive 88/146/EEC prohibiting the use livestock farming of certain substances having a hormonal action 1988), strategies to detect potential SARMs misuse in livestock production are urgently required to guarantee consumers of food from animal origin free of any residues of such compounds. Efficient analytical strategies to detect the use of SARMs have already been proposed and while main developments have been realized in the human anti-doping arena, few applications are now available in food producing animals.^[18,19] Since these compounds have recently emerged, they have not been

* Correspondence to: Gaud Dervilly-Pinel, LUNAM Université, Oniris, Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Nantes, F-44307, France. E-mail: gaud.dervilly@oniris-nantes.fr

a LUNAM Université, Oniris, Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Nantes, France

b Instituto Tecnología de Alimentos (ITA), Centro de Investigación de Agroindustria (CIA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), CC77Morón, Argentina

investigated a lot. More studies are necessary to develop the comprehensiveness of SARMs metabolism through *in vivo* approaches,^[20,21] as already available for humans and horses. We therefore propose in this study to investigate further SARMs elimination and metabolism in bovine. Furthermore, and because it has been demonstrated in different species that SARMs were eliminated in the faeces,^[9,22–30] the present work aims at studying faeces as an alternative interesting biological matrix to detect these substances in livestock. Faeces is indeed an easy-to-collect matrix and its relevance in livestock for detecting some residues or metabolites of growth promoters has already been demonstrated.^[30–32]

In the current study, bicalutamide was selected as a model of SARM of the aryl-propionamide group^[14,15,18,19] based on previous work which shows similar *in vitro* behaviour between antagonist and agonist aryl-propionamide derivative SARMs.^[21] Bicalutamide exhibits an anti-androgen effect and is used for the treatment of human non-metastatic prostate cancer. It is a racemate and the (*R*)-enantiomer is mainly responsible for its activities.^[25–29] Although exhibiting an immediate anti-androgen effect by blocking the AR, it has been demonstrated that the natural negative feedback of androgens is consequently suppressed resulting in an elevation in luteinizing hormone (LH) levels leading to an increase in androgen and oestrogen levels with corresponding anabolic associated effects, which fully justify controlling the use of bicalutamide as a growth factor.^[33] Bicalutamide was selected to study both the parent compound and its metabolites elimination in bovine matrices (urine and faeces) after oral administration.

The objectives were to identify the main metabolites and associated detection time windows in each matrix and to propose a method of analysis based on ultra-high performance liquid chromatography coupled to a triple quadrupole mass spectrometer.

The novelty of this work relies in the assessment of faeces as an alternative interesting biological matrix to monitor such compounds.

Material and methods

Reagents and solutions

Methanol, ethanol, and acetonitrile HPLC grade were purchased from Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA). Ultra-pure water (>18.4 M/cm) was obtained from Barnstead® NANOpure® ultrapure water purification system (Thermo Scientific, Bremen, Germany). Formic acid was purchased from LGC Standards (Teddington, UK). β -Glucuronidase/Arylsulfatase (from *Helix pomatia*) stabilized aqueous solution for biochemistry (EC3.2.1.31 + EC3.1.6.1) and ammonium acetate for analysis were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Standards of enobosarm, andarine, bicalutamide, and hydroxyflutamide (Figure 1) were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA) and bicalutamide-D4 was purchased from LGC Standards (Teddington, UK).

Oasis® HLB extraction cartridges (3 cc, 60 mg, 30 m) were purchased from Waters (Milford, MA, USA).

Preparation of standards solution

Primary stock standards solutions of each SARMs compound in ethanol at 1 mg/mL were prepared with a gravimetric procedure. Bicalutamide-D4 was used as internal standard (ISTD). Mixture and dilutions of each compound (enobosarm, andarine,

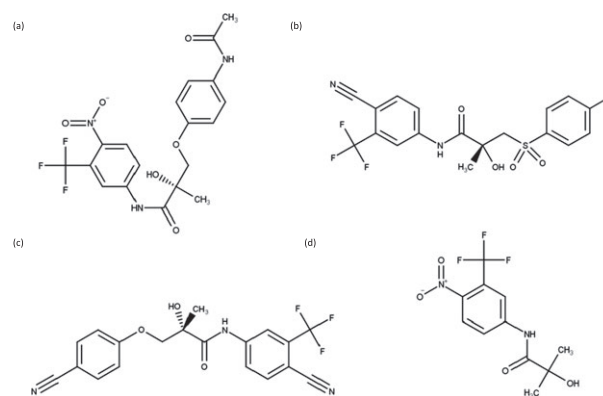


Figure 1. Molecular structures of the SARMs under investigation: (a) Andarine; (b) Bicalutamide; (c) Enobosarm and (d) Hydroxyflutamide.

bicalutamide, hydroxyflutamide) were made to obtain proper concentrations. Standards solutions were stored to -20°C .

Samples

The bicalutamide elimination study was approved by the French Committee of Ethics (Protocol N° 02323.01). Urines and faeces samples of a healthy calf (race: Montbeliard, weight: 190 kg, age: 8.5 months) were taken before and after an oral dose of 100 mg of bicalutamide at day 0. Sampling of faeces and urine started 3 days before the administration, every day until Day 7. In addition, during Day 0, 3 samples were taken at 8 a.m. (0 h) 12 a.m. (4 h), and 4 p.m. (8 h).

Urine samples were stored at -20°C until processed and the faeces samples were immediately freeze-dried.

Sample preparation

Urine

Frozen samples were thawed at room temperature, then 3 mL of the sample was mixed with 20 L of ISTD 0.1 ng/L and a 3 mL ammonium acetate buffer (0.25 M; pH 4.8) was added to adjust the pH to 5 ± 0.3 . The pH was checked with a pH indicator strip and, if necessary, adjusted with acetic acid or sodium hydroxide. Solid-phase extraction (SPE) cartridges were preconditioned with 2 x 3 mL methanol and 3 mL water. Samples were transferred to the cartridges. Immediately after, the SPE phases were washed with 3 mL solution water/methanol (95:5) followed by a 3 mL solution water/methanol (80:20). Analytes were eluted from the SPE cartridges with 4 mL methanol. Evaporation to dryness under a gentle stream of nitrogen at 45°C was performed. Evaporation was followed by reconstitution in 0.2 mL of a 70:30 (v/v) water/acetonitrile with 0.1 % formic acid mixture.

Phase II metabolites were deconjugated by an enzyme hydrolysis. Urine samples (3 mL) were put in a tube and then 20 l of ISTD 0.1 ng/L and a 3 mL ammonium acetate buffer (0.25 M; pH 4.8) were added to adjust the pH to 5.0 ± 0.3 . The pH was checked with a pH indicator strip and, if necessary, adjusted with acetic acid or sodium hydroxide. Then 20 L β -glucuronidase/arylsulfatase was added before overnight (10 h) incubation at $50 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Subsequent purification steps were performed as described above.

Faeces

A bicalutamide elimination study was carried out with the lyophilized samples. In a tube, 0.5 g homogenized portions were weighed, 4 mL ammonium acetate buffer (0.25 M, pH 4.8) and 20 L of ISTD 10 ng/L were added. The pH was checked with a pH indicator strip and, if necessary, adjusted with acetic acid or sodium hydroxide. Next, an agitation of 30 min followed by a centrifugation was carried out (20 min; 5500 r.p.m.; 5 °C). The liquid phase was centrifuged again (5 min; 2500 r.p.m.; 5 °C) to avoid solids residues. Liquid phase was taken and was evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 45 °C. The residues were re-suspended with a 2 mL ammonium acetate buffer (0.25 M, pH 4.8).

SPE cartridge was preconditioned with 2 x 3 mL methanol and 3 mL water. Samples were transferred to the cartridges. Immediately after, the SPE cartridges were washed with a 3 mL solution water/methanol (95:5) followed by a 3 mL solution water/methanol (80:20). Analytes were eluted from the SPE cartridges with 4 mL methanol. Next, evaporation to dryness under a gentle stream of nitrogen at 45 °C was performed. Evaporation was followed by reconstitution in 0.2 mL of a 70:30 (v/v) water/acetonitrile with 0.1 % formic acid mixture. Finally, the purified extracts were filtered for 30 min with a centrifugal Polyethersulfone membrane (10 KD) at 17000 x g.

Phase II metabolites were hydrolyzed by an enzyme hydrolysis: The lyophilized and homogenized faeces samples were weighted in a tube (0.5 g) and a 4 mL ammonium acetate buffer (0.25 M; pH 4.8) and 20 L of ISTD 10 ng/L were added. The pH was checked with a pH indicator strip and, if necessary, adjusted with acetic acid or sodium hydroxide. Then an agitation of 30 min followed by a centrifugation was carried out (20 min; 5500 r.p.m.; 5 °C). The liquid phase was centrifuged again (5 min; 2500 r.p.m.; 5 °C). Liquid phase was taken and evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen at 45 °C. The residues were re-suspended with a 2 mL ammonium acetate buffer (0.25 M; pH 4.8). The tube was incubated overnight (10 h) with 20 L of β -Glucuronidase/Arylsulfatase added. Subsequent purification steps were performed as described.

Chromatographic and mass spectrometric conditions

Chromatographic separation was carried out on Acquity system UPLC (Waters, Milford, MA, USA). An ACQUITY UPLC® BEH (2.1x100 mm; 1.7 μ m) column was used as stationary phase. Mass spectrometric analysis was performed using a triple quadrupole mass detector XEVO TQ-S (Waters, Milford, MA, USA) equipped with an electrospray ionization source operating in negative mode (ESI-). Data acquisition was performed using MassLynx 4.0 software (Waters, Milford, MA, USA). A Heraeus Multifuge X3FR centrifuge (Thermo Scientific, Bremen, Germany) was used for sample preparation. Mass spectrometer source temperature was set at 150 °C. Nitrogen was used as a desolvation gas at a temperature of 450 °C and a flow of 650 L/h. Capillary voltage was set at -2 kV.

Enobosarm, andarine, bicalutamide, bicalutamide-D4, and hydroxyflutamide were detected by selected reactions monitoring (SRM) mode (Table 1).

First, to study the excretion of bicalutamide, chromatographic separation was achieved using a mobile phase of solution A (water with 0.1% formic acid) and solution B (acetonitrile with 0.1% formic acid). A gradient at a flow rate of 0.6 mL/min was employed starting at 30% B (0–1 min); to 70% B (1–9 min), to 100% B (9–9.5 min) and holding at 100% B (9.5–10.5 min); to 30% B (10.5–11 min) with a final holding at 30% B (12.5 min). The injection volume was 2 L.

Table 1. Acquisition parameters used to identify and quantify Enobosarm, Andarine, Bicalutamide, Bicalutamide-D4 and Hydroxyflutamide by SRM mode. (Q) Quantifier transitions, (q) qualifier transitions.

RT (min)	Compound	Transitions	Cone (V)	Collision (eV)
2.81	Hydroxyflutamide	291.1 > 205.0 (Q)	40	24
		291.1 > 175.0 (q)		32
		291.1 > 155.0 (q)		36
		440.1 > 150.0 (Q)		26
3.02	Andarine	440.1 > 261.0 (q)	40	18
		440.1 > 205.0 (q)		32
		433.1 > 255.0 (Q)		16
3.44	Bicalutamide D4	433.1 > 185.0 (q)	30	44
		433.1 > 177.0 (q)		24
		429.1 > 255.1 (Q)		16
3.46	Bicalutamide	429.1 > 185.0 (q)	30	44
		429.1 > 173.0 (q)		24
		388.1 > 118.0 (Q)		18
3.96	Enobosarm	388.1 > 269.0 (q)	30	18
		388.1 > 185.0 (q)		38

The autosampler temperature was set at 10 °C and the column was kept at 60 °C.

Secondly, the chemical similarities among metabolites demanded changes on the ultra-performance liquid chromatography (UPLC) conditions for a more efficient separation. The study of bicalutamide metabolites was therefore performed with the same mobile phase but a different gradient at a flow rate of 0.4 mL/min was used, starting at 5% B, to 10% B (0–1 min), to 25% B (1–4 min), to 35% B (4–15 min), to 100% B (15–16 min), hold at 100% B (16–17 min), to 5% (17–17.5). The injection volume used was 2 L. The autosampler temperature was set at 10 °C and the column was kept at 60 °C.

Method performance

Parameters related to *selectivity*, *linearity*, *recovery*, *precision*, *sensitivity*, and *stability* were studied for the four SARMS of interest to evaluate the performance of the method according to Dec 2002/657/EC guidelines and requirements. Accuracy refers to the agreement between a test result and the accepted reference value (Dec 2002/657/EC), it is assessed by determining both trueness and precision. Since no certified reference material (CRM) exists for these compounds, the present study could only address precision, while trueness was not studied.

Analytes concentration ranges studies in this work were set based on the recommendations established in CRL Guidance Paper 2007.^[34] As the SARMS are not listed in this document, an intermediary level of 0.5 ppb was fixed to evaluate the performance method, based on their anabolic properties as a classic androgen as testosterone.^[21]

- Blank urines and faeces were obtained from non-treated animals and the calibration curves were performed using these blank samples. The blank samples were spiked with different amounts of stock standard solutions and were then processed with each batch of samples. Calibration curves were constructed for each compound using chromatograms areas ratio (analytes/ISTD) as a function of the concentration. The samples concentrations were determined by interpolation, therefore calibration

- curves were made to cover different ranges of concentration for urine 0.25–30 ng/mL and for faeces 0.5–1600 ng/g.
- Precision of measurements was assessed through recovery of additions of known amounts of the analyte(s) to the blank matrices. Relative standard deviation (RSD %) of triplicate analysis of blank samples spiked at 0.25; 0.5 and 1 ppb (urine and faeces) with the various SARMs was calculated.
 - The recovery (R%) was calculated for each compound and at different levels of concentrations^[21] in blank matrices (0.125, 0.25, 0.50, 1, 3, 10, and 30 ng/mL for urine and 0.25, 0.50, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 500, 1000, and 1600 ng/g for faeces) comparing the calculated concentrations with those calculated for matrices' extracts spiked at the end of the sample preparation process with similar levels of concentrations.
 - Selectivity of the method was proved following the criteria described for HPLC-MS/MS in Commission Decision 2002/657/EC investigating matrix interferences at the retention times of interest.
 - The sensitivity of the method was determined at the lowest level of calibration curves 0.25 ng/mL for urine and 0.5 ng/g for faeces. Signal-to-noise ratio of more than 10 and recovery between 70 and 120% were fixed as acceptability criteria for each compound in both matrices.

- For bicalutamide, the repeatability was evaluated on *in vivo* samples, collected from the treated animal, as the relative standard deviation (RSD %) of bicalutamide concentration measured 5 times in each urine and faeces samples.
- To study compounds stability towards the enzymatic hydrolysis, mixtures of bicalutamide and bicalutamide-D4 were incubated with and without β -glucuronidase/arylsulfatase following the mentioned incubation conditions. Stability of the analytes in the matrices was also assessed (1) on several (n=5) thawing-freezing cycles and (2) over a long period of storage (12 months) at a temperature below -20 °C. All these tests enabled concluding to the stability of the analytes (CVs < 20%, complying EU Dec 2002/657 requirements) (data not shown).

Results and discussions

Performance of HPLC-MS/MS method

In the objective of proposing a multi-SARMs-residue analytical strategy, hydroxyflutamide, enobosarm, bicalutamide, and andarine were included in the method and the corresponding performances were evaluated in both matrices of interest. For validation purposes, SARMs were identified and quantified, using relative retention time

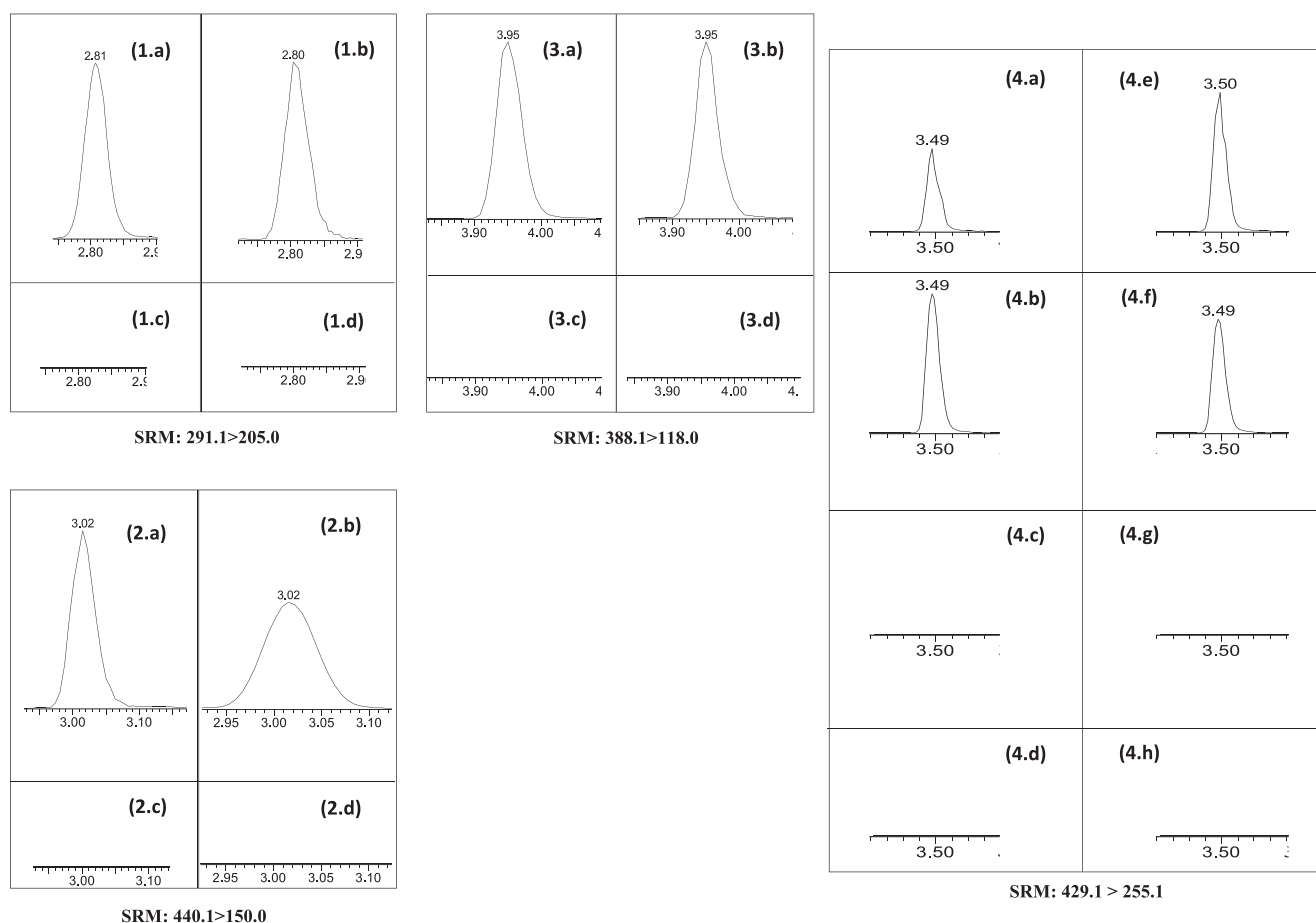


Figure 2. SRM Chromatograms used to quantified the studied SARMs: 1(a) Blank urine extract spiked with Hydroxyflutamide at 0.25 ng/mL; 1(b) Blank faeces extract spiked with Hydroxyflutamide at 0.5 ng/g; 1(c) Blank urine extract; 1(d) Blank faeces extract; 2(a) Blank urine extract spiked with Andarine at 0.25 ng/mL; 2(b) Blank faeces extract spiked with Andarine at 0.5 ng/g; 2(c) Blank urine extract; 2(d) Blank faeces extract; 3(a) Blank urine extract spiked with Enobosarm at 0.25 ng/mL; 3(b) Blank faeces extract spiked with Enobosarm at 0.5 ng/g; 3(c) Blank urine extract; 3(d) Blank faeces extract; 4(a) Treated calf urine extract, after bicalutamide administration (day 1); 4(b) Blank urine extract spiked with bicalutamide; 4(c) Blank urine extract, before bicalutamide administration (day -3); 4(e) Treated calf faeces extract, after bicalutamide administration (day 1); 4(f) Blank faeces extract spiked with bicalutamide; 4(g) Blank faeces extract and 4(h) Treated calf faeces extract, before bicalutamide administration (day -3).

Table 2. Performance parameters of the applied method.

Urines				
	Hydroxyflutamide	Enobosarm	Bicalutamide	Andarine
a	1.41765	0.98130	0.96039	0.35974
b	0.17760	0.07858	0.15287	0.04710
r ²	0.994 ± 0.007	0.995 ± 0.006	0.993 ± 0.007	0.993 ± 0.007
RSD (%)	0.6-16.5	1.5-3.5	2.3-16.3*	13.0-17.6
R%	97-118	73-119	95-111	71-107
Faeces				
	Hydroxyflutamide	Enobosarm	Bicalutamide	Andarine
a	0.72733	0.58656	0.60845	0.21067
b	0.79746	0.30871	0.42473	0.16250
r ²	0.994 ± 0.004	0.997 ± 0.002	0.998 ± 0.002	0.996 ± 0.003
RSD (%)	1.5-7.3	4.0-5.5	1.3-10.4*	2.9-7.3
R%	89-116	85-106	83-110	76-101

*RSD (%) calculated for quintuplicate analysis of each day of the trial.

(RRT) as a prerequisite and the score system was based on the ratio between the precursor ion and product ions as established in Commission Decision 2002/657/EC. Blank samples were included at each batch of samples and chromatograms of blank samples were monitored to find possible interferences. Table 1 shows retention time (RT) and transitions used for high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) analysis.

Figure 2 shows SRM chromatograms comparison between blank samples and samples spiked with the different SARMs of interest (urine 0.25 ng/mL and faeces 0.5 ng/g). No interference was found in either matrix and the chromatographic conditions were able to resolve the target compounds.

Calibration curves and samples were prepared at the same time. The calibration curves were performed using at least 5 concentrations levels. The linearity of the calibration curves was evaluated for each batch of samples. Coefficients of determination (r²) calculated were above 0.98 for all the compounds in both matrices. Table 2 presents the parameters and performances of the calibration curves constructed (urine 0.25–30 ng/mL and for faeces 0.5–1600 ng/g) for hydroxyflutamide, enobosarm, bicalutamide, and andarine.

Table 2 also shows the recovery ranges for spiked samples (urine and faeces) with corresponding values of 70% and 120%, which were considered as acceptable for the study. This was concluded satisfactory with a maximum RSD % of 17.6% for urine and 10.4% for faeces.

The performances of this protocol allow envisaging its application in the detection of traces of SARMs residues in complex bovine biological matrices with sensitivity and selectivity performances compatible with large detection time windows. While previous studies also reported appropriate performances for control purposes in urine,^[21,35,36] the present protocol proposes faeces as an interesting alternative matrix.

Bicalutamide elimination study

A calf was administered with bicalutamide and the validated analytical strategy developed above was applied to establish corresponding excretion profiles in urine and faeces (Figure 3). As expected, no bicalutamide was detected in the samples before the treatment (Figures 2 and 3). Four hours after oral

administration, bicalutamide was already detected in urine and faeces. In urine, the bicalutamide concentration increased quickly to show the maximum at day 1 as follows: 13.15 ng/mL for the free form, and 17.36 ng/mL for the total form (addition of free bicalutamide and bicalutamide liberated by enzyme hydrolysis from conjugated forms), attesting for the metabolization of the drug under phase II metabolites. Both bicalutamide forms (free and total) exhibited similar elimination profiles, with rapid increase to day 1 and slow decrease afterwards. In faeces, bicalutamide elimination was observed in greater proportion than in urine. Indeed, at day 1 the concentrations in faeces reached the ppm level

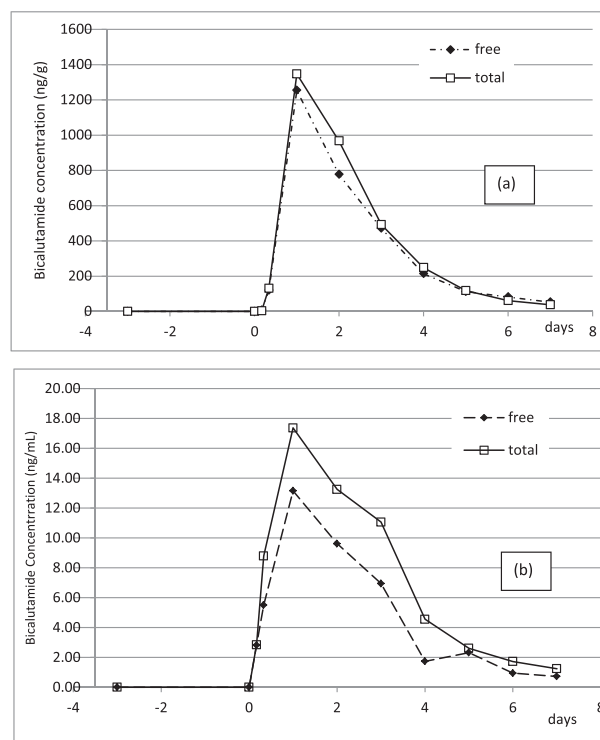


Figure 3. Bicalutamide excretion profiles in faeces (a) and urine (b) of the treated calf. Each point is the average of five extractions.

(free = 1254.11 ng/g; total = 1346.66 ng/g). Conjugated forms could also be highlighted in faeces.

In both matrices, bicalutamide was still detected until day 7 in the collected samples (urine free = 0.72 ng/mL; faeces free = 52.90 ng/g). Although these quantitative conclusions should be further confirmed on a larger set of animals, since only one animal was used in the present study they suggest that bicalutamide in bovine could have a serum long half-life similar to rat, dogs, mouse, rabbit, and human.^[26,29] These observations were found in accordance with previous work with rat, dogs, mouse, rabbit, and human showing high levels of free bicalutamide in faeces; in urine, no free bicalutamide could be observed in rat and only small amount in the other animal species considered.^[25–29]

Besides showing the presence of phase II reactions in the faeces of the treated calf, these results highlight the diagnostic capability of faeces as a useful matrix to control livestock practices. Such an observation in faeces should now be studied for other arylpropionamide SARMs analogues.

Metabolites study in urine and faeces

With the objective of highlighting any potential and interesting metabolites of bicalutamide which could be further monitored along with the parent drug in the same purified fraction, a mixture of purified extracts of both matrices was made using equal amounts of samples of days 1, 3, 5, and 7. The mixture was first

analyzed in full scan mode (ESI-) varying the cone energy to study extracted ion chromatograms of fragments ($m/z = 185, 255, 159, 173$) specific of bicalutamide (Table 1) or as reported in other studies.^[21,25,26] It enabled the location of the related peaks and registration of larger ions of interest (e.g. $m/z = 621, 445, 525, 411$) as possible precursors. Next, the mixture was studied in precursor ion scan mode and product ion scan mode with the appropriate cone voltage to generate the fragments of interest and varying the collision energy. This approach was used to verify the relation between ions/fragments. Observations from the previous steps were combined to propose potential metabolites and their transitions for further selected reaction monitoring (SRM) mode establishment and to assess their relevance in terms of selectivity of the detection and associated sensitivity. Finally, the metabolites detected were compared with literature data.

Table 3 synthesizes the relations observed between [M-H] and the fragment ions described in the study, for the mixture of extracts (urine and faeces samples of days 1, 3, 5, and 7). The chemical similarities among metabolites demanded changes on the UPLC conditions for a more efficient separation. The study of bicalutamide metabolites was therefore performed with the same mobile phase but a different gradient (section on *Chromatographic and mass spectrometric conditions*). Figure 4 shows a composite TIC chromatogram of the SRM obtained analyzing the mixture of extracts of both matrices.

Table 3. Potential metabolites found and their fragments obtained using full scan mode, precursor ion scan mode and product ions scan mode. A mixture of extracts of both matrices was made using samples of days 1, 3, 5, and 7.

Metabolites	[M-H]		Related ions (m/z)										
M1	605	587	561	543	429*	411*	193*	185	255	159*	173		
M2	621	603	445*	427*	365*	185*	255*	175	189*	271*	201*	173	159
M3	445	427	409	185*	255*	189*							
M4	509	491	411	173*	185*	255*	429*						
M5	525	507	445*	427*	255*	185*	175	189					

*Fragments verified with SRM

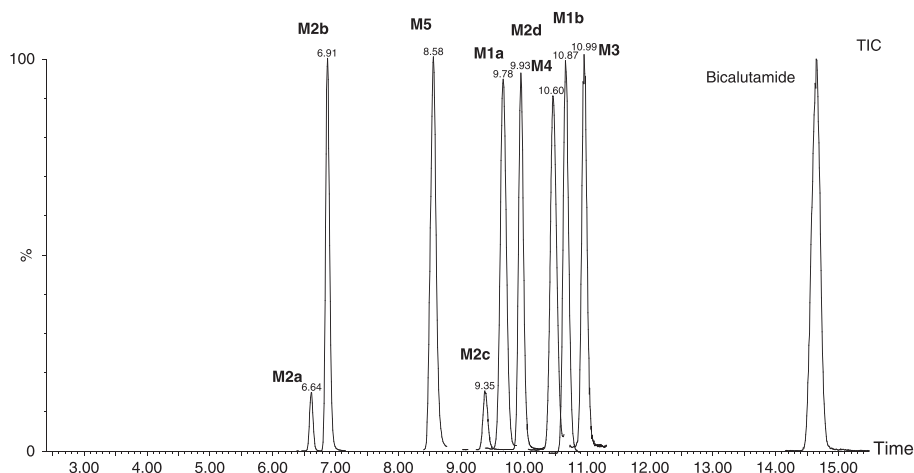


Figure 4. Composite chromatogram constructed with the SRM TIC obtained analyzing the mixture of extracts of both matrices (urine and faeces). The TIC chromatogram corresponds to: **M1a – M1b:** 605 > 159 + 605 > 193 + 605 > 411; **M2a – M2b:** 621 > 185 + 621 > 255 + 621 > 445; **M2c – M2d:** 621 > 201 + 621 > 445 + 621 > 271; **M3:** 445 > 185 + 445 > 189 + 445 > 255; **M4:** 509 > 173 + 509 > 185 + 509 > 255; **M5:** 525 > 185; 525 > 255; 525 > 445; **Bicalutamide:** 429,1 > 173,02 + 429,1 > 185,04 + 429,1 > 255,1.

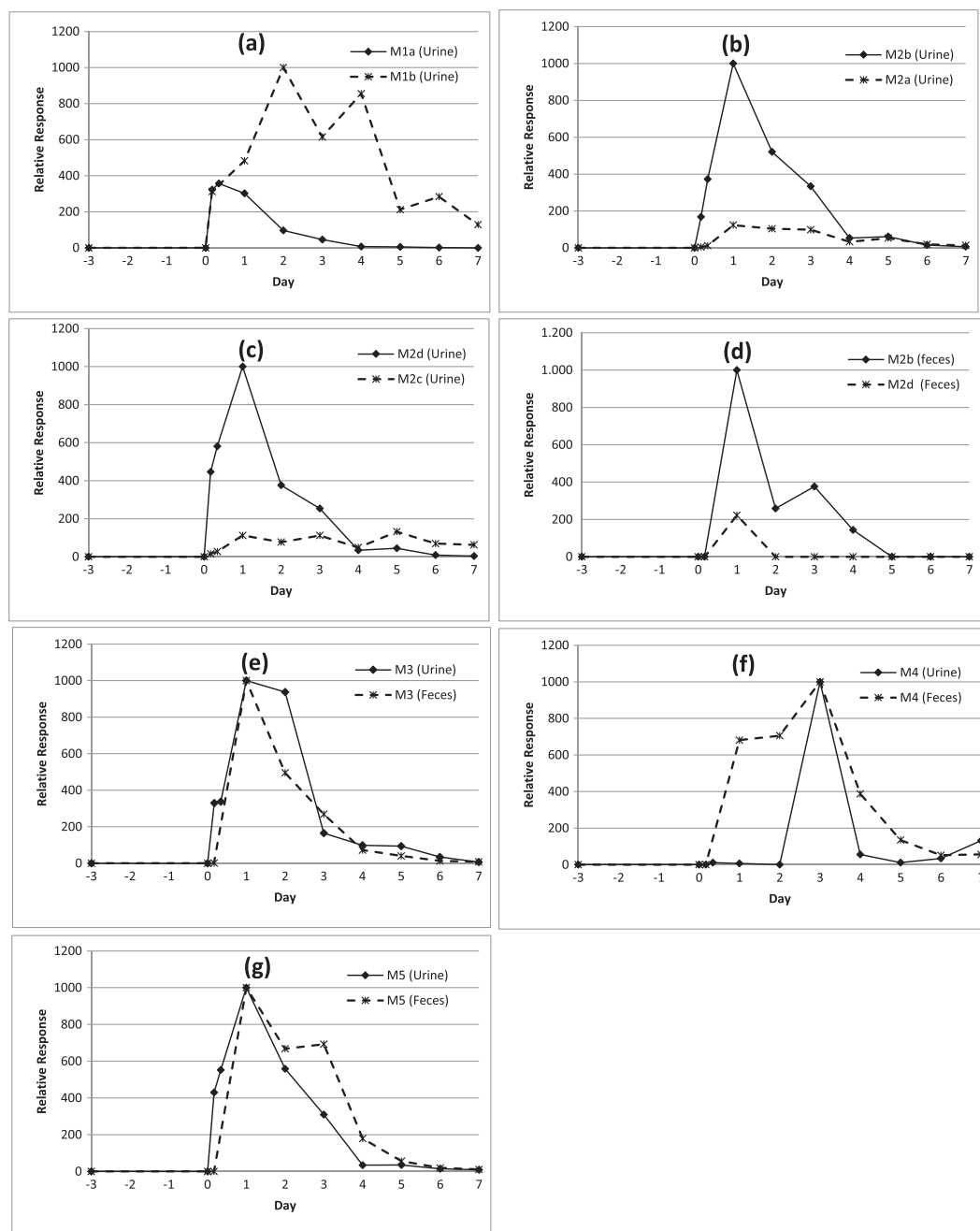


Figure 5. Bicalutamide metabolites excretion profiles found in faeces and urine of the treated calf. Relative values to the maximum response were calculated for each metabolite detected and their variations in time are presented.

Metabolite 1 (M1)

It has been attributed to glucuronated bicalutamide observed under its deprotonated form. It showed relations with the following fragment ions: (1) M1 losing water, $m/z=587$; (2) M1 losing formiate, $m/z=561$, followed by a loss of water, $m/z=543$. It also showed bicalutamide characteristic fragments, $m/z=429$, 411 and fragment: $m/z=193$, which is consistent with glucuronides moieties. M1 generated fragments corresponding to both bicalutamide rings without changes which is consistent with the glucuronidation at the tertiary alcohol of bicalutamide as follows: (1) ring tri-fluoro-methyl substituted, $m/z=185$, 255 and (2) ring mono-fluoro substituted, $m/z=159$, 173. M1 has already been

observed in bile (rat and dog) and urine (rabbit and human).^[25–27]

Figure 4 shows two chromatographic peaks for M1: M1a (9.78 min) and M1b (10.87 min), but this study has no evidence to confirm which peak corresponds to R and S bicalutamide forms.

Metabolite 2 (M2)

It corresponds to hydroxylated and glucuronated bicalutamide under its deprotonated form. It showed relations with the following fragments: (1) bicalutamide hydroxylated, $m/z=445$; (2) bicalutamide hydroxylated losing water, $m/z=427$. It was also

found $m/z = 643$, consistent with the sodium adducted of M2. M2 was also reported in bile (rat and dog) and urine (man).^[25–29] Figure 4 shows four peaks (M2a, M2b, M2c, and M2d) for M2. It could suggest that mono-hydroxylation with glucuronidation could happen at each ring for the isomers R and S. The limitations of this study do not allow suggesting which of these peaks corresponded to the S or R forms. M2a (6.6 min) and M2b (6.9 min): showed fragments corresponding to the tri-fluorate-methyl substituted ring without changes, $m/z = 185, 255$ and fragments consistent with the mono-fluorate substituted ring hydroxylated ($m/z = 175, 189$) and glucuronated ($m/z = 365$). M2c (9.3 min) and M2d (9.9 min): showed fragments corresponding to the mono-fluorate substituted ring without changes $m/z = 159, 173$ and fragments consistent with the tri-fluorate-methyl substituted ring hydroxylated ($m/z = 201, 271$).

Metabolite 3 (M3)

It corresponds to the deprotonated form of bicalutamide hydroxylated, M3, $[M-H] = 445$, already reported in faeces (man and rat). M3 showed relations with the following fragments: M3 losing water molecules, $m/z = 427$ and $m/z = 409$. M3 also showed relations with the unchanged tri-fluorated-methyl ring, $m/z = 185, 255$ and fragments consistent with the hydroxylated monofluorate ring ($m/z = 189$).

Metabolite 4 (M4)

Corresponding to the deprotonated form of bicalutamide sulfated, M4, it showed a fragment consistent with losing water, $m/z = 491$, and characteristics fragments of bicalutamide, $m/z = 429$ y 411 . It also showed relations consistent with the unchanged rings of bicalutamide, $m/z = 173, 185$, and 255 . This suggests the sulfate is located at the tertiary alcohol of bicalutamide.

Metabolite 5 (M5)

It corresponds to the deprotonated form of hydroxylated and sulfated bicalutamide, M5. It showed fragments consistent with: (1) M5 losing water, $m/z = 507$; (2) deprotonated form of bicalutamide hydroxylated, $m/z = 445$; and (3) the deprotonated form of bicalutamide hydroxylated losing water, $m/z = 427$. M5 also showed fragments corresponding to the tri-fluorated-methyl ring without changes $m/z = 185, 255$, and fragments consistent with the monofluorate ring hydroxylated ($m/z = 175, 189$) suggesting sulfate was located at the monofluorate ring hydroxylated.

The present study has enabled observing a range of bicalutamide metabolites in bovine urine and faeces. While some of them have already been described in other species (rat, mouse, rabbit, dog and man), we could highlight two metabolites (M4 and M5) that had not been reported up to now.

Compared with other species, in rat, mouse, and dog, bicalutamide is cleaved at the amide bound to produce two particular metabolites^[25,27] but as in man,^[26] during this study these specific metabolites were not detected.

The results found demonstrate that the main metabolites of bicalutamide in calf result from hydroxylation and the phase II reactions. The observed metabolic pathways are similar to other aryl-propionamide analogue SARMS compared with previous data obtained through *in vitro* and *in vivo* studies.^[9,15,24,37,38] The observed differences may be due to species-specific metabolism, to the somewhat different reaction conditions,^[21] or to the applied sample preparation conditions which may have led to the loss of some metabolites.

Metabolite elimination

Samples extracts were analyzed with the developed MRM method. Since no standards of the bicalutamide metabolites were available in this study, quantification was not possible. To study the bicalutamide metabolites elimination, relative values to the maximum response were calculated for each metabolite detected in urine and faeces (M1–M5). Figure 5 presents the variations of this relative response in time.

M1, In urine, M1a and M1b presented increasing concentrations during the first 4 h after bicalutamide administration (Figure 5(a)). The maximum for M1a was at 8 h after administration followed by a slow and marked decrease. M1b presented a maximum at day 1, with then a slower decrease compared to M1a. In faeces, M1a and M1b were not found.

M2, In urine, M2a and M2c showed a slow increase in concentration until day 1 and then they maintained the response. M2b and M2d showed a quick and big increase with a maximum at day 1 followed by a slow decrease even with a response similar to M2a and M2c at day 4 and lower at day 6 and 7 (Figure 5(b) and 5(c)).

In faeces, M2d was only found at day 1 representing c.a. 20% of M2c signal. M2c showed maximum concentration at day 1 then decreased to be undetectable after day 5 (Figure 5(d)).

M3, In both matrices, the concentration increase starts 4 h after bicalutamide administration and the associated maximum values were found at day 1. The decrease was then slower (Figure 5(e)).

M4, In urine, the relative response was low during the trial and it showed a peak at day 3. In faeces, the concentration increased 4 h after bicalutamide administration and it presented a maximum peak concentration at day 3 (Figure 5(f)).

M5, In both matrices, the maximum was at day 1. In urine, the peak was almost symmetric, while in faeces it increased quickly and decreased slowly (Figure 5(g)).

The bicalutamide and its metabolites excretion as observed in this study agree with observations reported in rat, mouse and rabbit, where the maximum bicalutamide concentration was recovered in 48 h after administration.^[25] The relative responses found in this study between different peaks, mainly M2, were consistent with enantioselective metabolism of bicalutamide in other animals^[25] and man.^[27]

Conclusions

A UPLC-MS/MS method was developed for the analysis of hydroxyflutamide, bicalutamide, enobosarm and andarine in calves' urine and faeces. The method showed good performance at concentration ranges of interest to study bicalutamide elimination profile (urine 0.25–30 ng/mL and for faeces 0.5–1600 ng/g).

Bicalutamide elimination profile and metabolic fate were studied in a calf after an oral administration. The results highlighted a higher faecal elimination compared to urine; however, both matrices could be used for residues control. The metabolites observed were consistent with hydroxylation (phase I reaction) combined or not with glucuronidation and sulfation (phase II reactions).

Similar metabolites were observed for the aryl-propionamides analogue SARMS, i.e., bicalutamide, enobosarm, and andarine, when compared with the literature data obtained with *in vitro* and *in vivo* studies. Some differences found may be due to species differences.

Although a range of metabolites could be observed and described in the present study, attesting for extended metabolization of bicalutamide in the calf, the comparison of elimination patterns tends to propose the parent drug, i.e. bicalutamide, as the target

compound for control purposes, as it presents higher elimination concentration with longer detection time windows.

References

- [1] W. Gao, C. E. Bohl, J. T. Dalton. Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 3352.
- [2] W. Gao. Androgen receptor as a therapeutic target. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2010**, *62*, 1277.
- [3] J. Li, F. Al-Azzawi. Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas.* **2009**, *63*, 142.
- [4] M. Thevis, T. Kuuranne, K. Walpurgis, H. Geyer, W. Schänzer. Annual banned-substance review: analytical approaches in human sports drug testing. *Drug Test. Anal.* **2016**, *8*, 7.
- [5] D. J. Handelsman. Androgen misuse and abuse. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *25*, 377.
- [6] J. Chen, J. Kim, J. T. Dalton. Discovery and therapeutic promise of selective androgen receptor modulators. *Mol. Interventions.* **2005**, *5*, 173.
- [7] J.T. Dalton, D.D. Miller, J. Kearbey, Sarms and method of use thereof. US 20100249228 A1. United States Patent Application Publication **2010**, 75.
- [8] J. T. Dalton, A. Mukherjee, Z. Zhu, L. Kirkovsky, D. D. Miller. Discovery of nonsteroidal androgens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *244*, 1.
- [9] J. Kim, R. Wang, K. A. Veverka, J. T. Dalton. Absorption, distribution, metabolism and excretion of the novel SARM GTx-024 [(S)-N-(4-cyano-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-cyanophenoxy)-2-hydroxy-2-methylpropanamide] in rats. *Xenobiotica.* **2013**, *43*, 993.
- [10] A. Negro-Vilar. Selective androgen receptor modulators (SARMs): A novel approach to androgen therapy for the new millennium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1999**, *84*, 3459.
- [11] W. Gao, J. T. Dalton. Expanding the therapeutic use of androgens via selective androgen receptor modulators (SARMs). *Drug Discov. Today.* **2007**, *12*, 241.
- [12] K. Aikawa, T. Miyawaki, T. Hitaka, Y. N. Imai, T. Hara, J. Miyazaki, M. Yamaoka, M. Kusaka, N. Kanzaki, A. Tasaka, M. Shiraishi, S. Yamamoto. Synthesis and biological evaluation of novel selective androgen receptor modulators (SARMs). Part I. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 2568.
- [13] R. Narayanan, M. L. Mohler, C. E. Bohl, D. D. Miller, J. T. Dalton. Selective androgen receptor modulators in preclinical and clinical development. *Nucl. Recept. Signaling.* **2008**, *6*, 1.
- [14] S. Bhasin, R. Jasuja. Selective androgen receptor modulators (SARMs) as function promoting therapies. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **2009**, *12*, 232.
- [15] E. Grata, L. Perrenoud, M. Saugy, N. Baume. SARM-S4 and metabolites detection in sports drug testing: A case report. *Forensic Sci. Int.* **2011**, *213*, 104.
- [16] B. Starcevic, B. D. Ahrens, A. W. Butch. Detection of the selective androgen receptor modulator S-4 (Andarine) in a doping control sample. *Drug Test. Anal.* **2013**, *5*, 377.
- [17] A. T. Cawley, C. Smart, C. Greer, M. Liu Lau, J. Keledjian. Detection of the selective androgen receptor modulator andarine (S-4) in a routine equine blood doping control sample. *Drug Test. Anal.* **2016**, *8*, 257.
- [18] M. Thevis, A. Thomas, G. Fußhöller, S. Beuck, H. Geyer, W. Schänzer. Mass spectrometric characterization of urinary metabolites of the selective androgen receptor modulator andarine (S-4) for routine doping control purposes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 2245.
- [19] A. Hansson, H. Knysch, S. Stanley, M. Thevis, U. Bondesson, M. Hedeland. Characterization of equine urinary metabolites of selective androgen receptor modulators (SARMs) S1, S4 and S22 for doping control purposes. *Drug Test. Anal.* **2015**, *7*, 673.
- [20] L. Beucher, G. Dervilly-Pinel, N. Cesbron, M. Penot, A. Gicquiau, F. Monteau, B. Le Bizec. Specific characterization of non-steroidal selective androgen receptor modulators using supercritical fluid chromatography coupled to ion-mobility mass spectrometry: application to the detection of enobosarm in bovine urine. *Drug Test. Anal.* **2016**. DOI:10.1002/dta.1951.
- [21] E. de Rijke, M. L. Essers, J. C. Rijk, M. Thevis, T. F. Bovee, L. A. van Ginkel, S. S. Sterk. Selective androgen receptor modulators: in vitro and in vivo metabolism and analysis. *Food Addit. Contam. Part A.* **2013**, *30*, 1517.
- [22] P. Yi, J. F. Rehmel, K. Cassidy, C. Hadden, K. Campanale, N. Patel, J. Johnson. Disposition and Metabolism of LY2452473, a selective androgen receptor modulator, in humans. *Drug Metab. Dispos.* **2012**, *40*, 2354.
- [23] M. A. Perera, D. Yin, D. Wu, K. K. Chan, D. D. Miller, J. Dalton. In vivo metabolism and final disposition of a novel nonsteroidal androgen in rats and dogs. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, *34*, 1713.
- [24] J. Yang, Z. Wu, D. Wu, M. V. Darby, S. S. Hong, D. D. Miller, J. T. Dalton. Pharmacokinetics, biodistribution and metabolism of a novel selective androgen receptor modulator designed for prostate cancer imaging. *Int. J. Oncol.* **2010**, *36*, 213.
- [25] G. W. Boyle, D. McKillop, P. J. Phillips, J. R. Harding, R. Pickford, A. D. McCormick. Metabolism of Casodex in laboratory animals. *Xenobiotica.* **1993**, *23*, 781.
- [26] D. McKillop, G. W. Boyle, I. D. Cockshott, D. C. Jones, P. J. Phillips, R. A. Yates. Metabolism and enantioselective pharmacokinetics of Casodex in man. *Xenobiotica.* **1993**, *23*, 1241.
- [27] D. McKillop, P. J. Simons, I. D. Cockshott, S. J. Hill, J. R. Harding, K. J. Cooper, D. C. Jones. Enantioselective metabolism and pharmacokinetics of Casodex in the male rat. *Xenobiotica.* **1995**, *25*, 623.
- [28] I. Cockshott. Bicalutamide: clinical pharmacokinetics and metabolism. *Clin. Pharmacokinet.* **2004**, *43*, 855.
- [29] B. J. Furr. "Casodex" (ICI 176,334) a new, pure, peripherally-selective anti-androgen: preclinical studies. *Horm. Res.* **1989**, *32*, 69.
- [30] M. W. F. Nielen, P. Rutgers, E. O.v. Bennekorn, J. J. P. Lasaroms, J. A. van Rhijn. 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. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *801*, 273.
- [31] F. Arioli, M. P. Gavinelli, M. L. Fracchiolla, A. Casati, M. Fidani, E. Ferrer, G. Pompa. Evaluation of boldenone formation and related steroids transformations in veal faeces by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 217.
- [32] N. De Clercq, J. Vanden Bussche, S. Croubels, P. Delahaut, L. Vanhaecke. Development and validation of a high-resolution mass-spectrometry-based method to study the long-term stability of natural and synthetic glucocorticoids in faeces. *J. Chromatogr. A.* **2014**, *1336*, 76.
- [33] L. M. Eri, E. Haug, K. J. Tveter. Effects on the endocrine system of long-term treatment with the non-steroidal anti-androgen Casodex in patients with benign prostatic hyperplasia. *Br. J. Urol.* **1995**, *75*, 335.
- [34] CRL Guidance Paper **2007**. CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans. Available at: http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/09_Untersuchungen/EURL_Empfehlungen_Konzentrationsauswahl_Methodenvalierungen.pdf?__blob=publicationFile [4 July 2016].
- [35] M. Thevis, M. Kamber, W. Schänzer. Screening for metabolically stable aryl-propionamide-derived selective androgen receptor modulators for doping control purposes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 870.
- [36] M. Thevis, E. Gerace, A. Thomas, S. Beuck, H. Geyer, N. Schlorer, J. D. Kearbey, J. T. Dalton, W. Schanzer. Characterization of in vitro generated metabolites of the selective androgen receptor modulators S-22 and S-23 and in vivo comparison to post-administration canine urine specimens. *Drug Test. Anal.* **2010**, *2*, 589.
- [37] T. Kuuranne, A. Leinonen, W. Schanzer, M. Kamber, R. Kostianen, M. Thevis. Aryl-propionamide-derived selective androgen receptor modulators: liquid chromatography-tandem mass spectrometry characterization of the in vitro synthesized metabolites for doping control purposes. *Drug Metab. Dispos.* **2008**, *36*, 571.
- [38] M. Thevis, W. Schänzer. Targeting new performance enhancing drugs in doping controls: Selective androgen receptor modulators (SARMs). *Spectrosc. Eur.* **2010**, *22*, 6.