



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA, PATOLOGIA COMPARATA E IGIENE  
VETERINARIA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE

INDIRIZZO IN SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA E PATOLOGIA COMPARATA

XX Ciclo

**EFFETTI DI FATTORI INTRINSECI ED ESTRINSECI  
SULL'ESPRESSIONE *IN VIVO* ED *IN VITRO*  
DEGLI ENZIMI FARMACO-METABOLIZZANTI EPATICI DEL BOVINO**

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Marco MARTINI

**Supervisore :** Ch.mo Prof. Mauro DACASTO

**Dottoranda :** Mery GIANTIN

31 gennaio 2008



**RIASSUNTO**

La superfamiglia del citocromo P450 (CYP) comprende enzimi microsomiali ubiquitari, ma principalmente localizzati nel fegato. La principale funzione di questi enzimi è quella di convertire, attraverso reazioni di ossidazione, riduzione ed idrolisi, composti endogeni o xenobiotici in composti più polari, idrosolubili e pertanto più facilmente eliminabili dall'organismo, grazie alle successive reazioni di coniugazione (Ioannides, 2006). La valutazione del pattern biotrasformativo epatico nelle specie di interesse veterinario, ma in particolare in quella bovina, risulta di notevole importanza, soprattutto per la conseguente potenziale presenza di residui negli alimenti di origine animale (Sivapathasundaram *et al.*, 2001). Tuttavia, le informazioni disponibili a questo riguardo sono al momento limitate e consistono prevalentemente in dati ottenuti dall'attività catalitica e dall'espressione proteica (Sivapathasundaram *et al.*, 2001; Nebbia *et al.*, 2003; Szotáková *et al.*, 2004; Dacasto *et al.*, 2005). Negli ultimi anni ha assunto particolare importanza la tossicogenomica, cioè lo studio delle correlazioni tra la struttura e l'attività del genoma e gli effetti tossici degli xenobiotici (Aardema e McGregor, 2002), che ha permesso la messa a punto di tecniche biomolecolari innovative, sempre più sensibili e specifiche, in grado di approfondire lo studio del "Drug metabolism" (DM: Tugwood *et al.*, 2003).

Lo scopo del presente dottorato di ricerca è consistito nella messa a punto e nell'utilizzo di alcune tecniche biomolecolari innovative, tra le quali la Real Time-PCR (Q-RT PCR), per lo studio dell'espressione e della regolazione di geni coinvolti nel metabolismo biotrasformativo del bovino.

L'approccio metodologico utilizzato è stato il seguente: una prima fase di ricerca bibliografica atta ad individuare i geni coinvolti e le rispettive sequenze disponibili nelle banche dati; una seconda, di esecuzione di tecniche di clonaggio e sequenziamento per i geni di cui non fosse nota la sequenza; una terza, di disegno e messa a punto di saggi specifici per la specie bovina; una quarta, di estrazione di RNA messaggero a partire da campioni di tessuto epatico di bovini di controllo e sperimentalmente trattati con sostanze illecite e, infine, l'applicazione dei protocolli in Q RT-PCR per la valutazione quantitativa dei trascritti (geni coinvolti nel DM e/o relativi fattori di trascrizione) in: (a) vitelloni da carne appartenenti a razze diverse; (b) vitelli a carne bianca e vitelloni di controllo e trattati, a scopo illecito, con desametazone (DEX), somministrato da solo *per os* o per via intramuscolare, o in associazione a 17 $\beta$ -estradiolo (E<sub>2</sub>; in quest'ultimo caso solo in vitelloni da carne); (c) epatociti di bovino in coltura primaria incubati con precursori endogeni/esogeni degli steroidi ed in vitelloni trattati a scopo illecito con le stesse molecole, per un confronto *vitro-vivo*. I risultati ottenuti a livello pre-trascrizionale, sono stati successivamente confrontati e/o correlati con le attività catalitiche specifiche per ciascuna isoforma di CYP e/o enzima di fase II considerati, nonché con l'espressione proteica ottenuta mediante immunoelettroforesi e successiva analisi semiquantitativa (densitometria) limitatamente alle isoforme CYP1A, 2B, 2C, 2E e 3A.

Per quanto riguarda i risultati ottenuti, sono state clonate, sequenziate e successivamente inserite nelle banche dati le sequenze corrispondenti ai geni di bovino CYP2B, CYP4A, UGT1A4, RXR $\alpha$ , GR, HNF4 $\alpha$  e

17 $\beta$ HSDII, coinvolti nel DM e nella sua regolazione; inoltre, sono stati disegnati e messi a punto dei saggi in Q RT-PCR per un totale di 28 trascritti.

Tali saggi sono stati impiegati in uno studio mirato alla valutazione del pattern biotrasformativo epatico in bovini di 18-20 mesi di età appartenenti a razze da carne diverse (Charolais, CH; Piemontese, PM; Blonde d'Aquitaine, BA). Sono state riscontrate differenze significative ( $P < 0.05$  o inferiore) nell'espressione di CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C18, CYP3A4, UGT1A1, UGT1A6, UGT2B17, GSTA1, GSTM1, GSTP1. In particolare, in tutti i trascritti sopra citati, ad eccezione di UGT1A6, la razza CH ha mostrato una minor espressione delle singole isoforme. I risultati ottenuti a livello pre-trascrizionale sono stati confermati a livello post-traduzionale mediante immunoelettroforesi unicamente per le isoforme CYP2B e CYP3A, per le quali è stato evidenziato il medesimo *trend* osservato a livello genico ( $CH < PM < BA$ ). Le attività catalitiche invece, non concordavano (eccetto per alcuni casi) con i dati ottenuti in Q RT-PCR, anzi: la razza CH infatti risultava essere dotata di una maggiore capacità biotrasformativa, potenzialmente ascrivibile ad un più efficiente sistema catalitico o alla presenza di polimorfismi. È stata inoltre effettuata la correlazione tra l'espressione genica delle singole isoforme e le rispettive attività catalitiche, che ha evidenziato, per alcune isoforme, dei buoni coefficienti di correlazione. Questi risultati confermano la razza come uno dei fattori individuali in grado di modulare il metabolismo nel bovino.

Gli stessi saggi in Q RT-PCR sono stati applicati anche in due esperimenti in cui vitelloni da carne di 15-18 mesi di età sono stati trattati con composti utilizzati a scopo illecito; il fine di tale approccio consisteva nel valutare gli effetti di tali sostanze sul metabolismo epatico nonché nell'identificare potenziali biomarcatori indiretti di trattamento. Nella prima sperimentazione, vitelloni di razza Marchigiana sono stati trattati con DEX *per os* (gruppo T<sub>PD</sub>) o per via intramuscolare (gruppo B<sub>PD</sub>), mentre nella seconda vitelloni meticcii di razze francesi sono stati trattati con DEX da solo (gruppo D<sub>de</sub>) o in associazione a E<sub>2</sub> (gruppo DE<sub>de</sub>). I dati dell'espressione genica hanno evidenziato un'induzione significativa di CYP1A1, CYP1A2 e CYP3A4 nel gruppo DE<sub>de</sub>, mentre un'inibizione considerevole delle isoforme CYP2B6 e CYP2E1 è stata riscontrata in tutti i gruppi sottoposti a trattamento. Per quanto riguarda invece gli enzimi di fase II considerati, GSTA1 è risultato indotto nei gruppi B<sub>PD</sub> e DE<sub>de</sub>, SUL1A1 nei gruppi T<sub>PD</sub> e DE<sub>de</sub>. Infine, tra i recettori nucleari è stato evidenziato un aumento dell'espressione di CAR e di RXR $\alpha$  nei gruppi T<sub>PD</sub> e DE<sub>de</sub>, e di ER $\alpha$  solo nel gruppo trattato con l'associazione di DEX ed E<sub>2</sub>. La definizione e l'utilizzo di un *panel* di saggi in Q RT-PCR, specifici per 28 geni del metabolismo epatico, in esperimenti pilota sui trattamenti illeciti ha permesso di individuare dei potenziali geni candidati, che dovranno necessariamente essere validati per l'eventuale successiva applicabilità in campo.

Lo stesso approccio (limitatamente ad alcuni enzimi di fase I e relativi fattori di trascrizione) è stato utilizzato per completare i dati relativi ad un ulteriore esperimento, in cui vitelli a carne bianca sono stati trattati con solo DEX, *per os* o per via intramuscolare: in questo caso, gli effetti evidenziati sono risultati essere differenti da quanto riscontrato per i vitelloni, probabilmente per le differenze di natura fisiologica (età, dieta, anatomia e fisiologia dell'apparato gastroenterico) che condizionano la farmacocinetica della molecola nonché di tipologia di allevamento (condizioni di stress ed alimentazione ferro-privata). Non sono

state evidenziate infatti differenze statisticamente significative nell'espressione genica dei CYP e dei recettori nucleari considerati, eccetto per GR, indotto nel gruppo trattato con DEX per via IM. L'espressione del CYP3A a livello proteico invece è risultata inibita in entrambi i gruppi sottoposti a trattamento, a conferma dei dati relativi all'attività catalitica CYP3A-dipendente, ottenuti in un lavoro precedente, e del *trend* evidenziato a livello genico per la stessa isoforma.

Infine, sono stati valutati gli effetti di alcuni precursori esogeni/endogeni, degli steroidi sessuali sull'espressione di enzimi del metabolismo e di fattori di trascrizione, mettendo a confronto un sistema *in vitro* ed uno *in vivo*. A tal guisa, sono stati utilizzati epatociti di bovino in coltura primaria incubati, per 6 h, con ADD o DHEA 100  $\mu$ M e vitelloni di razza Valdostana di 15-18 mesi di età trattati con le stesse molecole (50 mg/capo, 1 volta a settimana e per 5 settimane). I risultati ottenuti in Q RT-PCR hanno evidenziato che i trattamenti *in vivo* con queste molecole ed ai dosaggi impiegati non hanno sortito alcun effetto di rilievo (eccetto un'inibizione di PXR e PPAR $\alpha$  nel gruppo trattato con DHEA), confermando quanto evidenziato dall'immuno-elettroforesi e dalle attività catalitiche. Nel sistema *in vitro* invece, il DHEA ha determinato un'induzione di 1,5 - 4 volte dell'espressione di CYP2C9, GSTA1, DHEA-ST, 17 $\beta$ HSD tipo II, CAR, PXR, RXR $\alpha$  e PPAR $\alpha$ , ed un'inibizione significativa di CYP1A1, CYP2E1 e UGT2B17. L'incubazione con ADD, invece, ha provocato solamente un'inibizione significativa del CYP1A1. Il diverso comportamento notato *in vitro* ed *in vivo* potrebbe essere ascritto da un lato alla dose utilizzata e dall'altra al fatto che gli epatociti in coltura primaria rappresentano un sistema semplificato, che non è in grado di mimare tutti i processi farmaco- o tossicocinetici che avvengono *in vivo* (Freshney, 2001). Ciononostante, i metodi alternativi *in vitro* sono risultati essere dei validi sostituti alle sperimentazioni in campo per la loro rapidità e riproducibilità. Sono peraltro richieste ulteriori prove sperimentali volte alla validazione di un protocollo standardizzato di isolamento, in grado di ridurre la variabilità inter-coltura da noi stessi riscontrata.



**ABSTRACT**

Cytochrome P450 superfamily (CYP) comprises an ubiquitous enzyme system, with the highest concentration found in the liver. These enzymes play a crucial role in the metabolism of xenobiotics and endogenous compounds. Their primary role is converting lipophilic compounds to more polar and hydrophilic metabolites by means of oxidative, reductive and hydrolytic reactions. Products of these chemical reactions can then be conjugated with polar endogenous compounds and readily excreted by the organism (Ioannides, 2006). The evaluation of liver biotransformation pathways in veterinary species, but especially in cattle, is considered very important, particularly for the presence of potentially harmful residues in foodstuff of animal origin (Sivapathasundaram *et al.*, 2001). Thus, very few informations about bovine metabolism are actually available in literature and they primarily focused on catalytic activities and protein expression data (Sivapathasundaram *et al.*, 2001; Nebbia *et al.*, 2003; Szotáková *et al.*, 2004; Dacasto *et al.*, 2005). Recently, increasing importance has been given to toxicogenomics, the science which studies the correlations between genome structure, activity and toxicological effects of xenobiotics (Aardema and McGregor, 2002). The recent advances in molecular biology have resulted in the possibility to set up innovative, sensitive and specific biomolecular techniques, that can be successfully applied in Drug Metabolism (DM) studies (Tugwood *et al.*, 2003).

As a consequence, the aim of the present research project consists on the application of some recent biomolecular techniques, as the quantitative Real Time PCR (Q RT-PCR), in order to study the expression and the regulation of some genes involved in bovine DM.

The following methodological approach has been adopted: firstly a bibliographic search to identify genes involved in xenobiotics metabolism and then, collection of the corresponding available mRNA sequences from databases; clonage and sequencing of bovine sequences not yet available; *primers* design and set up of bovine-specific Q RT-PCR assays; total RNA isolation from cattle liver samples either of control or experimentally treated with illicit growth promoters; finally, the application of Q RT-PCR assays for the relative quantitation of selected transcripts (genes involved in xenobiotics metabolism and/or transcription factors) in: (a) beef cattle belonging to different meat cattle breeds; (b) veal calves and beef cattle illegally treated with dexamethasone (DEX) administered alone *per os* or intramuscularly, or in association with 17 $\beta$ -oestradiol (E<sub>2</sub>; this last treatment has been considered only in beef cattle); (c) in primary cultures of bovine hepatocytes incubated with endogenous/exogenous precursors of steroids and in beef cattle illegally treated with the same molecules, in order to compare *in vivo/in vitro* effects. Messenger RNA results were successfully compared and/or correlated with catalytic activity data obtained by using marker substrates known as specific for each considered CYP isoform or phase II enzyme, but also with protein expression data (CYP1A, 2B, 2C, 2E and 3A immunoblotting and semiquantitative densitometric analysis).

Partial sequences coding for bovine CYP2B, CYP4A, UGT1A4, RXR $\alpha$ , GR, HNF4 $\alpha$  and 17 $\beta$ HSDII genes (all involved in DM and its regulation) have been cloned, sequenced and submitted to GenBank; furthermore Q RT-PCR assays for a total of 28 transcripts have been designed and set up.

Forementioned assays were applied to evaluate the hepatic biotransformative pattern in 18-20 months old beef cattle belonging to three different meat cattle breeds (Charolais, CH; Piedmontese, PM; Blonde d'Aquitaine, BA). Statistically significant differences ( $P < 0.05$  or less) have been noticed in CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C18, CYP3A4, UGT1A1, UGT1A6, UGT2B17, GSTA1, GSTM1, GSTP1 mRNA expression. In particular, CH presented the lowest mRNA expression for all the forementioned transcripts except for UGT1A6, if compared with the similar expression profile of PM and BA. Results obtained at the pre-transcriptional level were confirmed at the post-translational one by immunoblotting, only in the case of CYP2B and CYP3A: in this respect, protein expression data for these two enzymes demonstrated the same *trend* among breeds (CH < PM < BA). The *in vitro* metabolism of specific model substrates for each isoform, instead, did not agree with Q RT-PCR data (except in some instances), but, on the contrary, presented an opposite behaviour: in fact, CH appeared to be the breed gifted of the lower gene expression but of the higher biotransformation capability. This result could be probably ascribed to a more efficient catalytic system or to the presence of polymorphisms. Furthermore, the correlation analysis between single enzyme gene expression and the corresponding catalytic activity has been performed: for some isoforms a good correlation has been evidenced. Present results confirmed the breed as one of the internal factors that might modulate the metabolism in cattle.

The same Q RT-PCR assays have been applied in other two experiences, where 15-18 months old beef cattle have been administered with illicit compounds; the aim of the present approach was to evaluate the effects of these substances on liver metabolism and to identify possible indirect biomarkers of treatment.

In the first experiment, "Marchigiani" beef cattle were treated with DEX *per os* ( $T_{PD}$  group) or intramuscularly ( $B_{PD}$  group), whereas in the second study French crossbred cattle were administered DEX alone ( $D_{de}$  group) or in combination with  $E_2$  ( $DE_{de}$  group). Gene expression data pointed out a significant induction of CYP1A1, CYP1A2 and CYP3A4 mRNA in  $DE_{de}$  group, while a consistent inhibition of CYP2B6 e CYP2E1 was noticed in all treated groups. As regards the tested phase II enzymes, GSTA1 was induced in  $B_{PD}$  and  $DE_{de}$  groups, and SULT1A1 in  $T_{PD}$  and  $DE_{de}$  ones. Finally, among nuclear receptors, an increase either of CAR and RXR $\alpha$  expression in  $T_{PD}$  and  $DE_{de}$  groups or ER $\alpha$  (only in  $DE_{de}$  group) was noticed. The design and the application of a 28 transcripts PCR-Array of hepatic metabolism in experiments regarding illicit treatments allowed the identification of some potential candidate genes that could be used in the future as indirect biomarkers on field, although only after a validation step.

The same approach (only for some phase I enzymes and corresponding transcription factors) has been used to complete another experiment, in which veal calves were treated only with DEX *per os* or intramuscularly: the evidenced effects were completely different from other ones collected in beef cattle, probably for physiological differences (age, diet, anatomy and physiology of the gastro-enterical apparatus) that are likely to modulate DEX pharmacokinetics but also for difficulties strictly related with this particular kind of farming (stress conditions and iron-deprived diet). No statistically significant differences were observed in chosen CYPs and nuclear receptors gene expression, except for GR, induced in the group of animals treated

intramuscularly with DEX. Furthermore, the CYP3A protein expression was inhibited in both treated groups, confirming the trend observed at both gene expression and catalytic activity levels.

Finally, the effects of some endogenous/exogenous precursors of sexual steroids on some metabolism enzymes and transcription factors gene expression have been evaluated, by comparing one *in vitro* and one *in vivo* system. Primary cultures of bovine hepatocytes, incubated for 6 hours with 100  $\mu$ M ADD or DHEA, and 15-18 months old beef cattle (“Valdostana” breed), treated with the same compounds at the dosage of 50 mg/*pro capite* once a week for 5 weeks, were used. Quantitative Real Time PCR results evidenced that the *in vivo* treatments with the forementioned molecules did not cause relevant effects (except for PXR and PPAR $\alpha$  inhibition in the group treated with DHEA), confirming both catalytic activities and immunoblotting results. On the contrary, in the *in vitro* system, DHEA caused a 1,5 – 4 fold induction of CYP2C9, GSTA1, DHEA-ST, 17 $\beta$ HSD type II, CAR, PXR, RXR $\alpha$  and PPAR $\alpha$  mRNA expression, and a significant inhibition of CYP1A1, CYP2E1 and UGT2B17. The incubation with ADD, instead, evidenced only a significant inhibition of CYP1A1 expression. The different behavior observed in the *in vivo* and *in vitro* systems could be probably due to the dose applied and to the fact that the *in vitro* system represents a simplification of the organism *in toto* and that mimics with a lot of difficulties the pharmaco- and toxicological processes that normally happen *in vivo* (Freshney, 2001). Nonetheless, *in vitro* alternative methods are valid systems because they are rapid, reproducible and could substitute field experiments, that necessitate many animals. As a whole, other experiences, to standardize the protocol of hepatocytes isolation, are requested in order to reduce the inter-culture variability observed.



**INDICE**

|  |        |
|--|--------|
| 1. INTRODUZIONE  | p. 15  |
| 1.1. Le biotrasformazioni  |        |
| 1.2. Il sistema enzimatico del Citocromo P450  |        |
| 1.3. Principali famiglie di Citocromo P450 coinvolte nel metabolismo degli xenobiotici   |        |
| 1.4. Gli enzimi coniugativi  |        |
| 1.5. Fattori in grado di modulare l'espressione degli enzimi biotrasformativi  |        |
| 1.6. Regolazione dell'espressione degli enzimi biotrasformativi  |        |
| 1.7. Metodi alternativi <i>in vitro</i> (MAV) per lo studio del metabolismo degli xenobiotici  |        |
| 1.8. Trattamenti illeciti  |        |
| 1.9. Tecniche bio-molecolari   |        |
| 2. SCOPO DELLA TESI  | p. 69  |
| 3. CLONAGGIO E SEQUENZIAMENTO DI ALCUNI GENI DEPUTATI AL METABOLISMO DEI FARMACI NEL BOVINO  |        |
| 3.1. Materiali e Metodi  | p. 75  |
| Campioni biologici   |        |
| Estrazione RNA totale da tessuti   |        |
| Analisi bioinformatica e scelta dei <i>primers</i>   |        |
| Trascrizione inversa   |        |
| <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)   |        |
| Elettroforesi su gel di agarosio   |        |
| Clonaggio di una sonda a DNA (protocollo TOPO TA cloning <sup>®</sup> )  |        |
| MiniPrep (mini preparation) di DNA plasmidico  |        |
| MidiPrep (midi preparation) di DNA plasmidico: protocollo QIAfilter <sup>™</sup> Plasmid Midi kit (Qiagen <sup>®</sup> )   |        |
| Digestione con enzimi di restrizione   |        |
| Sequenziamento   |        |
| 3.2. Risultati   | p. 96  |
| 3.3. Discussione   | p. 100 |
| 4. EFFETTO DELLA RAZZA SULL'ESPRESSIONE DEL CITOCROMO P450 E DEGLI ENZIMI DI FASE II NEL FEGATO DI BOVINO  |        |
| 4.1. Materiali e Metodi  | p. 103 |
| Animali  |        |
| Estrazione RNA totale da campioni di fegato  |        |
| Valutazione qualitativa e quantitativa dell'estratto: elettroforesi su gel di agarosio all'1%, lettura al NanoDrop e lettura dei campioni con Agilent 2100 Bioanalyser |        |
| Trascrizione inversa   |        |

Risorse bioinformatiche, selezione dei geni *target*, scelta dei *primers*

*Real Time* PCR (Q RT-PCR)

Allestimento delle frazioni subcellulari epatiche microsomiali e citosoliche

Dosaggio delle proteine citosoliche e microsomiali

Dosaggio del contenuto di citocromo P450 in microsomi epatici

Determinazione del glutatione ridotto

Determinazione della NAD(P)H citocromo c riduttasi

Attività catalitica CYP-dipendente

Attività catalitica UGT-dipendente

Attività catalitica GST-dipendente

Immunolettroforesi

Analisi dei dati ed analisi statistica

#### 4.2. Risultati

p. 137

Valutazione qualitativa e quantitativa dell'RNA estratto

Disegno dei *primers*

Messa a punto dei saggi in Q RT-PCR

Scelta del gene *reference*

Verifica dei geni *target*

Contenuto di proteine, Citocromo P450 ed attività di NAD(P)H citocromo c riduttasi

Effetti della razza sugli enzimi biotrasformativi epatici

CYP1A: attività catalitica, proteina e mRNA

CYP2B: attività catalitica, proteina e mRNA

CYP2C: attività catalitica, proteina e mRNA

CYP2E: attività catalitica, proteina e mRNA

CYP3A: attività catalitica, proteina e mRNA

UGT: attività catalitica e mRNA

GST: attività catalitica e mRNA

#### 4.3. Discussione

p. 157

### 5. ESPRESSIONE DEGLI ENZIMI BIOTRASFORMATIVI E DI ALCUNI FATTORI DI TRASCRIZIONE NEL FEGATO DI BOVINI TRATTATI A SCOPO ILLECITO CON DESAMETAZONE E 17B-ESTRADIOLO

#### 5.1. Materiali e Metodi

p. 167

Campioni biologici

Estrazione RNA totale da campioni di fegato

Valutazione qualitativa e quantitativa dell'estratto: elettroforesi su gel di agarosio all'1% e lettura al *NanoDrop*

Trascrizione inversa

|  |        |
|--|--------|
| Selezione dei geni <i>target</i> , Scelta dei <i>primers</i>   |        |
| <i>Real Time</i> PCR   |        |
| Analisi dei dati ed analisi statistica   |        |
| 5.2. Risultati   | p. 170 |
| Valutazione qualitativa e quantitativa dell'RNA estratto   |        |
| Disegno dei <i>primers</i>   |        |
| Messa a punto dei saggi in Q RT-PCR  |        |
| Scelta del gene <i>reference</i>   |        |
| Effetti del trattamento con desametazone   |        |
| Effetti del trattamento con l'associazione desametazone e 17 $\beta$ -estradiolo   |        |
| 5.3. Discussione   | p. 186 |
| 6. EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON PRECURSORI DEGLI STEROIDI (ADD E DHEA) SULL'ESPRESSIONE DEGLI ENZIMI FARMACO-METABOLIZZANTI IN VITELLONI DA CARNE ED IN EPATOCITI IN COLTURA PRIMARIA |        |
| 6.1. Materiali e Metodi  | p. 193 |
| Campioni biologici esperimento <i>in vivo</i>  |        |
| Coltura primaria di epatociti bovini   |        |
| Preparazione di frazioni subcellulari epatiche (microsomi e citosol)   |        |
| Test di citotossicità di rilascio della LDH nel terreno di coltura   |        |
| Estrazione RNA totale da campioni di fegato  |        |
| Estrazione RNA da cellule  |        |
| Valutazione qualitativa e quantitativa dell'estratto: elettroforesi su gel di agarosio all'1% e lettura al <i>NanoDrop</i>   |        |
| Trascrizione inversa   |        |
| Selezione dei geni <i>target</i> , Scelta dei <i>primers</i>   |        |
| <i>Real Time</i> PCR   |        |
| Analisi dei dati ed analisi statistica   |        |
| 6.2. Risultati   | p. 206 |
| Valutazione qualitativa e quantitativa dell'RNA estratto   |        |
| Disegno dei <i>primers</i>   |        |
| Messa a punto dei saggi in Q RT-PCR  |        |
| Scelta del gene <i>reference</i>   |        |
| Effetto del trattamento con ADD e DHEA in un sistema <i>in vivo</i> ed in epatociti in coltura primaria  |        |
| 6.3. Discussione   | p. 220 |

## 7. ESPRESSIONE DI ALCUNI ENZIMI BIOTRASFORMATIVI E DEI RELATIVI FATTORI DI TRASCRIZIONE NEL FEGATO DI VITELLI A CARNE BIANCA TRATTATI A SCOPO ILLECITO CON DESAMETAZONE

### 7.1. Materiali e Metodi p. 227

Campioni biologici

Estrazione RNA totale da campioni di fegato

Trascrizione inversa

Selezione dei geni *target*, scelta dei *primers*

*Real Time* PCR

Allestimento delle frazioni subcellulari epatiche microsomiali e citosoliche

Dosaggio delle proteine citosoliche e microsomiali

Immunolettroforesi

Analisi dei dati ed analisi statistica

### 7.2. Risultati p. 229

Valutazione qualitativa e quantitativa dell'RNA estratto

Disegno dei *primers* e messa a punto dei saggi in Q RT-PCR

Scelta del gene *reference*

Effetto del trattamento con desametazone in vitelli a carne bianca

Espressione genica in Q RT-PCR

Espressione proteica in immunolettroforesi

### 7.3. Discussione p. 235

## 8. Conclusioni generali p. 239

## 9. Bibliografia p. 243

## 10. Sitografia p. 267

## 11. Abbreviazioni p. 269

## 12. Allegati p. 273

## 13. Pubblicazioni p. 283

## 14. Ringraziamenti p. 287

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1. Le biotrasformazioni

Gli organismi viventi sono continuamente esposti all'azione di molte sostanze chimiche, di origine naturale o antropogenica, caratterizzate da un'estrema variabilità strutturale (Ioannides, 2006). Tali composti, definiti xenobiotici, comprendono anche quelle sostanze, naturali o di sintesi, che vengono somministrate volontariamente a fini terapeutici e/o profilattici (farmaci ed additivi alimentari) o utilizzati a scopo fraudolento (auxinici, promotori della crescita (PdC), anabolizzanti, appetizzanti) oppure assunti accidentalmente (pesticidi, disinfettanti, contaminanti ambientali), e che in generale possono a volte interferire pericolosamente con i normali processi omeostatici.

La maggior parte degli xenobiotici è dotata di una lipofilità sufficiente a permettere il passaggio delle barriere anatomiche e delle membrane cellulari ed il conseguente raggiungimento di plasma e tessuti. In quanto tali, vengono quindi facilmente assorbiti ma, purtroppo, eliminati lentamente: è noto infatti come i composti lipofili vengano filtrati a livello glomerulare e possano essere riassorbiti proprio a causa del loro carattere lipofilo. Tutto ciò ne favorisce l'accumulo, in particolare nel tessuto adiposo (Van't Klooster, 1992). Queste sostanze, in generale, non rappresentano soltanto dei potenziali rischi per la salute ed il benessere degli organismi ospiti bensì anche per il consumatore, per la presenza di residui in prodotti di origine animale destinati all'alimentazione (Witkamp, 1992).

Di conseguenza, la risposta immediata degli organismi viventi è quella di eliminare questi composti il più velocemente possibile, in modo tale da proteggere se stessi dai loro effetti deleteri. Gli animali pertanto, hanno sviluppato una serie di reazioni enzimatiche in grado di trasformare i composti lipofili in metaboliti idrofili, più facilmente eliminabili attraverso gli organi emuntori. Tali sistemi enzimatici risiedono nel reticolo endoplasmatico e nella frazione citosolica di molti tessuti quali reni, polmoni, intestino e cute, ma soprattutto nel fegato (Sipes e Gandolfi, 1986). Nella maggior parte dei casi, a tale metabolismo consegue l'abolizione o una riduzione dell'attività biologica dello xenobiotico (Ioannides, 2002) e, di conseguenza, una modulazione dell'intensità e della durata del suo effetto. Questi importanti processi vengono definiti biotrasformazioni.

Si deve a Williams (1971) l'introduzione del concetto di metabolismo come processo di detossificazione e la classificazione delle biotrasformazioni in reazioni di prima e seconda fase.

Le reazioni di fase I comprendono principalmente reazioni di ossidazione, riduzione ed idrolisi, che solitamente smascherano o introducono sulla molecola dello xenobiotico gruppi polari quali -OH, -COOH e -NH<sub>2</sub>. Questi gruppi funzionali rendono il composto idoneo a subire i successivi processi di coniugazione (reazioni di fase II) con sostanze endogene quali l'acido glucuronico, il glutatione, il solfato (formazione di esteri dell'acido solforico) ed aminoacidi: i coniugati così formati assumono un maggior peso molecolare e caratteristiche di idrosolubilità.

Gli enzimi coinvolti nelle reazioni di fase I si trovano prevalentemente a livello del reticolo endoplasmatico cellulare e la maggior parte di essi appartiene alla superfamiglia del citocromo P450 (CYP), mentre gli

enzimi di fase II sono a prevalente localizzazione citosolica e sono rappresentati da glucuronil-transferasi, glutatione-transferasi, acetil-transferasi, solfo-transferasi e metil-transferasi (Alberti e Villa, 1984).

Tecniche di ultracentrifugazione differenziale permettono di isolare le membrane del reticolo endoplasmatico sotto forma di vescicole di circa 100 nm di diametro definite microsomi, ricoperte o meno di ribosomi. L'analisi biochimica di queste membrane, trattate precedentemente con ribonucleasi per eliminare le ribonucleoproteine, ha rivelato in esse la presenza di proteine strutturali e lipidi per il 30-50% ed enzimi necessari alla sintesi proteica, al metabolismo dei lipidi e ai processi di biotrasformazione.

Benché inizialmente le reazioni di biotrasformazione siano state considerate come sistema di deattivazione, oggi è noto come invece siano coinvolte in reazioni cosiddette di bioattivazione, in grado di convertire sostanze chimiche innocue in sostanze elettrofile reattive, che possono dare citotossicità interagendo covalentemente con le proteine oppure comportarsi come apteni e sviluppare immunotossicità o ancora legarsi al DNA e generare mutazioni (Sivapathasundaram *et al.*, 2001; Nebbia, 2001, Nebbia *et al.*, 2003). In alcuni casi, infatti, può accadere che il metabolita formatosi conservi o addirittura acquisisca un'attività farmaco-tossicologica superiore al composto parentale (Nebbia, 2001). Un fenomeno di bioattivazione è infatti responsabile dell'attività mutagenica dell'aflatossina B1: in seguito alla epossidazione dell'anello difuranico di tale micotossina, si ottiene la formazione di un metabolita in grado di legarsi covalentemente a macromolecole cellulari nucleofile quali il DNA e le proteine; questo legame è all'origine di addotti a DNA e proteine (albumina) che nel primo caso possono portare a mutazioni che conducono a potenziali processi di cancerogenesi (Kadlubar e Hammons, 1987).

Di recente, alcuni autori hanno proposto di aggiungere allo schema classico delle biotrasformazioni anche un nuovo gruppo di enzimi, detti di fase III, il cui ruolo consisterebbe nel trasportare i composti coniugati al di fuori della cellula (Zimmiak *et al.*, 1993). Recentemente ha assunto particolare importanza il ruolo della P-glicoproteina (PgP) nel metabolismo dei farmaci. La PgP è altamente espressa a livello di epatociti, di cellule epiteliali intestinali e dei tubuli renali, nonché di cellule endoteliali dei capillari cerebrali; è stato dimostrato che è in grado di favorire l'escrezione dei farmaci dagli epatociti e dai tubuli renali nello spazio luminale adiacente. A livello enterico, inoltre, questo trasportatore può prolungare il tempo di permanenza intracellulare delle molecole ad azione farmacologica, attraverso un processo ripetitivo di estrusione e riassorbimento, che comporta un aumento del metabolismo delle stesse in questa sede (Lin, 2003).

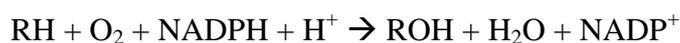
## 1.2. Il sistema enzimatico del Citocromo P450

Un gran numero di sistemi enzimatici è coinvolto nelle reazioni di fase I, ma il principale è quello delle monossigenasi a funzione mista, che a sua volta comprende il sistema multienzimatico del CYP e delle monossigenasi flaviniche.

In particolare, la superfamiglia del CYP comprende diversi isoenzimi prevalentemente localizzati nelle membrane del reticolo endoplasmatico liscio e genericamente costituiti da un gruppo prostetico, la ferroprotoporfirina IX, e da un polipeptide, codificato da singoli geni.

Nel 1958 si descrisse per la prima volta un pigmento di membrana in grado di presentare un picco di assorbimento a 450 nm, dopo riduzione con sodio-ditionito e complessazione con monossido di carbonio a formare un ferrocarbonile (Garfinkle, 1958; Klingenberg, 1958). Studi successivi condotti da Omura e Sato (1964) permisero anche di determinare la natura emoproteica di questo pigmento, il quale in seguito a degradazione portava alla formazione di un composto inattivo, noto come citocromo P420.

I diversi isoenzimi del P450 catalizzano reazioni di ossidazione in cui l'atomo di una molecola di ossigeno viene inserito nel substrato, ossidandolo, mentre l'altro viene ridotto ad acqua, come schematizzato nella formula seguente, in cui RH è il substrato (endogeno o esogeno) e ROH il metabolita corrispondente idrossilato.



In particolare, l'atomo di ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) del gruppo eme funziona da accettore di elettroni nelle reazioni di ossidazione, mentre l'apoproteina è responsabile della diversa affinità di legame e specificità di substrato dei diversi isoenzimi (Yan e Caldwell, 2001).

Gli elettroni necessari per lo svolgimento della reazione vengono trasferiti, dal nicotinamide adenin dinucleotide fosfato ridotto (NADPH) al CYP, attraverso una flavoproteina, la NADPH-citocromo P450 riduttasi.

Il CYP è rinvenibile nella maggior parte degli organismi viventi, compresi batteri, lieviti e piante. Consiste di famiglie e sottofamiglie di enzimi che sono classificate sulla base dell'identità della sequenza aminoacidica. I membri della stessa famiglia (indicati con un numero arabo) possiedono un'identità della sequenza aminoacidica pari al 40%, mentre in quelli appartenenti alla stessa sottofamiglia (indicate da una lettera) è superiore al 55% (Nelson *et al.*, 1996). All'interno della stessa sottofamiglia, ciascun gene codificante per una specifica isoforma viene indicato con un numero arabo (esempio CYP3A4).

Il genoma umano comprende 57 differenti CYP (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>); uno studio recente li ha classificati in diversi gruppi sulla base del loro coinvolgimento metabolico: quindici isoforme metabolizzano le sostanze chimiche ed i farmaci; quattordici sono coinvolte prevalentemente nel metabolismo degli steroli (acidi biliari compresi); quattro isoenzimi ossidano le vitamine liposolubili; nove sono coinvolti nel metabolismo degli acidi grassi e degli eicosanoidi; dei rimanenti quindici invece non si conosce la selettività di substrato e la conseguente funzione (Guengerich, 2003).

In generale, delle 18 famiglie conosciute nella specie umana, solo le prime 4 (CYP1-4) sono coinvolte nel metabolismo degli xenobiotici nonché di alcuni substrati endogeni (ormoni, vitamine, acidi biliari). Gli altri CYP invece giocano un ruolo determinante nella biosintesi di particolari substrati endogeni, come per esempio nella steroidogenesi.

Nella tabella 1.2.1 vengono riportate le principali attività farmaco-metabolizzanti svolte dalle singole famiglie di CYP nelle diverse specie.

| <b>Famiglia</b> | <b>Sottofamiglia</b> | <b>Coinvolgimento metabolico</b>  | <b>Specie studiata</b>                                       |
|-----------------|----------------------|---|--|
| <b>CYP1</b>     | A, B                 | Metabolismo farmaci e steroidi<br>Metabolismo contaminanti ambientali (idrocarburi aromatici policiclici, amine aromatiche, aflatossina B1) | Ratto, coniglio, criceto, trota, cane, scimmia, uomo, bovino |
| <b>CYP2</b>     | A, B, C, D, E        | Metabolismo farmaci e steroidi  | Topo, ratto, coniglio, cane, scimmia, uomo, bovino           |
| <b>CYP3</b>     | A, B, F              | Metabolismo farmaci e steroidi  | Ratto, coniglio, criceto, scimmia, uomo, bovino              |
| <b>CYP4</b>     | A                    | Metabolismo acido arachidonico e acidi grassi   | Ratto, coniglio, uomo, bovino                                |
| <b>CYP5</b>     | A, B                 | Sintesi trombossani A2  | Uomo   |
| <b>CYP7</b>     | A, B                 | Biosintesi degli acidi biliari  | Ratto, coniglio, uomo, bovino                                |
| <b>CYP8</b>     | A, B                 | Sintesi prostaciline  | Uomo   |
| <b>CYP11</b>    | A                    | Biosintesi steroidi   | Ratto, bovino, suino, uomo                                   |
| <b>CYP17</b>    | A                    | Biosintesi steroidi   | Bovino, suino, pollo, uomo                                   |
| <b>CYP19</b>    | A                    | Biosintesi steroidi   | Ratto, pollo, uomo   |
| <b>CYP21</b>    | A                    | Biosintesi steroidi   | Topo, bovino, suino, uomo                                    |
| <b>CYP24</b>    | A                    | Degradazione vitamina D3  | Uomo   |
| <b>CYP26</b>    | A                    | Idrossilazione acido retinico   | Uomo   |
| <b>CYP27</b>    | A, B                 | A: biosintesi acidi biliari<br>B: attivazione vitamina D3   | Uomo   |

Tabella 1.2.1: Principali attività farmaco-metabolizzanti delle famiglie di CYP nelle diverse specie (Nebert *et al.*, 1989; Nebert *et al.*, 1991; Nelson *et al.*, 1996; Sivapathasundaram *et al.*, 2001; Van't Klooster, 1992; Nebbia *et al.*, 2003).

### 1.3. Principali famiglie di Citocromo P450 coinvolte nel metabolismo degli xenobiotici

Come riportato nel capitolo precedente, le famiglie CYP1, CYP2 e CYP3 sono maggiormente coinvolte nel metabolismo degli xenobiotici, mentre la famiglia CYP4 presenta come principali substrati metabolici gli acidi grassi e le prostaglandine.

Le diverse isoforme possono essere specificatamente indotte o inibite da diversi xenobiotici (Sheweita, 2000) ed i meccanismi di regolazione coinvolti verranno descritti dettagliatamente in seguito.

Le diverse famiglie di CYP, i loro substrati nonché gli eventuali induttori/inibitori, sono stati ampiamente studiati nell'uomo e nelle specie da laboratorio; tuttavia è stato riscontrato come esistano differenze nella specificità di substrato a seconda della specie animale considerata (Pasanen, 2004). Per questo motivo, negli ultimi anni, sono stati condotti diversi studi anche nelle specie di interesse veterinario, incluso il bovino, che hanno permesso di porre in evidenza le eventuali differenze riguardanti le capacità biotrasformative in queste specie (Machala *et al.* 2003; Nebbia *et al.*, 2003; Szotáková *et al.*, 2004; Dacasto *et al.*, 2005; Giantin *et al.*, 2006). Nella tabella 1.3.1 vengono riportati i composti induttori ed inibitori e le attività catalitiche *marker*, solitamente impiegate, specifici per le famiglie CYP1-4.

#### **Famiglia CYP1**

La famiglia CYP1 è composta da due sottofamiglie: il CYP1A, che annovera le isoforme 1A1 e 1A2, ed il CYP1B, il cui unico membro è il CYP1B1.

Il CYP1A1 è un enzima extraepatico, responsabile della bioattivazione di diversi pre-cancerogeni; in particolare, catalizza le reazioni di ossidazione del benzo[a]pirene e di altri idrocarburi aromatici policiclici (PAHs: Donato, 2004). Questa isoforma risulta inducibile, a livello polmonare, placentare, mammario e linfatico, in seguito all'esposizione dell'animale a contaminanti ambientali come PAHs, amine aromatiche e la diossina (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-diossina o TCDD: Whitlock, 1999).

Il CYP1A2 è un enzima a prevalente localizzazione epatica, dove rappresenta circa il 13% del contenuto totale di CYP (Yan e Caldwell, 2001); tra i suoi substrati sono compresi diversi farmaci (fenacetina, paracetamolo, caffeina, teofillina e propranololo) nonché diverse sostanze tossiche (nitrosammine, aflatossina B1 ed amine aromatiche: Donato, 2004). Anche il CYP1A2 può essere indotto a seguito dell'esposizione ad idrocarburi contenuti nel fumo di tabacco o sprigionati durante la combustione di alcuni alimenti, nonché dall'assunzione di omeprazolo o di composti indolici vegetali (Donato, 2004).

La modulazione delle suddette isoforme è mediata dal recettore AhR (*aryl hydrocarbon receptor*) e dall'ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*: Kawajiri e Fujii-Kuriyama, 2007).

Le attività CYP1A1- e CYP1A2-dipendenti possono essere valutate dall'entità della *O*-dealchilazione dell'etossiresorufina (EROD) e della metossiresorufina (MROD: Machala *et al.*, 2003). L'attività di EROD è marcatamente più elevata nel bovino rispetto al ratto (Sivapathasundaram *et al.*, 2001), al suino, agli ovi-caprini (Szotáková *et al.*, 2004) nonché ai conigli e ai broiler (Nebbia *et al.*, 2003). Al contrario, l'attività della MROD è simile in bovino, ratto, suino e broiler, mentre è da 3 a 7 volte inferiore rispetto a quella registrata nel cavallo e nel coniglio (Sivapathasundaram *et al.*, 2001; Nebbia *et al.*, 2003). La furafillina

costituisce un inibitore specifico del CYP1A2, mentre l' $\alpha$ -naftoflavone inibisce entrambe le isoforme (Pelkonen *et al.*, 1998). La presenza nei microsomi epatici di bovino di proteine correlabili al CYP1A è stata confermata anche grazie a tecniche di immunoelettroforesi, utilizzando anticorpi diretti contro il CYP1A di ratto e coniglio (Sivapathasundaram *et al.*, 2001; Nebbia *et al.*, 2003).

Il CYP1B1 è un enzima presente in diversi tessuti extraepatici come polmone, rene, utero, ghiandola mammaria ed ovaio (Hakkola *et al.*, 1997). Nell'uomo questo enzima catalizza l'idrossilazione in posizione 4 dell'estradiolo, e come i membri della famiglia CYP1A è in grado di attivare diversi pre-cancerogeni e pre-mutageni come PAHs e le amine aromatiche (Shimada *et al.*, 1996).

### **Famiglia CYP2**

La famiglia CYP2 comprende diverse sottofamiglie, tra cui il CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D e CYP2E. L'importanza di ciascuna di queste sottofamiglie nel metabolismo degli xenobiotici varia significativamente a seconda dell'isoforma considerata (Yan e Caldwell, 2001).

Solo alcune isoforme della famiglia 2A sono espresse a livello epatico in maniera rilevante (il CYP2A6 nell'uomo e le isoforme CYP2A1 e CYP2A2 nel ratto, che rappresentano rispettivamente il 4-15% ed il 2% del contenuto totale di CYP). Nel ratto, le due isoforme del CYP2A riconoscono come substrati gli steroidi endogeni, mentre l'isoforma CYP2A6 dell'uomo è prevalentemente coinvolta nel metabolismo degli xenobiotici (Haduch *et al.*, 2005).

Il CYP2A6 è il responsabile dell'ossidazione della nicotina e della bioattivazione di alcuni pre-cancerogeni (nitrosamine contenute nel fumo di tabacco ed aflatossina B1); l'attività catalitica di questa isoforma può essere misurata valutando l'idrossilazione e/o la deetilazione (per entrambe in posizione 7) rispettivamente della curarina e dell'etossicumarina (Donato, 2004). Questa isoforma può essere indotta da fenobarbitale (PB), rifampicina, desametasone (DEX) e nicotina oppure sovraespressa a seguito dell'insorgenza di patologie epatiche come cirrosi, epatite virale, infestazioni parassitarie ed alcuni tumori (Haduch *et al.* 2005). L'attività dell'enzima cumarina 7-idrossilasi nel bovino è marcatamente più elevata rispetto al ratto (Sivapathasundaram *et al.*, 2001), ma è risaputo che questo roditore mostra una carenza specie-specifica nella biotrasformazione di questo substrato (Pasanen, 2004). Inoltre, nei microsomi epatici di bovino, è stata dimostrata la presenza di proteine in grado di cross-reagire con anticorpi diretti contro il CYP2A6 dell'uomo (Machala *et al.*, 2003).

Il CYP2B comprende nell'uomo una sola isoforma, il CYP2B6, espressa a livelli inferiori all'1% nel fegato, mentre nel ratto si rinvencono le isoforme CYP2B1 e CYP2B2. L'espressione e l'induzione del CYP2B6 sono regolate da un recettore nucleare, il *constitutive androstan receptor* (CAR), il quale, formando un eterodimero con il recettore dell'acido retinoico (RXR), modula la trascrizione dei geni che codificano per questo citocromo (You, 2004). Gli enzimi appartenenti a questa sottofamiglia sono importanti soprattutto per il metabolismo di composti endogeni quali gli ormoni steroidei, ma annoverano altresì tra i loro substrati anche farmaci come i barbiturici e le benzodiazepine (Nims *et al.*, 1997); possono, peraltro, essere indotti nel

ratto conseguentemente alla somministrazione di PB, clotrimazolo e taluni policlorobifenili. Anche nel caso del CYP2B è stato possibile dimostrare, nel bovino, la presenza di proteine immunoreattive verso anticorpi anti-CYP2B di ratto (Sivapathasundaram *et al.*, 2001; Nebbia *et al.*, 2003; Giantin *et al.*, 2006). L'attività dell'enzima pentossiresorufina *O*-dealchilasi nel bovino è simile a quella del ratto (Sivapathasundaram *et al.*, 2001) ma, come in altri animali da reddito, molto bassa (Szotáková *et al.*, 2004) e con differenze ascrivibili alla razza (Giantin *et al.*, 2006). Utilizzando substrati CYP2B-dipendenti come la benzfetamina e la benzilossiresorufina, non sono state individuate differenze tra il bovino, il cavallo e il broiler (Nebbia *et al.*, 2003).

Nell'uomo la sottofamiglia CYP2C è costituita da molteplici isoforme, ma quelle presenti nel fegato e responsabili del metabolismo biotrasformativo sono CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 e CYP2C19. L'isoforma CYP2C9, che tra l'altro metabolizza l'ibuprofene e la tolbutamide (un farmaco ipoglicemizzante orale), è tra tutte la più espressa, poiché costituisce da sola il 60% del CYP2C nell'uomo. Il CYP2C8 comprende tra i suoi substrati il taxolo, mentre il CYP2C19 (l'isoforma meno rappresentata, circa l'1%), concorre al metabolismo di farmaci come il diazepam, l'omeprazolo e la clomipramina (Yan e Caldwell, 2001). Barbiturici, antimicotici e fenotiazine sono in grado di indurre queste isoforme, grazie all'interazione con i recettori nucleari CAR e *pregnane X receptor* (PXR), mentre tra gli xenobiotici inibitori si annoverano sulfafenazolo e fluvoxamina (Pelkonen, 2004). Anche nel ratto sono presenti diverse isoforme del CYP2C, alcune delle quali presentano differenze di espressione legate al sesso (il CYP2C11 e il CYP2C12 sono costitutivamente espressi rispettivamente nel maschio e nella femmina: Kedderis e Mugford, 1998). L'esistenza del CYP2C nel bovino è stata dimostrata, anche in questo caso, tramite l'immunolettroforesi con anticorpi anti-CYP2C10 umano e CYP2C11 di ratto (Sivapathasundaram *et al.*, 2001); nei Ruminanti (inclusi quelli selvatici), l'attività catalitica CYP2C-dipendente può essere stimata valutando l'idrossilazione della tolbutamide (Machala *et al.*, 2003; Granata *et al.*, 2007). Proteine cross-reattive nei confronti del CYP2C9 umano e la demetilazione del suo substrato 7-metossi-4-trifluorometilcurarina sono state evidenziate in bovino, suino e ovi-caprini (Szotáková *et al.*, 2004).

Un'altra importante isoforma appartenente alla famiglia CYP2 è il CYP2D6 che, nell'uomo, costituisce circa il 2% del CYP totale epatico. Nonostante i bassi livelli di espressione, il CYP2D6 è il secondo enzima P450-dipendente più importante nella biotrasformazione degli xenobiotici, essendo responsabile del metabolismo di almeno il 30% dei farmaci presenti in commercio. Tra i suoi substrati si annoverano farmaci antiaritmici, antidepressivi, neurolettici e  $\beta$ -bloccanti (Yan e Caldwell, 2001). Questa isoforma, diversamente dalle precedenti, non è inducibile ma risulta essere selettivamente inibita in presenza dell'antiaritmico chinidina (Pelkonen, 2004). Nel bovino, a differenza dell'uomo, le isoforme comprese nella famiglia CYP2D sono due (con un'identità nella sequenza nucleotidica del 93%), che comunque cross-reagiscono con anticorpi anti-CYP2D6 dell'uomo; nel bovino, analogamente all'uomo, la sua attività catalitica viene stimata misurando l'idrossilazione della debrisoquina e del bufurarolo (Sivapathasundaram *et al.*, 2001).

Il CYP2E1 è l'unico componente di questa sottofamiglia nell'uomo. Localizzato prevalentemente a livello epatico, è in grado di bioattivare alcuni cancerogeni, come PAHs e le nitrosamine; è altresì responsabile del metabolismo del paracetamolo (Donato, 2004), consecutivamente al quale si origina un metabolita tossico, L'*N*-acetilbenzilimidochinone (Sinclair *et al.*, 1998). Nell'uomo, un'elevata concentrazione di CYP2E1 si riscontra negli alcolisti, dal momento che questa isoforma può essere indotta dall'etanolo (anche in altre specie come il ratto: Sinclair *et al.*, 1998). Un altro induttore del CYP2E1, nell'uomo, è l'isoniazide (un farmaco antitubercolare: Park *et al.*, 1993). La capacità ossidativa nei confronti di alcuni substrati CYP2E-specifici come anilina, *N*-nitrosodimetilamina e *p*-nitrofenolo risulta essere inferiore, comunemente ad altre specie di interesse domestico, rispetto al ratto (Nebbia *et al.*, 2003). Un altro substrato CYP2E-dipendente la cui attività non risulta comunque rilevante nel bovino è rappresentato dal clorzoxazone (che viene idrossilato in posizione 6: Sivapathasundaram *et al.*, 2001; Szotáková *et al.*, 2004).

### **Famiglia CYP3**

La famiglia CYP3A è la più abbondante nel fegato umano e, tra le diverse isoforme che la compongono, il CYP3A4 è quello più importante nel metabolismo degli xenobiotici, poiché costituisce il 30% del CYP totale e partecipa al metabolismo di più del 50% dei farmaci utilizzati nell'uomo (You, 2004); tra questi, si annoverano eritromicina, midazolam, ciclosporina A e lidocaina (Donato, 2004). Le altre isoforme presenti nell'uomo sono il CYP3A5, presente prevalentemente nel fegato ma riscontrabile anche in polmone, colon ed esofago (Donato, 2004), ed il CYP3A7, originariamente individuato a livello epatico nel feto, ma espresso anche in placenta, endometrio, ghiandole surrenali e prostata nell'individuo adulto (Zhu e Lee, 2005).

Il CYP3A può essere indotto da glucocorticoidi come il DEX, macrolidi come la rifampicina, derivati imidazolici quali il clotrimazolo e barbiturici come il PB. L'induzione è mediata dal PXR e CAR, secondo un meccanismo di *cross-talk*; entrambi formano un eterodimero con l'RXR prima di legarsi al DNA (Pascussi *et al.*, 2001).

In diversi studi, l'uso dell'immunoblotting ha consentito di identificare la presenza di proteine correlabili al CYP3A in diverse specie animali d'allevamento, ivi compreso il bovino, utilizzando anticorpi anti-CYP3A1 e CYP3A2 di ratto (Sivapathasundaram *et al.*, 2001; Nebbia *et al.*, 2003) e anti-CYP3A4 di uomo (Sivapathasundaram *et al.*, 2001; Szotáková *et al.*, 2004). I substrati utilizzabili per valutare l'attività catalitica sono molteplici: l'eritromicina, l'etil morfina e la triacetiloleandomicina (TAO) che, nel bovino, vengono demetilate tanto quanto osservato in ratto (Sivapathasundaram *et al.*, 2001), suino, cavallo e broiler (Nebbia *et al.*, 2003), il testosterone (TST), che viene idrolizzato in posizione 6 $\beta$  e 2 $\beta$  (Machala *et al.*, 2003; Szotáková *et al.*, 2004).

Recentemente, è stato possibile valutare l'espressione del CYP3A *in vivo* in maniera non invasiva, stimando le concentrazioni urinarie di 6 $\beta$ -idrossicortisolo e cortisolo ed esprimendole come rapporto (Shibuya *et al.*, 2003).

### **Famiglia CYP4**

La sottofamiglia CYP4A rappresenta una delle 18 sottofamiglie che costituiscono la famiglia del CYP4 e consiste di 20 isoforme, presenti in 9 differenti specie di mammiferi (ratto, coniglio, uomo, topo, hamster, cavia, koala, gatto e maiale: Okita e Okita, 2001). I CYP appartenenti a questa famiglia partecipano alla  $\omega$ -idrossilazione delle prostaglandine e degli acidi grassi saturi ed insaturi, nonché al metabolismo del colesterolo. I geni più studiati di questa famiglia sono quelli che codificano per il CYP4A1, CYP4A2 e CYP4A3 nel ratto e sono espressi prevalentemente a livello epatico e renale (Simpson, 1997).

Alcune isoforme del CYP4A possono essere indotte da un gruppo eterogeneo di composti, noti come “*peroxisome proliferators*” che comprendono agenti ipolipidemizzanti come i fibrati, i plasticizzanti (ftalati), i solventi, i lubrificanti, gli erbicidi, gli antinfiammatori non steroidei (ibuprofene ed aspirina) ed il deidroepiandrosterone (DHEA); l’induzione avviene mediante l’interazione di un recettore nucleare denominato *peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$*  (PPAR $\alpha$ ) che forma un eterodimero con il recettore RXR.

Inoltre, esistono delle sostanze in grado di inibire l’espressione del CYP4A nel fegato di topo, quali i lipopolisaccaridi (LPS), gli antagonisti dei canali del calcio e l’interleuchina 1 $\beta$  (Okita e Okita, 2001).

Le attività catalitiche che solitamente vengono utilizzate per valutare il coinvolgimento del CYP4A sono l’ $\omega$ -idrossilazione dell’acido laurico, l’idrossilazione in posizione 19 o 20 dell’acido arachidonico o l’eossigenasi dell’acido arachidonico stesso in posizione 11, 12. Hoch *et al.* (2000) hanno dimostrato che tra le varie isoforme espresse nel ratto, il CYP4A1 è quello che presenta il più elevato turnover per l’acido arachidonico e l’acido laurico. L’attività di idrossilazione dell’acido laurico è stata già utilizzata anche nel bovino, ma questa specie sembra catalizzare questa reazione in maniera meno rilevante rispetto al ratto nonché ad altre specie da reddito come capra, maiale e pecora (Sivapathasundaram *et al.*, 2001; Szotáková *et al.*, 2004). L’uso dell’immunolettroforesi ha permesso di individuare questa proteina in ratto e bovino, mediante l’utilizzo di un anticorpo anti-CYP4A1 di ratto, ma anche in questo caso è stata evidenziata un’espressione differenziale nelle due specie sopra citate, confermando quanto visto per l’attività catalitica (Sivapathasundaram *et al.*, 2001).

| <b>CYP</b>   | <b>Attività catalitica marker</b>  | <b>Induttori</b>  | <b>Inibitori</b>                                       |
|--------------|--|---|--|
| <b>CYP1A</b> | 7-etossiresorufina <i>O</i> -deetilasi<br>7-metossiresorufina <i>O</i> -deetilasi<br>Benzo[a]pirene idrossilasi  | PAHs<br>Omeprazolo<br>$\beta$ -naftoflavone<br>3-metilclorantrene<br>(3MC)          | Furafillina<br>$\alpha$ -naftoflavone                  |
| <b>CYP2A</b> | Etossicumarina <i>O</i> -deetilasi<br>Curarina 7-idrossilasi   | Rifampicina<br>Barbiturici  | 8-metossipsoralene<br>Metoxalene                       |
| <b>CYP2B</b> | Benzfetamina <i>N</i> -demetilasi<br>7-benzilossiresorufina <i>O</i> -deetilasi<br>Testosterone 16 $\alpha$ idrossilasi<br>Testosterone 16 $\beta$ idrossilasi<br>7-pentossiresorufina <i>O</i> -deetilasi | Barbiturici<br>PB<br>Antimicotici<br>Fenotiazine                                    | Ticlopidine<br>Thiotepa                                |
| <b>CYP2C</b> | Aminopirina <i>N</i> -demetilasi<br>Testosterone 2 $\alpha$ , 2 $\beta$ , 15 $\alpha$ , 15 $\beta$<br>idrossilasi<br>Tolbutamide metil-idrossilasi   | Barbiturici<br>PB<br>Antimicotici<br>Fenotiazine                                    | Sulfafenazolo<br>Acido tienilico<br>fluvoxamina        |
| <b>CYP2D</b> | Debrisoquina 4-idrossilasi<br>Bufurarolo 1-idrossilasi<br>Destrometorfano <i>O</i> -demetilasi   | ?   | Chinina<br>Chinidina                                   |
| <b>CYP2E</b> | <i>p</i> -nitrofenolo idrossilasi<br>Anilina idrossilasi<br>Cloroxazone 6-idrossilasi<br>Dimetilnitrosamina <i>N</i> -demetilasi<br>Acido laurico-11 idrossilasi   | Isoniazide<br>Etanolo<br>Acetone  | Dietilditiocarbammato<br>Disulfiram<br>4-metilpirazolo |
| <b>CYP3A</b> | Etilmorfina <i>N</i> -demetilasi<br>Eritromicina <i>N</i> -demetilasi<br>Triacetiloleandomicina <i>N</i> -<br>demetilasi<br>Testosterone 6 $\beta$ e 2 $\beta$ idrossilasi                                 | DEX<br>PB<br>Fenitoina<br>Rifampicina<br>pregnenolone 16 $\alpha$ -<br>carbonitrile | Ketoconazolo<br>Eritromicina                           |
| <b>CYP4A</b> | Acido laurico 12-idrossilasi   | Clofibrati  | LPS  |

Tabella 1.3.1: Attività catalitiche, induttori ed inibitori specifici impiegati per valutare il coinvolgimento dei singoli CYP in uomo, specie da laboratorio e animali da reddito.

#### 1.4. Gli enzimi coniugativi

Gli enzimi di fase II consistono di molte superfamiglie di enzimi che includono le solfotransferasi (SULT), le UDP-glucuroniltransferasi (UGT), le DT-diaforasi o NAD(P)H:chinone ossidoriduttasi o NAD(P)H:menadione riduttasi, le epossido idrolasi, le glutatione-S-transferasi (GST) e le N-acetiltransferasi (Xu *et al.*, 2005). Ogni superfamiglia a sua volta è costituita da famiglie e sottofamiglie di geni che codificano per le varie isoforme, caratterizzate da differente specificità di substrato, diversa modulazione da parte di composti induttori ed inibitori, nonché da diversa distribuzione in organi e tessuti.

In generale, la coniugazione mediata dagli enzimi di fase II porta ad un aumento dell'idrofilicità, ad una maggior escrezione nella bile e/o nelle urine e conseguentemente alla diminuzione del potenziale effetto tossico dei composti parenterali o dei loro metaboliti. Tuttavia, in determinate situazioni, la coniugazione può portare all'opposto anche ad una attivazione del metabolita e ad un aumento dell'effetto tossico (Xu *et al.*, 2005).

La glucuronazione è una delle vie metaboliche di coniugazione maggiormente coinvolte nel metabolismo e nell'escrezione di composti endogeni ed esogeni. Questa reazione è catalizzata dalla superfamiglia di enzimi denominati UGT. Sebbene la glucuronazione sia comunemente nota come un meccanismo di detossificazione, in letteratura ci sono molti esempi di metaboliti glucuronidati attivi o con attività tossica (Burchell e Coughtrie, 1989). Le UGT catalizzano il trasferimento di parte dell'acido glucuronico dal co-substrato UDP-acido glucuronico al substrato, producendo così un metabolita dotato di maggior polarità e solubilità in acqua. Esistono molte isoforme di UGT e 18 sequenze di cDNA sono state finora clonate a partire da fegato di uomo (Burchell, 2003).

Le UGT sono delle proteine legate alla membrana, che si rinvencono nelle frazioni subcellulari microsomiali. Il dominio catalitico di questi enzimi si affaccia nel lume del reticolo endoplasmatico e per questo motivo le preparazioni microsomiali richiedono l'attivazione con detergenti prima della valutazione dell'attività biochimica specifica.

La nomenclatura dei singoli isoenzimi appartenenti a questa superfamiglia è basata sulla struttura genica e sull'omologia di sequenza. Si conoscono infatti due famiglie di UGT, UGT1 e UGT2, che comprendono più di 35 isoenzimi, presenti in molte specie. I membri della famiglia UGT1 nell'uomo sono il prodotto di un unico gene localizzato sul cromosoma 2, costituito da 4 esoni comuni e da almeno 13 esoni variabili che derivano da uno *splicing* alternativo dell'esone 1, mentre i membri della famiglia UGT2 sono il prodotto di diversi geni individuali, appartenenti ad un unico *cluster* localizzato sul cromosoma 4 nell'uomo. La sottofamiglia UGT2B invece include le isoforme UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11, UGT2B15, UGT2B17 e UGT2B28 ed alcuni pseudogeni recentemente scoperti (Nagar e Remmel, 2006).

Gli enzimi UGT sono differenzialmente espressi sia nel fegato sia in tessuti extraepatici.

Mentre le isoforme appartenenti alla famiglia 1 riconoscono come substrati la bilirubina, le amine ed i fenoli, e possono coniugare anche alcuni farmaci come analgesici, ormoni sessuali, chemioterapici e cancerogeni

ambientali come i PHAs, quelle della famiglia 2 presentano un ampio spettro di substrati che includono steroidi, acidi biliari ed oppioidi (You, 2004).

Nell'organismo umano, molti sono gli xenobiotici che vengono sottoposti a glucuronidazione, ma in molti casi non in modo selettivo e specifico: anche le varie isoforme di UGT, cosiccome i CYP, infatti presentano una sovrapposizione di specificità nei confronti di vari substrati. Per esempio, l'acetaminofene è un substrato fenolico di molti isoenzimi UGT1A e UGT2B, ed altri fenoli semplici come il *p*-nitrofenolo, l' $\alpha$ -naftolo e il 4-metilumbelliferone sono comunemente usati per determinare l'attività totale delle UGT nei tessuti. L'unica eccezione è data dalla bilirubina che viene quasi esclusivamente coniugata da UGT1A1. L'UGT1A6 invece catalizza la glucuronazione di piccoli fenoli planari e di amine aromatiche (Nadar e Remmel, 2006).

In quasi tutte le isoforme di UGT sono stati individuati dei polimorfismi genetici, che pregiudicano la farmacocinetica e la farmacodinamica di molti composti usati a scopo terapeutico, ma anche funzioni fisiologiche: a tal proposito, l'isoforma UGT1A1, principalmente coinvolta nella coniugazione della bilirubina, può presentare nell'uomo delle mutazioni che portano a iperbilirubinemia, sintomo alla base della sindrome di Gilbert (Nadar e Remmel, 2006).

I membri della famiglia UGT2B (6 isoforme nell'uomo) invece sono molto più specifici nei confronti degli ormoni steroidei. L'isoforma UGT2B17 nell'uomo infatti, è una delle isoforme appartenenti alla sottofamiglia UGT2B, che presenta la maggior affinità nei confronti degli steroidi a 19 atomi di carbonio, come il diidrotosterone (DHT), il TST, l'androsterone e l'androstano-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, nonché i glucocorticoidi ed i mineralcorticoidi. Sebbene sia il fegato l'organo che presenta la maggior espressione dell'UGT2B, la glucuronidazione degli steroidi può avvenire anche in tessuti extraepatici, come cute, ghiandola mammaria, prostata e tessuto adiposo, giocando così un ruolo nella regolazione della disponibilità di steroidi biologicamente attivi nei tessuti bersaglio.

Le UGT sono suscettibili all'inibizione da parte di una varietà di composti naturali e sintetici. Alcuni fattori di crescita sono in grado di inibire l'espressione dell'UGT2B, mentre molti farmaci e contaminanti ambientali inibiscono in misura diversa le attività delle UGT nei confronti degli steroidi. L'espressione delle UGT può anche essere indotta da xenobiotici come il pregnenolone 16 $\alpha$ -carbonitrile (PCN), il 3MC e l'Aroclor 1254, i quali determinano un aumento dell'espressione di diverse isoforme di UGT a livello di mRNA nel fegato di ratto; inoltre è stato evidenziato che nella stessa specie l'espressione dell'UGT2B1, una delle maggiori isoforme coinvolte nel metabolismo degli steroidi, subisce un incremento a seguito del trattamento con PCN e PB (You, 2004).

Le GST sono anch'esse costituite da una superfamiglia di proteine multifunzionali che svolgono dei ruoli fondamentali nella detossificazione di un ampio *range* di composti endogeni ed esogeni. In piante ed animali, le GST rappresentano i principali enzimi di fase II coinvolti nel metabolismo. La loro funzione chimica principale è quella di catalizzare la coniugazione del tripeptide glutatione con composti che contengono una porzione elettrofilica, in modo tale da sintetizzare un derivato più solubile e non tossico, pronto ad essere escreto da un trasportatore di fase III. Le GST inoltre possono svolgere il ruolo di perossidasi, isomerasi e tiolo-transferasi oppure addirittura non avere attività catalitica, ma di modulazione

dei processi di biosintesi di leucotrieni e prostaglandine, nonché di catabolismo degli aminoacidi aromatici (Frova, 2006).

Si conoscono tre principali sottofamiglie di GST, ognuna codificata da una distinta famiglia multigenica: le GST solubili o citosoliche (definite anche canoniche da alcuni autori), le GST microsomiali ora definite come MAPEG (proteine di membrana coinvolte nel metabolismo del glutatione e degli eicosanoidi) e le GST fosfomicina-resistenti codificate da plasmidi batterici (Frova, 2006). Recenti evidenze sperimentali hanno suggerito che la famiglia Kappa, dapprima classificata come appartenente alle GST citosoliche, costituisca invece una famiglia a se stante. Inoltre, tra le GST microsomiali sono state identificate delle GST con struttura primaria e terziaria molto più simili alla classe Alpha che alle MAPEG (Frova, 2006). In questo capitolo verranno però trattate solo le GST citosoliche, in quanto le altre isoforme non svolgono un ruolo rilevante nel contesto scientifico della presente tesi.

La sottofamiglia delle GST citosoliche è ubiquitaria e si rinviene in tutti gli organismi aerobi; è in assoluto la più abbondante e conta almeno decine di membri in ogni specie. Ad oggi, nell'uomo e nei mammiferi sono stati identificati 15-20 geni diversi, nelle piante 40-60, nei batteri 10-15 e negli insetti più di 10. Sulla base dell'identità aminoacidica/nucleotidica, struttura del gene (posizione e numero degli introni) e proprietà immunoreattive, le GST citosoliche sono state suddivise in numerose classi, alcune comuni a più taxa e regni, altre specie-specifiche. Attualmente nei mammiferi si conoscono sette classi, denominate Alpha, Mu, Pi, e le comuni Sigma, Theta, Zeta ed Omega. La maggior parte delle GST citosoliche sono attive come dimeri, sia identici (omodimeri) sia differenti (eterodimeri), ma ciascun membro è codificato da un singolo gene. L'eterodimerizzazione tuttavia è ristretta alle subunità della stessa classe, perché monomeri di classi differenti non sono in grado di dimerizzare per l'incompatibilità dei residui posti nella regione di interfaccia (Frova, 2006).

Il completamento di molti progetti di sequenziamento genomico e lo sviluppo di potenti programmi bioinformatici, hanno permesso di analizzare estensivamente il genoma e di costruire la mappa di distribuzione di questi geni nel genoma stesso: molte GST formano dei *cluster* compatti, preferenzialmente della stessa classe (i geni codificanti per le classi Alpha, Mu e Theta umane e Pi di topo sono tutti raggruppati in specifiche e limitate regioni cromosomiche).

Le GST citosoliche comunque presentano una sovrapposizione di specificità di substrato; per determinare l'attività catalitica generale di tutte le classi viene utilizzato come substrato l'1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), mentre per valutare l'attività specifica della classe Mu in ratto, topo, uomo e coniglio viene usato il 3,4-dicloronitrobenzene (DCNB), l'acido etacrinico per la classe Pi in ratto, uomo, topo e bovino, l'1,2-epossibutano per la classe theta in uomo, topo e ratto (Gusson *et al.*, 2006).

Infine, le SULT sono degli enzimi di fase II coinvolti nella biotrasformazione di composti sia endogeni sia esogeni, che includono molti agenti terapeutici e steroidi endogeni. Sono prevalentemente citosoliche, anche se esistono delle isoforme di membrana responsabili della solfatazione dei residui proteici di tirosina e dei polisaccaridi, che però sono geneticamente distinte dalle prime e che non verranno descritte (Nowell e Falany, 2006).

Le SULT appartengono ad una superfamiglia di geni, suddivisa in due sottofamiglie: le SULT specifiche per i fenoli (SULT1) e quelle specifiche per gli idrossisteroidi (SULT2); ne è stata descritta anche una terza, specifica per il cervello. Le SULT sono ampiamente distribuite ed espresse nell'organismo (fegato, polmone, cervello, cute, piastrine, ghiandola mammaria, rene ed apparato gastrointestinale). La loro funzione biologica è quella di catalizzare il trasferimento del gruppo sulfonile dal 3-fosfoadenosin-5-fosfosolfato ai gruppi ossidrilico, solfidrilico, aminico o N-ossido dei vari substrati. Anche questi enzimi presentano una sovrapposizione nella specificità di substrato, ma possono essere distinte in qualche modo in base alla loro affinità per i substrati, la loro stabilità termica e la sensibilità all'inibizione da parte di vari composti. Al momento attuale sono state identificate almeno 11 differenti isoforme di SULT (Nowell e Falany, 2006).

La SULT1A1 è l'isoforma maggiormente espressa a livello epatico ed è in grado di coniugare un elevato numero di xenobiotici fenolici, nonché le iodotironine, il metabolita anti-angiogenico dell'estrogeno, il 2-metossiestradiolo (solo a concentrazioni fisiologiche), nonché altri estrogeni (a concentrazioni micromolari). La SULT1E1 dal canto suo invece è responsabile della regolazione della risposta agli estrogeni a concentrazioni fisiologiche.

La SULT1A1 catalizza anche la solfatazione di composti rinvenuti nell'ambiente, in particolare quelli prodotti nella carne cotta ad alte temperature. In questo caso la solfatazione, invece di servire come meccanismo di detossificazione, genera delle specie reattive dell'ossigeno capaci di formare degli addotti con macromolecole cellulari come il DNA, che, se non riparato, può dare l'avvio a processi di cancerogenesi. Nei roditori, ma non nell'uomo, è stato dimostrato che l'espressione della SULT1A1 è modulata dai glucocorticoidi per mezzo del recettore specifico per i glucocorticoidi (GR: Nowell e Falany, 2006).

La SULT2A1 invece è la maggiore isoforma delle SULT coinvolta nella sintesi di esteri solfato degli steroidi, ed è in grado di coniugare sia  $3\alpha$  e  $3\beta$  idrossisteroidi, sia estrogeni, TST e xenobiotici alifatici contenenti gruppi idrossilici. E' l'isoforma responsabile della sintesi del DHEA-solfato sia nel surrene fetale sia nella corteccia surrenalica dell'adulto; è espressa ad alti livelli nel fegato e catalizza la coniugazione di acidi biliari e degli xenobiotici introdotti con la dieta.

### 1.5. Fattori in grado di modulare l'espressione degli enzimi biotrasformativi

I fattori che complessivamente modulano la capacità biotrasformativa sono di notevole interesse generale, nonostante gli studi concernenti questo aspetto siano tuttora molto limitati negli animali domestici. Differenze nell'espressione degli enzimi biotrasformativi soprattutto a livello epatico, sede elettiva delle principali reazioni di biotrasformazione, giustificano infatti le variazioni nell'entità del processo biotrasformativo degli xenobiotici che si riscontrano in specie e razze diverse nonché tra singoli individui. Il contenuto totale di CYP, la maggiore o minore espressione delle diverse isoforme di quest'ultimo nonché l'eventuale presenza di geni polimorfici dipendono principalmente dalla costituzione genetica e dall'eventuale precedente esposizione a xenobiotici (inclusi farmaci e sostanze fitotossiche), dalla dieta nonché da condizioni fisio-patologiche particolari (Sivapathasundaram *et al.*, 2003a).

Le informazioni tuttora disponibili a questo proposito nelle specie da laboratorio e di interesse veterinario sono rappresentate da differenze specie-specifiche (Machala *et al.*, 2003; Nebbia *et al.*, 2003; Szotáková *et al.*, 2004), ontogenetiche (Gorski *et al.*, 2003; Nebbia *et al.*, 2004; Wauthier *et al.*, 2007), legate alla razza (Dacasto *et al.*, 2005; Giantin *et al.*, 2006), al sesso (Kedderis e Mugford, 1998; Bogaards *et al.*, 2000; Dacasto *et al.*, 2005) ed a condizioni fisio-patologiche (Gómez-Lechón, 2004; He *et al.*, 2005a e 2005b).

Tra i fattori intrinseci in assoluto più studiati annoveriamo le differenze specie-specifiche, in particolare la diversa suscettibilità nei confronti di vari composti tossici. Infatti, la minor espressione di un particolare enzima coinvolto in una determinata via biotrasformativa può rendere una specie più suscettibile rispetto ad un'altra nei confronti di un certo composto. Per esempio, nell'ambito della tossicologia veterinaria è noto che il gatto, carente dell'attività di glucuronidazione, dimostra una spiccata sensibilità nei confronti di molti antinfiammatori non steroidei, come per esempio il paracetamolo (Clarke *et al.*, 1981).

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

D'altra parte, anche gli effetti della razza sono stati ampiamente evidenziati nella specie umana: differenze nel metabolismo dei chemioterapici e nel conseguente tasso di sopravvivenza correlato sono state infatti evidenziate in donne, affette da tumore al seno, appartenenti a razze differenti (Flaws e Bush, 1998); tali differenze in molti casi sono state ascritte a polimorfismi genetici nella sequenza degli enzimi biotrasformativi e dei recettori che controllano la loro espressione (Nebert e Roe, 2000).

Assumono inoltre molta importanza anche i fattori (imputabili allo xenobiotico) quali l'induzione e l'inibizione enzimatica, che possono comportare tanto modulazioni nel pattern biotrasformativo quanto l'instaurarsi di interazioni farmacologiche (*drug-drug interactions*) anche potenzialmente pericolose.

In generale per induzione si intende un aumento della quantità e/o dell'attività metabolica, a seguito di una singola o ripetuta esposizione ad un composto endogeno o esogeno, che determina quindi una variazione

adattativa della capacità di metabolizzazione da parte dell'organismo vivente (Pelkonen, 2004). Classicamente, il termine induzione enzimatica indica la sintesi *ex novo* della proteina, come risultato dell'aumentata trascrizione dei relativi geni codificanti o come diminuzione del suo catabolismo; per contro, l'inibizione identifica l'esatto contrario. Nei meccanismi di induzione possono essere coinvolti anche la stabilizzazione della proteina o quella dell'RNA (Nebbia., 2001); ad esempio, l'induzione dell'isoforma CYP2E1 nell'uomo da parte dell'isoniazide e dell'etanolo è il risultato della stabilizzazione proteica e dell'incremento della traslazione (Park *et al.*, 1993).

Il meccanismo principale attraverso cui gli xenobiotici provocano l'induzione degli enzimi biotrasformativi è dato dall'interazione con specifici recettori nucleari, che rappresentano un'ampia famiglia di fattori di trascrizione, la cui attivazione dipende dal legame con uno specifico ligando. Questi recettori aumentano la trascrizione dei geni codificanti per gli enzimi farmaco-metabolizzanti, interagendo con le loro sequenze *promoter* ed *enhancer* (Nakata *et al.*, 2006). Questo meccanismo verrà descritto più in dettaglio nel prossimo capitolo.

Molto spesso le sostanze inducenti sono anche substrati degli stessi isoenzimi; si deve però sottolineare che non tutti i substrati sono degli induttori, ed è per questo motivo che si preferisce separare i substrati specifici dagli induttori specifici, anche se nel caso del CYP, delle UGT e delle GST, è spesso difficile parlare di specificità di substrato in senso assoluto, in quanto molte molecole possono essere metabolizzate da più famiglie anche se in maniera differente (*substrate overlapping*).

L'induzione enzimatica incide molto sul metabolismo degli xenobiotici ma non in maniera subitanea; questo processo infatti è relativamente lento e richiede somministrazioni ripetute per ottenere il massimo effetto, che comunque è facilmente reversibile; inoltre, il tempo richiesto per l'induzione varia a seconda dell'induttore stesso. Ad esempio, la rifampicina incrementa *in vivo* i livelli dei CYP3A4, CYP1A2 e CYP2C entro 24 ore dalla somministrazione, mentre l'induzione mediata da PB richiede almeno una settimana prima di divenire apparente (Yan e Caldwell, 2001).

Al contrario, l'inibizione è un fenomeno immediato che può essere tanto reversibile quanto irreversibile; rappresenta peraltro un valido strumento negli studi *in vivo* ed *in vitro*, in quanto permette di discriminare l'isoforma maggiormente coinvolta nel metabolismo di uno xenobiotico, o responsabile dell'eventuale attività tossicologica.

L'inibizione reversibile è spesso causa di diverse interazioni farmacologiche e si riscontra quando si realizza una competizione diretta tra il substrato e l'inibitore per il legame con il gruppo prostetico eme o con altre regioni del sito attivo dell'enzima (Yan e Caldwell, 2001); uno dei primi esempi di questo meccanismo è quello della cimetidina (Furuta *et al.*, 2001).

La generazione di metaboliti reattivi, conseguenza delle reazioni enzimatiche catalizzate dal CYP, è invece causa di una possibile comparsa di un'inibizione irreversibile: i composti così attivati sono in grado di legarsi stabilmente al gruppo eme, inattivandolo e precludendone la rigenerazione (Yan e Caldwell, 2001); l'inibizione del CYP3A da parte dell'eritromicina è un classico esempio di questo meccanismo inibitorio (Zweers-Zeilmaier *et al.*, 1998).

Un'inibizione irreversibile del CYP può altresì comparire in seguito all'interazione degli isoenzimi con un composto intermedio reattivo, in grado di legarsi covalentemente con il gruppo prostetico e distruggerlo; tra questi composti si annoverano l'etinilestradiolo (Kent *et al.*, 2002), il cloramfenicolo (Miller e Halpert, 1986) e lo spironolattone (Decker *et al.*, 1986).

In conclusione, le conseguenze dei fenomeni di induzione ed inibizione enzimatica dipendono dalla natura del metabolita prodotto; nel caso in cui la biotrasformazione di un farmaco esiti nella produzione di un metabolita inattivo, il fenomeno dell'induzione determinerà una riduzione del suo effetto farmacologico, mentre l'inibizione ne darà un aumento (Pelkonen, 2004).

## 1.6. Regolazione dell'espressione degli enzimi biotrasformativi

La variabilità dell'espressione degli enzimi biotrasformativi a seconda dell'organo e del tessuto sottolinea alquanto la complessità dei meccanismi coinvolti nella loro regolazione che tuttora, per alcuni enzimi, rimane solo ipotetica. Recentemente però, sono stati effettuati molti passi in avanti in merito alle conoscenze sui meccanismi di regolazione.

Come è stato in parte descritto nel capitolo precedente, l'espressione degli enzimi biotrasformativi è potenzialmente soggetta ad una serie di meccanismi che possono intervenire a diversi livelli: pre-trascrizionale, post-trascrizionale e post-traduzionale.

Per quanto riguarda la regolazione a livello pre-trascrizionale è stato dimostrato che molti recettori nucleari, quali l'AhR ed i cosiddetti recettori "orfani" (per le iniziali scarse conoscenze sui loro ligandi specifici), rappresentano i meccanismi chiave nei processi di modulazione xenobiotico-mediata degli enzimi di fase I e II; è noto infatti come i geni appartenenti alla famiglia CYP1 possano essere indotti a seguito dell'interazione con AhR, che dimerizza con l'Arnt in risposta a molti PAHs. Questo meccanismo di regolazione gioca un ruolo fondamentale nel metabolismo e nella *clearance* di contaminanti ambientali potenzialmente pericolosi per l'organismo (Wang e LeCluyse, 2003). L'*aryl hydrocarbon receptor* appartiene alla superfamiglia dei fattori di trascrizione "*basic-helix-loop-helix* (bHLH)-*Per-Arnt-Sim*" ed è in grado di riconoscere un ampio *range* di xenobiotici diversi, che comprendono composti non aromatici e non alogenati. E' un gene altamente polimorfico, il cui motivo bHLH (esistente in molti fattori di trascrizione) è altamente sequenza-specifico; questo motivo gioca un ruolo importante sia nel legame al DNA (regione basale) sia nella dimerizzazione proteica (HLH: Huang *et al.*, 2004). L'AhR, in assenza di ligando, è localizzato a livello citoplasmatico ed è complessato con una proteina (Hsp90), che previene la traslocazione nel nucleo, mentre a seguito dell'interazione con un ligando specifico entra nel nucleo, dove dimerizza con l'Arnt: il complesso così generato presenta una maggior affinità per il DNA ed una minore capacità di dissociarsi dal composto (Hahn, 2002), si lega alla sequenza *enhancer* definita *drug response elements* o *dioxin response elements*, posta a monte della sequenza dei geni *target* (per esempio il CYP1A) e ne determina la trascrizione (Nakajima *et al.*, 2003).

I recettori orfani invece sono una sottoclasse dei recettori nucleari a cui si legano molecole quali cortisolo, estradiolo, progesterone, aldosterone, TST e vitamina D. Tutti i recettori orfani conosciuti presentano due domini modulatori, di cui uno è il *DNA binding domain* (DBD) altamente conservato, mentre l'altro è il *ligand-binding domain* (LBD: Wang e LeCluyse, 2003). Il DBD permette il legame del recettore alla specifica regione promotrice dei geni *target*, definita come *hormone response element* (HRE) o *xenobiotic response element* (XRE), contenenti delle specifiche sequenze di 6 basi nucleotidiche ripetute (motivi) ma separate da una piccola serie di basi. I recettori orfani si possono legare al DNA come omodimeri, come eterodimeri con RXR o come monomeri. Il LBD invece è localizzato nella porzione carbossi-terminale della sequenza aminoacidica; non ha solo la funzione di fornire il sito di legame per il ligando, ma contiene anche i motivi di dimerizzazione, quali i domini di attivazione della trascrizione e la sequenza che media la

localizzazione nucleare del recettore. Il legame con il ligando determina un cambiamento conformazionale del LBD, determinando il reclutamento di cofattori e la trans-attivazione dei geni *target* (Wang e LeCluyse, 2003).

In questa famiglia di recettori orfani possiamo annoverare il CAR ed il PXR, i quali formano degli eterodimeri con l'RXR ed a seguito dell'interazione con composti quali PB, DEX e rifampicina, sono in grado di attivare la trascrizione dei geni CYP2B e CYP3A, rispettivamente.

Una recente classificazione ha denominato il PXR come NR1I2; è un recettore prevalentemente espresso nel fegato e nell'intestino, ed in minor grado in rene e polmone. La sequenza aminoacidica presenta nel DBD più del 95% di omologia tra specie diverse, mentre il LBD solo il 75-80% (Wang e LeCluyse, 2003).

Analisi bioinformatiche hanno dimostrato che i *PXR response elements* sono localizzati nella regione promotrice del CYP3A ed infatti è stato accertato che il PXR può legare gli induttori specifici del CYP3A anche se con una affinità diversa a seconda della specie: la rifampicina infatti, noto induttore del CYP3A in uomo e coniglio ma non in ratto e topo, è appunto un buon attivatore del PXR in uomo e coniglio ma non nelle altre due specie (Jones *et al.*, 2000).

Il CAR (NR1I3), invece, è stato inizialmente definito come costitutivo in quanto, a seguito del legame con RXR, era in grado di legarsi alle sequenze *retinoid acid response elements* in assenza di ligando (Honkakoski *et al.*, 1998). E' espresso soprattutto a livello epatico ed è meno abbondante nell'intestino. Recentemente è stato evidenziato che due metaboliti dell'androstano, androstanolo e androstenolo, rappresentano due ligandi endogeni del CAR, ma agiscono come antagonisti dissociandolo dai cofattori ed inibendone la transattivazione (Pascussi *et al.*, 2003). Solitamente in assenza di ligando, è localizzato nel citoplasma ed è poi traslocato nel nucleo a seguito del trattamento con composti *PB-like*, induttori del CYP2B. Studi recenti hanno indicato però che l'attivazione di CAR è un processo caratterizzato da diverse fasi, in cui lo *step* iniziale è caratterizzato dalla traslocazione a livello nucleare, anche indipendentemente dall'interazione con il ligando, mentre lo *step* finale invece consiste in un'attivazione Calcio-calmodulina chinasi-dipendente (Wang e LeCluyse, 2003).

Honkakoski e Negishi (1997) hanno dimostrato che il CAR può legare una regione di 51 bp localizzata a monte della regione in 5' del gene CYP2B: questa sequenza infatti è indispensabile per l'induzione da PB e per questo viene definita *phenobarbital response element module* (PBREM).

Per quanto riguarda invece RXR, esistono tre membri appartenenti a questa famiglia: RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  e RXR $\gamma$ . Il RXR $\alpha$  è espresso prevalentemente in fegato, muscolo, rene e polmone ed a livelli più bassi in milza, cuore e surrene; il RXR $\beta$  è espresso in tutti i tessuti, eccetto fegato e intestino ed infine il RXR $\gamma$  è stato rinvenuto in pochi tessuti, quali muscolo scheletrico, cuore e sistema nervoso centrale (Wang e LeCluyse, 2003). Questo recettore presenta un'elevata affinità con il metabolita 9-*cis*-acido retinico della vitamina A.

L'RXR può formare degli eterodimeri con altri recettori nucleari noti e questa interazione risulta essere uno *step* critico nel loro legame con il DNA e nella loro attivazione. Esistono due tipi di eterodimeri con RXR: non permissivi e permissivi. Nel caso di eterodimeri non permissivi RXR rimane completamente silente e

può essere attivato solo da ligandi specifici per il recettore *partner*, nell'altro caso invece, può essere tranquillamente attivato da ligandi specifici sia per RXR sia per gli altri recettori nucleari.

Anche il PPAR, uno dei primi membri della famiglia dei recettori nucleari ad essere caratterizzati, dimerizza con RXR ed a seguito di questa interazione e del legame con lipidi e/o composti come i clofibrati, determina l'attivazione trascrizionale della regione promotrice del CYP4A (Xu *et al.*, 2005). Ad oggi, sono stati identificati tre membri appartenenti a questa famiglia di recettori: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  e PPAR $\gamma$ . Il PPAR $\alpha$  è espresso soprattutto in fegato, cuore, rene, intestino e tessuto adiposo bruno; il PPAR $\beta$  invece è espresso soprattutto negli individui adulti in quasi tutti i tessuti, ma la più elevata espressione si rinviene in cervello, rene e intestino; infine, PPAR $\gamma$  è presente in milza, intestino e adipociti e comprende due isoforme, denominate PPAR $\gamma$ 1 and PPAR $\gamma$ 2. I recettori PPAR dimostrano nel complesso delle funzioni fisiologiche distinte ma in alcuni casi sovrapposte. Sono attivati da un cambiamento conformazionale della struttura a seguito dell'interazione con il ligando specifico e poi si legano a delle regioni di DNA poste a monte rispetto ai geni *target* (CYP4A) definite come *peroxisome proliferator response elements*. All'inizio era stato evidenziato che PPAR $\alpha$  poteva essere attivato da composti che determinavano nel fegato di roditori proliferazione dei perossisomi, iperplasia e cancerogenesi, anche se in seguito, invece, è stato ipotizzato che i PPAR svolgessero un ruolo cruciale nella regolazione del metabolismo delle lipoproteine e degli acidi grassi (Yu *et al.*, 2003).

Le regioni definite come *response elements*, specifiche per i differenti enzimi di fase I possono essere attivati però da più di un solo recettore nucleare e questo fenomeno è comunemente definito come “*cross-talk*”.

Studi recenti hanno infatti dimostrato che il PXR può legarsi alle regioni PBREM localizzate a monte della regione 5' del CYP2B (Pascussi *et al.*, 2003): il DEX infatti, noto ligando del PXR nel topo ed induttore del CYP3A, può indurre l'espressione del CYP2B10 negli epatociti (Wang e LeCluyse, 2003). Negli epatociti umani inoltre, tutti gli attivatori del PXR come rifampicina, PB, fenitoina e clotrimazolo (un attivatore del PXR e deattivatore del CAR) possono indurre in modo efficace i geni *reporter* regolati dal PBREM umano (Honkakoski *et al.*, 1998). Questo *cross-talk* avviene grazie ad una regione *enhancer* definita *xenobiotic responsive enhancer module* localizzata recentemente nella regione promotrice del CYP2B6, che permette il legame sia di PXR sia di CAR (Wang e LeCluyse., 2003) e che spiega quindi il coinvolgimento di PXR nella regolazione del CYP2B.

Anche l'espressione di CYP2C8 e CYP2C9 può essere modulata da attivatori del PXR, come la rifampicina, suggerendo anche in questo caso che la regione *PXR response element module* (PXREM) sia localizzata nella regione promotrice di questi due geni (Pascussi *et al.*, 2003), anche se al momento il meccanismo di regolazione del CYP2C rimane ancora scarsamente studiato. Nel coniglio per esempio, sembra che l'espressione del CYP2C sia regolata a livello epatico da un altro recettore orfano definito *hepatocyte nuclear factor 4* (HNF4: Honkakoski e Negishi, 2000). Questo recettore è espresso a livello epatico, renale, intestinale e pancreatico; gioca un ruolo importante nel controllo dell'espressione di geni codificanti per gli enzimi deputati al metabolismo degli acidi grassi, colesterolo, glucosio, nella biosintesi dell'urea e delle apolipoproteine e della differenziazione epatica (Akiyama e Gonzalez, 2003).

Sebbene CAR e PXR siano sempre stati definiti come modulatori specifici di CYP3A e CYP2B, rispettivamente, ad oggi quindi ci sono molte evidenze sperimentali che attestano come questi ruoli non siano in realtà così univoci. In generale, la regolazione pre-trascrizionale degli enzimi di fase I è multifaccettata e complessa: un singolo recettore nucleare può mediare l'induzione di molti geni *target* e, viceversa, un singolo gene può essere modulato nello stesso tempo da più recettori nucleari e ligandi (Xu *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda invece gli enzimi di fase II, nonostante siano stati ampiamente studiati, il meccanismo alla base della loro regolazione rimane ad oggi non molto chiaro. E' stato dimostrato che molti composti strutturalmente diversi come i PAHs, i barbiturici e molti chemioterapici naturali come gli antiossidanti fenolici, gli isotiocianati ed i flavonoidi, sono in grado di indurre gli enzimi di fase II (Xu *et al.*, 2005); studi successivi sulle regioni promotrici dei geni codificanti per questi enzimi, hanno rivelato la presenza di molti siti regolatori *cis*-attivanti, come l'*anti-oxidant responsive element* (ARE)/*electrophile response element* (EpRE), XRE/*aromatic hydrocarbon responsive element*, l'attivatore della proteina-1 e *nuclear factor-kappa B*, nella regione sita in 5' (Xu *et al.*, 2005). Recentemente, alcune evidenze sperimentali hanno suggerito e supportato il ruolo chiave delle regioni ARE/EpRE nella regolazione degli enzimi GST e UGT a seguito dell'interazione con i ligandi, quali gli antiossidanti fenolici ed alcuni chemioterapici (Xu *et al.*, 2005). Sono state proposte ed identificate molte proteine che si legano alle regioni ARE/EpRE, come Nrf1, Nrf2 e piccole proteine Maf, ma in particolare Nrf2 sembra presentare un ruolo centrale nella modulazione dei geni responsivi alla regione ARE, mediante il coinvolgimento delle *mitogen-activated protein chinasi* (Yu *et al.*, 2000).

Gli induttori degli enzimi di fase II solitamente modulano la risposta allo stress ossidativo, attivando Nrf2 che a sua volta dimerizza con le proteine Mafs e si lega così alla regioni promotrici ARE/EpRE.

Alla regolazione pre-trascrizionale degli enzimi coniugativi possono partecipare anche i recettori nucleari descritti in precedenza: infatti è stato dimostrato che il PB può indurre l'espressione di UGT1A1 (l'enzima responsabile della coniugazione e successiva detossificazione della bilirubina), grazie alla presenza di una regione *enhancer* contenente tre motivi putativi dei recettori nucleari, posta a monte di 290 bp rispetto alla sequenza e necessaria per l'induzione da PB mediante il coinvolgimento di CAR (Wang e LeCluyse, 2003). Inoltre, in ratti trattati con PB è stato evidenziato un incremento dell'mRNA specifico per UGT2B1, GSTA1, GSTA2, GSTA3 e GSTM1, anche se non sono state riconosciute sequenze PBREM nelle regioni promotrici di questi geni (Xu *et al.*, 2005).

Il 3MC, noto induttore delle isoforme enzimatiche appartenenti alla famiglia CYP1A mediante l'attivazione di AhR, è in grado di modulare anche l'espressione di UGT1A6, GSTA1, GSTA2 e GSTM utilizzando lo stesso meccanismo di regolazione, poiché tutti questi presentano la regione ARE nella sequenza promotrice (Xu *et al.*, 2005).

La regolazione dell'espressione degli enzimi biotrasformativi può avvenire anche a livello post-trascrizionale. Studi recenti infatti, hanno evidenziato che i microRNA, cioè piccole sequenze non codificanti

di RNA della lunghezza di circa 20 bp, sono in grado di legarsi a sequenze di mRNA complementare, determinando una diminuzione dell'espressione dei rispettivi geni *target* (Massirer e Pasquinelli, 2006).

I microRNA (miRNA) solitamente regolano i geni coinvolti in vari processi cellulari come la proliferazione, la morfogenesi, l'apoptosi e la differenziazione, ma recentemente è stato dimostrato che partecipano alla regolazione anche di alcuni geni coinvolti nel metabolismo.

Negli animali i miRNA vengono prodotti a partire da un trascritto primario noto come pri-miRNA, poi vengono trasformati prima in un precursore a forcina di circa 60 bp chiamato pre-miRNA ed infine nella forma matura della lunghezza di circa 22 bp; questi tagli consequenziali vengono effettuati da due enzimi RNasi III. Il miRNA maturo è così in grado di controllare l'espressione di un gene legandosi alla 3'-*untranslated region* (UTR) dell'mRNA, determinando una successiva degradazione da parte di una proteina, dell'RNA a doppio filamento formatosi.

Ad oggi, la regolazione miRNA-mediata degli enzimi biotrasformativi è stata dimostrata, in campioni neoplastici nell'uomo e per il CYP1B1 (Tsuchiya *et al.*, 2006). Questi autori hanno dimostrato che l'inibizione dell'espressione di un miRNA (miR-27b) complementare alla sequenza 3'-UTR del CYP1B1 determinava un aumento dell'espressione dello stesso enzima. Comunque, anche se ad oggi sono disponibili informazioni di questo tipo solo per il CYP1B1, è stato ipotizzato che anche altri importanti CYP possano subire la stessa modulazione. Basandosi infatti sul concetto che la regolazione mediante miRNA è più plausibile in geni che presentano una regione UTR di lunghezza elevata, Ingelman-Sundberg e collaboratori (2007), mediante analisi bioinformatica, hanno ipotizzato che nell'uomo altri CYP che, per la lunghezza della regione UTR, possano essere modulati dai miRNA, ed in particolare CYP1A2, CYP2B6, CYP2S1 e CYP3A4.

E' necessario comunque sottolineare che la regolazione dell'espressione degli enzimi biotrasformativi, oltre che a livello genico, può essere controllata anche a livello epigenetico, cioè in quella fase in cui processi chimici come per esempio la metilazione del DNA e l'acetilazione degli istoni non comportano cambiamenti nel codice genetico, ma alterano l'accessibilità fisica al genoma, modificando così il fenotipo dell'individuo e/o della progenie. La metilazione del DNA può avvenire solitamente secondo due differenti meccanismi: nel primo caso, la metilazione a livello delle porzioni nucleotidiche corrispondenti alle sequenze può impedire il legame di alcuni fattori di trascrizione con i corrispondenti siti di legame, mentre nel secondo la metilazione determina il silenziamento del DNA per cambiamenti nella conformazione cromatinica (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007). E' stato dimostrato che alcuni CYP risentono di cambiamenti conseguenti alla metilazione: in particolare, nell'uomo sono state individuate delle alterazioni aberranti nello stato di metilazione dei dinucleotidi CG (siti di metilazione presenti nel genoma dei mammiferi) nelle regioni *promoter* ed *enhancer* del gene CYP1B1 in caso di cancro alla prostata (Tokizane *et al.*, 2005); per contro, il CYP1A1 può essere silenziato dall'ipermetilazione (Okino *et al.*, 2006). E' stato inoltre notato che nell'uomo, oltre a CYP1A1 e CYP1B1, anche i geni CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 ed altri ancora, presentano nella sequenza nucleotidica dei potenziali siti di metilazione (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007).

Infine, non devono essere trascurati i meccanismi alla base della regolazione post-traduzionale.

Modificazioni che comprendono la fosforilazione, la glicosilazione e l'ubiquitinazione (legame covalente della proteina con uno o più monomeri di ubiquitina e conseguente degradazione della proteina stessa) sono stati descritti per il citocromo P450; tali modificazioni determinano o una potenziale modulazione dell'attività enzimatica, o una compartimentazione in siti cellulari definiti o una "etichettatura" per la successiva degradazione da parte del proteosoma (Aguiar *et al.*, 2005).

Recentemente, alcuni autori hanno dimostrato che la fosforilazione del CYP2E1 mediata dalla protein chinasi A, può portare o ad un aumento della sua degradazione o ad una marcata diminuzione delle attività catalitiche CYP2E-dipendenti senza però determinare un aumento della degradazione della proteina stessa. Gli stessi autori hanno evidenziato che anche il CYP2B può essere soggetto a questo tipo di modulazione (Oesch-Bartlomowics e Oesch, 2005).

Tuttavia i meccanismi di regolazione post-traduzionale non sono stati tuttora caratterizzati per molti CYP e dovranno necessariamente essere approfonditi in futuro: a questo scopo, l'utilizzo della proteomica permetterà di raccogliere ulteriori informazioni a questo riguardo.

### 1.7. Metodi alternativi *in vitro* (MAV) per lo studio del metabolismo degli xenobiotici

Si definisce MAV ogni metodo o procedura che permetta la sostituzione o la riduzione del numero di animali richiesti per l'esecuzione di un esperimento, nonché l'ottimizzazione di procedure sperimentali atte a limitarne comunque la sofferenza.

Nelle condizioni attuali, in cui la valutazione dei farmaci ad uso umano necessita dell'impiego di un numero sempre maggiore di animali da esperimento per i test di tossicità per nuovi composti e anche per quelli già in uso, la richiesta di sistemi *in vivo* sta raggiungendo livelli insostenibili (Paine, 1996). I test *in vitro* invece, evitano o riducono l'utilizzo di questi animali ed il loro potenziale è di gran lunga superiore rispetto ai sistemi *in vivo* (Wendel, 2002). I metodi *in vitro* sono ideali per lo studio dei meccanismi molecolari e cellulari fisiologici nonché quelli alla base della tossicità indotta da xenobiotici, che altrimenti non sarebbero facilmente valutabili *in vivo*; sono altresì impiegati per lo studio della tossicità in organi e specie *target* (Kniewald *et al.*, 2005). Per contro, gli studi di tossicità cronica richiesti per lo sviluppo di un nuovo farmaco sono generalmente eseguiti su due specie animali: un roditore ed un non roditore (per esempio, un canide o un primate).

I MAV trovano impiego per la messa a punto di saggi di *screening* di sostanze potenzialmente tossiche, la comprensione dei meccanismi di tossicità, lo studio del metabolismo e della biotrasformazione degli xenobiotici.

Offrono vantaggi come la rapidità, la riproducibilità ed il controllo della variabilità intra-test (Cinelli *et al.*, 1991); inoltre, non devono rispondere ad alcuna normativa sul benessere degli animali da esperimento, alle quali invece devono sottostare i test *in vivo* (Gruber e Hartung, 2004). Questi ultimi, per di più, a volte non sono esaustivi, poiché gli animali utilizzati per le sperimentazioni non vengono impiegati in maniera idonea: ad esempio, in certi casi, i soggetti a disposizione non vengono suddivisi in gruppi numericamente adeguati e, perciò, non si riescono ad estrapolare le conclusioni necessarie (Gruber e Hartung, 2004).

Un limite del MAV risiede nel fatto che sono sistemi semplificati dell'organismo *in toto*, perciò difficilmente mimano i processi farmaco- o tossicocinetici (assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione) che avvengono *in vivo*. Il destino di una molecola *in vitro* infatti, dipende esclusivamente dall'attività delle cellule bersaglio, mentre la distribuzione sistemica *in vivo* pone il composto sotto l'influenza di tessuti a volte anche differenti. *In vivo*, le barriere biologiche creano gradienti di permeabilità, mentre nei metodi *in vitro* l'assorbimento degli xenobiotici e l'esposizione delle cellule a questi ultimi può essere differente, visto che non è mantenuta l'integrità delle barriere biologiche (Freshney, 2001); il tutto si traduce nella difficoltà a correlare le concentrazioni ottenute *in vivo* con quelle da impiegarsi *in vitro*. Negli studi di tossicità cronica, peraltro, sono richiesti lunghi periodi di esposizione, per cui (visto che i MAV non rimangono vitali illimitatamente) si rende necessario l'impiego dei test *in vivo*: questo spiega perché i metodi *in vitro* vengono utilizzati solo per gli studi di tossicità acuta.

L'introduzione delle tecnologie “-omics” rappresenta un ottimo ausilio per lo sviluppo dei test di tossicità *in vitro*: le future applicazioni dei MAV potranno essere ottenute grazie alle innovazioni degli studi di

espressione genica (Piersma, 2006) nonché alla messa a punto di sistemi matematici per trasferire i dati ottenuti su cellule a organismi *in toto*.

I MAV che possono essere utilizzati nello studio del metabolismo *in vitro* e che più genericamente rientrano negli studi di epatotossicità, permettono di:

- studiare il metabolismo e l'attivazione degli xenobiotici;
- indagare le differenze di specie ed i meccanismi degli effetti collaterali dei farmaci;
- comparare le biotrasformazioni tra specie diverse;
- valutare le possibili interazioni tra farmaci (induzione inclusa);
- scoprire gli effetti di nuove molecole prima di svolgere studi *in vivo*;
- identificare biomarcatori prognostici;
- determinare le concentrazioni alle quali l'epatotossicità è reversibile o irreversibile;
- sviluppare il potenziale uso di sostanze epatoprotettrici per attenuare la tossicità degli xenobiotici;
- comprendere i meccanismi e gli stimoli che inducono la rigenerazione epatica, la fibrosi, i danni da ischemia e da riperfusione epatica.

I principali MAV utilizzati a tali scopi sono rappresentati dalle linee cellulari stabilizzate di epatoma, le fettine di fegato, gli epatociti in sospensione ed in coltura primari, le frazioni subcellulari e le cellule ingegnerizzate con enzimi biotrasformativi.

### **Linee cellulari stabilizzate**

L'utilizzo di linee cellulari stabilizzate di origine epatica è stato proposto come alternativa alle colture primarie e vengono fondamentalmente utilizzate per studi *in vitro* sul metabolismo dei farmaci nonché per l'esecuzione di studi di tossicità (Aninat *et al.*, 2006). Esse sono fondamentalmente ottenute a partire da epatomi (Donato, 2004), vengono mantenute in coltura a 37°C in atmosfera controllata (con il 5% di anidride carbonica), in terreno di coltura come quello modificato di Dulbecco ed addizionato con il 10% di siero fetale bovino (FCS). Queste cellule proliferano in coltura, mantengono un fenotipo stabile e sopportano processi di congelamento e scongelamento senza perdere vitalità e funzionalità. Si tratta perciò, di un modello sperimentale illimitato, disponibile in qualsiasi momento e facile da ottenere; sfortunatamente, tutte le linee cellulari con le caratteristiche precedentemente descritte ed oggi giorno conosciute, possiedono una capacità metabolica molto limitata rispetto agli epatociti (Donato, 2004), anche se ne sono state isolate un gran numero a partire da colture primarie di cellule neoplastiche rese poi immortali grazie all'impiego di oncogeni ricombinanti (Battle e Stacey, 2001). In particolare, l'espressione del CYP solitamente è molto bassa o non facilmente determinabile nelle cellule di epatoma umano; in esse è stata ottenuta la ri-espressione del CYP tramite la transfezione di fattori di trascrizione specifici del fegato, come c/EPB- $\alpha$ ; ad ogni modo, queste linee cellulari non sottendono ai fenomeni di regolazione dell'espressione genica osservati in epatociti normali (Aninat *et al.*, 2006).

Gli svantaggi di questo MAV consistono essenzialmente nel fatto che sono linee cellulari immortali dotate di una capacità di crescita molto rapida, caratteristiche molto differenti se paragonate a molti tessuti normali di

mammifero (Townsend *et al.*, 1999); inoltre, molte attività enzimatiche metabolizzanti sono perse o ridotte (Donato e O'Connor, 2004).

### **Le fettine di fegato**

Le fettine di fegato solitamente vengono allestite tramite l'uso di microtomi, scegliendo uno spessore utile per preservare l'integrità dell'organo e le sue funzioni, evitando perciò di infliggere dei traumi; in questo modo, i recettori di superficie ed i trasportatori rimangono intatti (Vickers e Fisher, 2005). Il tessuto epatico è preparato in ambiente sterile: l'organo viene perfuso con tamponi ossigenati (con il 5 % di CO<sub>2</sub>), tagliato a fettine dello spessore di 200-250 µm (corrispondenti ad uno spessore di circa 8 cellule); le sezioni così ottenute vengono conservate in tampone di Krebs, deposte su griglie di acciaio inox contenute in un supporto di teflon, posizionate orizzontalmente in bottiglie di vetro con il terreno di coltura (Catania *et al.*, 2007). Per l'incubazione si può porre la fettina anche su una piattaforma di supporto, che viene semplicemente coperta dal terreno di coltura (per facilitare gli scambi gassosi) e mantenuta in agitazione. In alternativa si può utilizzare un sistema che permette la rotazione del tessuto all'interno di quantità di terreno sufficienti a coprire la fettina ogni volta che viene compiuta un'oscillazione; la rotazione in questo caso è orbitale (circa 2 rpm in atmosfera controllata) e viene bucato il tappo per permettere gli scambi gassosi.

La qualità del fegato utilizzato è fondamentale per l'ottenimento delle fettine: se l'organo infatti è in buone condizioni, le fettine supporteranno meglio il congelamento. Inoltre, i vari metodi di incubazione impiegati determinano una diversa sopravvivenza delle stesse.

Esse rappresentano un sistema *in vitro* che mantiene le caratteristiche multicellulari, strutturali e funzionali del sistema *in vivo*; sono utili per chiarire i meccanismi di danno cellulare indotto da farmaci e per caratterizzare la suscettibilità di specie (Vickers e Fisher, 2005), nonché per studiare il metabolismo epatico (Nahmias *et al.*, 2006) e l'inducibilità del CYP (Glockner *et al.*, 2002).

Rispetto ad altri MAV, offrono molti vantaggi, tra cui la conservazione dell'architettura tissutale ed il mantenimento della comunicazione intercellulare (Catania *et al.*, 2007); sono infatti rappresentati tutti i tipi cellulari presenti nell'organo integro che conservano le normali inter-relazioni spaziali (Rekka *et al.*, 2002).

Inoltre, possono essere congelate e scongelate, permettendo così il mantenimento della vitalità per un periodo superiore alle 24 ore di incubazione.

Se confrontate con gli epatociti sono più semplici da preparare, richiedono minor tempo per lo svolgimento dell'esperimento, non necessitano di esposizione alla collagenasi ed i livelli di attività delle monossigenasi costitutivamente espresse variano in modo contenuto a seguito di congelamento, scongelamento o incubazione per più di 24 ore (Glockner *et al.*, 2002). Grazie inoltre alla possibilità di conservazione, le fettine di fegato permettono di ridurre notevolmente il numero di animali necessari per le varie ricerche (Lupp *et al.*, 2002).

Esse esprimono un *range* pressoché completo di enzimi di fase I e II, quindi presentano un'elevata capacità metabolica; permettono di eseguire studi su molti composti a diverse concentrazioni e rimangono vitali da 6 fino a 48 ore: il metabolismo CYP-dipendente infatti, è quasi paragonabile tra fettine fresche e quelle

incubate per 24 ore, mentre l'attività coniugativa è inferiore ma comunque sempre ben rilevabile (Glockner *et al.*, 2002).

Un loro svantaggio è che l'elevata quantità di ossigeno richiesta per mantenerle in coltura può alterare significativamente il loro metabolismo, influenzando la risposta del sistema ai vari stimoli (Nahmias *et al.*, 2006). Questo MAV, inoltre, non assicura che tutte le cellule siano ossigenate allo stesso modo (problemi di anossia), siano raggiunte ugualmente dai principi nutritivi presenti nel medium (inadeguata penetrazione) ed è facilmente soggetto a contaminazioni batteriche. Inoltre è noto che esistono *in vivo* delle differenze di espressione ed indicibilità del CYP in base alla regione dell'organo considerata, che si ripresentano nelle fettine di fegato; pertanto la variabilità del tessuto al momento del prelievo può aumentare notevolmente la variabilità inter-individuale dell'espressione del CYP sia basale sia modulata da induttori specifici (Hariparsad *et al.*, 2005).

### **Le colture primarie di epatociti**

Le colture primarie di epatociti costituiscono un'importante risorsa per lo studio del metabolismo biotrasformativo ed i recenti progressi ottenuti nelle tecniche di mantenimento in coltura hanno permesso di ottenere informazioni più dettagliate sulle influenze di componenti extracellulari nella differenziazione epatica, nella loro crescita e sopravvivenza (Jaspreet *et al.*, 2004).

La tecnica più comunemente utilizzata per il loro isolamento è stata introdotta da Seglen nel 1976: consiste in una iniziale perfusione in due tempi del tessuto che prevede l'utilizzo della collagenasi, seguita da frazionamento meccanico del tessuto e da una purificazione (basata sulla densità cellulare); questo metodo permette di ottenere un'alta vitalità (> del 90%) ed una popolazione relativamente pura (> del 95%).

Il punto critico di questo sistema però, consiste nella rapida perdita della struttura differenziata delle cellule e delle loro funzioni: la morfologia cuboidale e le funzioni specifiche (metabolismo degli xenobiotici e produzione di proteine ematiche) sono alterate, l'actina è accumulata sulla superficie a contatto col substrato, i canalicoli biliari vengono persi e la morte sopraggiunge in 1-3 giorni.

Lo stato di differenziazione e di sopravvivenza degli epatociti dipendono strettamente dal sistema impiegato per mantenerli in coltura (Tuschl e Mueller, 2006): oltre alla tipologia del terreno e delle sostanze ad esso addizionate, hanno notevole importanza i livelli di alcuni aminoacidi (Battle e Stacey, 2001).

Molte delle funzioni epatiche vengono mantenute anche se ridotte, come ad esempio il trasporto Na-dipendente degli acidi biliari, degli aminoacidi e degli zuccheri: questo decremento è stato attribuito ad un processo di sdifferenziamento. Vista la sostanziale perdita dell'attività del CYP in funzione del tempo e un'alterazione della struttura fine, sono stati eseguiti tentativi per ottenere colture con livelli stabili delle attività enzimatiche, tramite l'aggiunta al terreno di coltura di cofattori e vitamine, oppure con il congelamento in azoto liquido, ma i risultati ottenuti sono stati insoddisfacenti (Testai, 2001).

La metodica più utilizzata prevede l'inoculo delle cellule in piastre ricoperte da un singolo strato di collagene e l'utilizzo di un terreno condizionato; questo, generalmente, contiene FCS, corticosteroidi, insulina, ed *epidermal growth factor* (Nahmias *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2005). L'aggiunta di proteoglicano eparan-

solfato al di sopra del collagene, inoltre, permette l'espressione dei *marker* della superficie basale e delle proteine delle *gap-junction* (Nahmias *et al.*, 2006). La deposizione di un secondo strato di collagene sopra gli epatociti, inducendo un forte aumento dell'espressione delle funzioni epatiche specifiche, può mantenerne la polarità e la funzionalità, fino ad alcuni mesi.

Un'altra tecnica di coltura consiste nella formazione di sferoidi epatici in una matrice extracellulare non adesiva (Nahmias *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2005): questa tecnica si è dimostrata particolarmente utile per preservare la polarità di membrana, la struttura cellulare ed i livelli di CYP3A e CYP2B (Thomas *et al.*, 2005).

Sono state messe a punto anche co-colture di epatociti e di cellule diverse, come quelle epiteliali epatiche e di Kupffer, per prolungare la sopravvivenza degli epatociti e mantenerne le proprietà specifiche (El-Ali *et al.*, 2006), come quella farmaco-metabolizzante che decresce nella prima settimana di coltura (Nahmias *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2005). Il procedimento per preparare sospensioni di epatociti è identico a quello impiegato per gli epatociti in monostrato; la differenza risiede nel fatto che le sospensioni vengono utilizzate immediatamente, senza quindi fornire il tempo necessario per riprendersi dal trauma subito durante l'isolamento in cellule singole (Paine, 1996).

Le colture di epatociti rappresentano il MAV più completo e complesso, specie se paragonate ai microsomi epatici: infatti, possiedono la serie completa degli enzimi di fase I e II, oltre a tutti i trasportatori cellulari. Rappresentano uno dei migliori modelli per studiare il metabolismo dei farmaci, perché permettono di individuare i diversi metaboliti che da esso conseguono (Testai, 2001), anche quando sono coinvolti più enzimi ed il substrato subisce multiple trasformazioni ossidative (Montesissa *et al.*, 1996); in aggiunta a ciò, rappresentano più verosimilmente quanto accade *in vivo*, poiché in addizione alle ossidazioni e idrossilazioni, compiono anche riduzioni dei legami insaturi (Van Puymbroeck *et al.*, 1998a).

Poiché gli enzimi che metabolizzano gli xenobiotici sono essenziali anche per i meccanismi di bioattivazione di sostanze genotossiche e cancerogene, l'espressione degli enzimi biotrasformativi può determinare la suscettibilità e/o la resistenza all'insorgenza di neoplasie; quindi questi studi sono importanti anche per comprendere i meccanismi d'azione dei composti cancerogeni (Testai, 2001).

L'incubazione degli epatociti in presenza di un farmaco, può prolungarsi per varie ore o giorni: ciò permette di analizzare composti che vengono metabolizzati molto lentamente, o di realizzare studi di induzione. Questa possibilità differenzia gli epatociti primari dalle frazioni subcellulari microsomiali, che per ragioni di stabilità si limitano ad un'ora al massimo. Infatti, trattandosi di cellule intatte, l'integrità di membrana si conserva, tutti i sistemi enzimatici sono integri e lavorano contemporaneamente, i livelli fisiologici dei cofattori e dei coenzimi necessari sono garantiti (Donato, 2004).

Le colture in monostrato di epatociti non rappresentano necessariamente la situazione fisiologica, nella quale l'interazione cellula-cellula è ottimizzata: quando le cellule proliferano, i contatti cellulari diventano più frequenti. Ciò comporta una diminuzione della crescita (inibizione da contatto) ed un incremento nell'espressione di caratteristiche legate al differenziamento (Battle e Stacey, 2001); conseguentemente, ogni

esperimento necessita dell'allestimento di una nuova preparazione cellulare a partire da fegato fresco (Donato, 2004).

Per quanto riguarda gli animali da reddito, sono stati condotti diversi studi relativi all'ottenimento di colture primarie di epatociti; tra i più recenti si possono annoverare quelli relativi al suino e al coniglio (Sinclair *et al.*, 2005; Schnelzer *et al.*, 2006; Lorenti *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2003; Montesissa *et al.*, 2004; Kunieda *et al.*, 2003). Le colture primarie di epatociti di bovino inoltre costituiscono un mezzo rapido, economico ed affidabile per ottenere un profilo metabolico relativo ad un nuovo composto PdC utilizzato a scopo illecito. Infatti, essendo un sistema *in vitro*, permettono l'utilizzo di alte concentrazioni di questi composti; possono così essere eseguiti studi esaustivi del profilo metabolico consecutivamente all'individuazione dei metaboliti *in vivo* (Coulet AS *et al.*, 1998).

### **Le frazioni subcellulari epatiche: i microsomi**

Le frazioni subcellulari sono rappresentate da microsomi, citosol e frazione post-mitocondriale (S9). Esse sono preparate a partire da omogenato di fegato, sottoposto ad ultracentrifugazione differenziale per rimuovere nuclei e mitocondri, permettendo così di ottenere dapprima la frazione S9 e quindi microsomi (vescicole del reticolo endoplasmatico) e citosol (Testai, 2001).

I vantaggi delle frazioni subcellulari sono essenzialmente rappresentati dalla loro facile preparazione, la flessibilità delle condizioni di incubazione (cofattori, tamponi, pH e temperatura), la disponibilità illimitata, la possibilità di produrre elevate quantità di metaboliti per l'analisi strutturale, nonché la mantenuta attività catalitica degli enzimi farmaco-metabolizzanti. Gli svantaggi invece comprendono essenzialmente la labilità di alcuni enzimi che si riscontra durante il procedimento di preparazione, la perdita dell'eterogenicità cellulare (quando gli organi sono composti da più tipi cellulari) e la limitazione del metabolismo sequenziale, che per essere completo richiede cofattori multipli o componenti subcellulari multiple.

I dati ottenuti da frazioni subcellulari permettono la comprensione delle relazioni tra il metabolismo e la tossicità degli xenobiotici a livello di organi bersaglio e di ottenere le informazioni di quale sia la frazione che contribuisce in maggior grado alla loro biotrasformazione, suggerendo così il modello da utilizzare per l'approfondimento degli studi.

I microsomi in particolare, costituiscono un sistema subcellulare ottenuto mediante ultracentrifugazione (100.000xg) di omogenato di fegato in tampone fosfato (0.1 M pH 7.4), che permette una purificazione parziale delle membrane del reticolo endoplasmatico liscio, le quali sono unite al P450 e ad altri enzimi (Donato e O'Connor, 2004; Machala *et al.*, 2003). I microsomi epatici in tutte le specie di mammifero contengono numerosi CYP ed ognuno di essi ha la capacità di catalizzare differenti tipi di reazioni (Parkinson, 2001). Proprio perché sono un sistema *in vitro* ampiamente utilizzato, in commercio sono disponibili microsomi provenienti da differenti specie animali, incluso l'uomo (Baranczewski *et al.*, 2006); spesso questo MAV rappresenta il primo modello epatico impiegato nel corso dello sviluppo di un nuovo farmaco: infatti, la stabilità metabolica di una nuova molecola può essere facilmente studiata, come primo approccio, tramite incubazione con microsomi e, successivamente, eseguendo l'analisi cromatografia della

miscela ottenuta. Queste tecniche hanno considerevolmente semplificato e velocizzato l'identificazione dei CYP coinvolti nella sintesi di vari metaboliti (Donato, 2004). In merito a questo, l'utilizzazione dei microsomi, ottenuti partendo da un *pool* di fegati, permette di ottenere una visione generale del metabolismo di un farmaco indipendentemente dai fattori individuali (età, sesso, razza, fattori dietetici, ambientali, patologici, ormonali) che concorrono a modularne l'attività biotrasformativa. Allo stesso modo, la possibilità di avere a disposizione vari lotti di microsomi perfettamente caratterizzati e ognuno ottenuto da un unico fegato, permette lo studio dell'influenza di certi fattori di speciale interesse, come ad esempio i polimorfismi genetici (Donato e O'Connor, 2004).

Il maggior vantaggio di questo MAV è la sua semplicità nonché il fatto che possiede un'elevata attività biotrasformativa (i microsomi contengono tutti i CYP che metabolizzano gli xenobiotici ed alcuni enzimi di coniugazione). Questo metodo richiede essenzialmente l'uso di un'ultracentrifuga e le aliquote di microsomi possono essere conservate a -80°C senza perdite significative dell'attività (Donato e O'Connor, 2004).

Gli svantaggi di questa tecnica invece sono rappresentati dall'impossibilità di eseguire studi di induzione enzimatica, per i quali invece è necessario l'utilizzo di sistemi cellulari; la possibilità di eseguire solo studi a breve termine; l'assenza di enzimi di fase II, con l'esclusione delle UGT; la richiesta di cofattori (essenzialmente NADPH). Per questo motivo, questo modello subcellulare non permette di realizzare studi che richiedono l'utilizzo contemporaneo di più enzimi o compartimenti cellulari, come ad esempio l'induzione e il trasporto intracellulare (Donato e O'Connor, 2004).

### **Le cellule ingegnerizzate**

Le cellule ingegnerizzate nell'ambito del DM conseguono alla transfezione di linee cellulari con particolari enzimi farmaco-metabolizzanti, in modo tale da permettere l'incremento dell'espressione genica specifica.

La transfezione ha fatto negli ultimi anni grandi progressi: si è giunti all'impiego di vettori di espressione virali o di origine plasmidica, comprendenti solo la sequenza richiesta per l'espressione; inoltre, ora è possibile transfettare sequenzialmente o co-esprimere con un singolo vettore più di un gene all'interno di una stessa linea cellulare (il che permette ad esempio, di ricreare più reazioni appartenenti alla stessa via metabolica).

La scelta dei vettori di espressione rappresenta un punto critico, *in primis* per la scelta del tipo di vettore (virale o non virale) e poi per la scelta di un sistema di espressione transitoria o definitiva.

I vettori virali risultano utili quando ci si attende di ottenere nella linea cellulare *target* l'espressione in un gran numero di cellule; vantaggi di questo tipo si possono ottenere anche tramite la transfezione transitoria con un replicante autonomo o con un vettore plasmidico episomiale; alcuni vettori virali sono utili al fine di ottenere un'espressione stabile, ma può anche essere molto difficile ottenere, per ogni linea clonale transfettante stabile, livelli di espressione paragonabili a quelli ottenibili utilizzando un vettore plasmidico. L'espressione definitiva è preferibile ogni qualvolta sia richiesto il mantenimento di livelli costanti di espressione nel corso di un lungo periodo di tempo. Gli svantaggi di alcuni vettori virali includono la

produzione difficoltosa, la necessità di virus *helper* ed un ristretto *range* di linee cellulari ospiti che presentino un pattern di recettori appropriati.

L'applicazione della tecnologia del DNA ricombinante (come ad esempio l'utilizzo di linee cellulari che esprimono i singoli CYP), ha considerevolmente semplificato l'identificazione dei citocromi umani responsabili del metabolismo dei vari xenobiotici: ora è possibile ottenere informazioni sul metabolismo di molecole in via di sviluppo e sulle interazioni tra farmaci prima dell'avvio dei *trials* clinici; ciò esita in un minor costo degli studi e metodi eticamente più accettabili (Donato e Castell, 2003).

Sono state prodotte da tempo molte linee cellulari che esprimono stabilmente una singola forma di CYP di mammifero, per test di geno- e citotossicità; inoltre per aumentare la capacità biotrasformativa di alcuni CYP, è stata messa a punto la co-espressione dello stesso enzima assieme ad altri componenti della catena monossigenasica, come per esempio la NADPH citocromo c riduttasi. Inoltre, per ricostruire l'intero sistema di attivazione metabolica per alcune sostanze (come le amine eterocicliche), sono state prodotte linee cellulari che esprimono contemporaneamente una forma di CYP e di enzimi di fase II (i.e. N-acetiltransferasi: Sawada e Kamataki, 1998).

Le cellule ingegnerizzate sono utilizzate negli studi volti all'identificazione del meccanismo biologico che sta alla base della differenziazione dei sinusoidi epatici e delle funzioni epatiche, le quali sono perse e riacquistate nel processo di rigenerazione epatica. Inoltre, con l'ausilio di promotori fluorescenti, che possono essere attivati da vari stimoli, come farmaci, tossine e citochine, si potranno studiare gli effetti di epatotossicità dei farmaci e delle sostanze tossiche presenti nell'ambiente, individuare i potenziali fattori di crescita per la differenziazione epatica delle cellule staminali, o seguire la risposta dei tumori alle varie terapie antitumorali (Nahmias *et al.*, 2006).

Sono state ingegnerizzate varie linee cellulari di mammifero, a seconda dello scopo dello studio; tra queste la linea cellulare AHH-1TK+/- (linfoblasti di tipo B) e le V79, le HepG2 e le Caco2. Altri sistemi comunemente utilizzati per l'espressione degli enzimi biotrasformativi sono i lieviti (principalmente *Saccharomyces cerevisiae*) e batteri (*Escherichia coli*), che superano alcuni degli svantaggi delle linee cellulari di mammifero (i.e., la necessità di attrezzature particolari, bassi livelli di espressione e la stabilità di espressione in coltura a lungo termine: Testai, 2001).

Concludendo, i vantaggi di questo MAV sono i seguenti: l'elevata capacità di crescita, il numero illimitato di cellule disponibili, il fatto che possono esprimere uno o più geni e l'attività enzimatica altamente definita. Tra gli svantaggi invece, possiamo annoverare il fatto che non possiedono quantità rilevanti di enzimi e che sono utilizzabili solo per scopi ben precisi e definiti.

## 1.8. I trattamenti illeciti

Il Decreto Legislativo del 16 marzo 2006 n.158, che rappresenta l'attuazione su scala nazionale della Direttiva Comunitaria 2003/74/CE, definisce un trattamento illecito come "l'utilizzazione di sostanze o prodotti non autorizzati, ovvero di sostanze o prodotti autorizzati, ai fini o a condizioni diversi da quelli previsti dalle disposizioni vigenti" (art.1, comma 3, g).

Le sostanze a cui si riferisce il sopraccitato Decreto Legislativo sono elencate nell'allegato II della Direttiva 2003/74/CE, modifica della precedente Direttiva 96/22/CE (concernente il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica o delle sostanze beta-agoniste nelle produzioni animali) e sono distinte in due elenchi.

Elenco A:

- tireostatici;
- stilbeni, derivati dello stilbene, e loro sali ed esteri.

Elenco B:

- 17 $\beta$ -estradiolo e suoi derivati sottoforma di esteri;
- sostanze beta-agoniste.

Per tutte queste sostanze, sempre nel D.L.vo 158/06, si vietano "la somministrazione, mediante qualsiasi metodo, agli animali d'azienda e agli animali d'acquacoltura" (art.3, comma 1, a) nonché l'immissione sul mercato "ai fini della loro somministrazione a tutte le specie animali" (art.2, comma 1, a) per le sostanze appartenenti all'elenco A o "ai fini della loro somministrazione ad animali le cui carni e i cui prodotti sono destinati al consumo umano" (art.2, comma 1, b) per le sostanze incluse nell'allegato B.

Allo scopo di garantire il rispetto delle disposizioni fin qui descritte, l'Unione Europea, tramite la Direttiva 96/23/CE "concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti", ha sottolineato la necessità di avviare dei piani di sorveglianza per la ricerca dei residui e delle sostanze "negli animali vivi, nei loro escrementi e liquidi biologici, nonché nei tessuti, nei prodotti di origine animale, negli alimenti per animali e nell'acqua di abbeveraggio" (art.3, comma 1). L'attuazione di questo proposito, nel territorio nazionale, è rappresentata dal "Piano Nazionale Residui", coordinato e promosso dal Ministero della Salute.

Le modifiche e le disposizioni rispettivamente proposte e contenute nelle Direttive 96/22/CE e 96/23/CE, nonché la loro ricezione su scala nazionale, si sono rese necessarie per garantire la sicurezza del consumatore nei confronti dei residui presenti nelle carni di quegli animali cui siano stati somministrati PdC, inclusi anche i prodotti di origine animale importati da Paesi dove l'utilizzo a scopo auxinico di molte sostanze comprese negli elenchi A e B è legalmente autorizzato, come gli USA e il Canada.

Una pubblicazione del 2002 ad opera di Courtheyn *et al.*, riporta come all'interno dell'Unione Europea, a fronte di una riduzione del numero di bovini e suini risultati positivi ai controlli per la ricerca di PdC, l'uso illecito di queste sostanze costituisca tuttora un serio problema; ciò si dimostra con l'analisi di preparazioni illegali sequestrate che contengono soprattutto steroidi (in particolare gli esteri degli ormoni naturali), beta-

agonisti e corticosteroidi, che sono diventati la classe di composti maggiormente utilizzata. Per ottenere un miglioramento nell'efficienza dei piani di sorveglianza, si incoraggia sia l'esecuzione di studi sulla cinetica ed il metabolismo dei PdC in specie animali *target*, sia l'organizzazione dei dati relativi ai diversi PdC, inclusi i loro metaboliti, in un *database* di riferimento (Courtheyn *et al.*, 2002).

Un ostacolo nella lotta all'utilizzo dei trattamenti illeciti è rappresentato dalla difficoltà nel determinare la presenza di residui di PdC nelle matrici biologiche che può essere ascritta a cause diverse:

- uso di composti che vengono estensivamente metabolizzati o i cui metaboliti siano sconosciuti;
- somministrazione, a basse dosi, di composti diversi, appartenenti allo stesso gruppo o a gruppi differenti, che però dimostrano di possedere un effetto addizionale o sinergico;
- utilizzo di analoghi sintetici di PdC noti.

Sono necessarie infatti metodiche diagnostiche sempre più sensibili e specifiche per rivelare questi trattamenti. I controlli analitici tradizionali, attualmente adottati dagli Stati dell'Unione Europea, sono basati su metodi chimici e biologici di *screening*, quali il *radio immunoassay*, l'*enzyme-linked immunoassorbent assay* (ELISA), la cromatografia su strato sottile o *high-performance liquid chromatography* (HPLC), seguiti da test di conferma mediante gas-cromatografia o cromatografia liquida combinate con spettrometria di massa.

I risultati sono generalmente buoni per molti anabolizzanti di origine sintetica; nel caso degli ormoni naturali (i.e. TST ed estradiolo) esistono problemi legati al fatto che questi steroidi sono fisiologicamente prodotti dall'animale e, ad oggi, non sono stati definiti criteri che permettano di distinguere tra origine endogena o somministrazione esogena di questi ultimi, né esistono soglie ufficiali di concentrazione riconosciute come illecite, poiché queste ultime dipendono in larga misura da sesso, età, alimentazione e variazioni stagionali (Buisson *et al.*, 2005).

Grazie ai continui progressi delle tecniche analitiche, oggi possono essere rilevate concentrazioni molto più basse delle singole molecole; d'altra parte, però, sempre più spesso vengono adottati *cocktail* di più steroidi a basse concentrazioni, in modo da ottenere un effetto anabolizzante cumulativo, riducendo tuttavia le quantità dei singoli composti somministrati.

Considerando il numero di residui possibili, l'utilizzo dei metodi analitici diretti è spesso in contrasto con i *budget* limitati, il numero di campioni e la necessità di risposte in tempi rapidi. Recentemente la Commissione Europea ha definito nuovi criteri di validazione per la messa a punto di metodi analitici e per l'interpretazione dei dati ottenuti (Decisione 2002/657/CE).

Alla luce delle difficoltà sopra descritte, si rende necessaria l'applicazione di nuove metodiche analitiche, più sensibili e specifiche (Nebbia, 2005), che non devono sostituire i test tradizionali: questi ultimi infatti devono rimanere in uso per i controlli ufficiali. Le nuove metodologie potrebbero anche essere di grande interesse per i disciplinari di produzione definiti nel campo delle procedure *hazard analysis of critical control points* (HACCP), per garantire la qualità e la salute degli alimenti. Tra queste metodiche, potrebbe essere annoverata l'individuazione di biomarcatori molecolari indiretti di trattamento, mediante lo studio dei profili di espressione genica: tale approccio permetterebbe di evidenziare un potenziale trattamento con sostanze

pericolose in assenza di residui negli animali o nei prodotti derivati e di discriminare un animale sano da uno trattato. A questo proposito, le nuove tecnologie “-omics” quali trascrittomica e proteomica, sembrano essere fra le metodiche più promettenti, poiché, quando applicate a studi di epidemiologia molecolare, permettono di stimare le variazioni indotte dagli xenobiotici a livello genico e proteico.

Le molecole che ad oggi sono maggiormente impiegate a scopo illecito per l'incremento delle *performance* produttive degli animali sono i beta-agonisti, gli steroidi sessuali ed i corticosteroidi (Courtheyn *et al.*, 2002).

### **Beta-agonisti**

I beta-agonisti sono dei composti farmacologici di sintesi che solitamente vengono impiegati in allevamento per il trattamento di patologie respiratorie per le loro proprietà broncodilatative ed anche come agenti tocolitici. Tuttavia, è stato evidenziato che questi composti presentano anche attività lipolitica o detta anche di ripartizione di energia, che viene sfruttata a scopo illecito per diminuire la massa grassa ed aumentare quella magra (Meyer e Rinke, 1991): questo effetto è stato descritto in pollame (Hamano *et al.*, 1998), bovini (Hanrahan *et al.*, 1986), ovini (Beerman *et al.*, 1986) e suini (Warriss *et al.*, 1990).

Queste sostanze, simili alle catecolamine endogene, esplicano la propria azione legandosi ai recettori di membrana  $\beta_2$ -adrenergici dei vari distretti dell'organismo. La conseguenza di tale legame è rappresentata dall'attivazione dell'enzima adenil-ciclastasi e conseguentemente dell'adenosin monofosfato ciclico intracellulare che provoca i seguenti effetti metabolici:

- lipolisi a livello del tessuto adiposo di rivestimento con innalzamento dei livelli sierici di acidi grassi liberi;
- glicogenolisi a livello epatico e muscolare (muscolo striato);
- secrezione di insulina (in caso di trattamenti a breve termine) a livello del pancreas, per azione sulle cellule  $\beta$  delle isole del Langerhans;
- rilassamento della muscolatura liscia, soprattutto a livello di utero, trachea e bronchioli.

Non va trascurata inoltre l'affinità di legame di questi composti con i recettori  $\beta_1$ -adrenergici che, anche se inferiore, è comunque responsabile di un effetto isotropo, cronotropo e dromotropo positivo a livello cardiaco.

Nell'impiego illecito di queste sostanze sin dagli inizi degli anni '80 sembra primeggiare il clenbuterolo, per la sua efficacia, la sua facilità di somministrazione (generalmente *per os*) ed il suo relativamente breve tempo di sospensione. Solitamente vengono utilizzati dosaggi approssimativamente da 10 a 100 volte la dose terapeutica, determinando perciò l'accumulo di residui in diversi tessuti e organi, quali peli, retina, fegato, rene, muscoli e milza ed il conseguente potenziale rischio di intossicazione alimentare nell'uomo (Kuiper *et al.*, 1998). L'associazione dei beta-agonisti con altri PdC come estradiolo e DEX, può influenzarne l'efficacia: la combinazione dei tre composti può aumentare infatti l'effetto di ripartizione, mentre il DEX può alterare l'escrezione dei  $\beta$ -agonisti (diminuendone il contenuto a livello epatico), influenzando così i controlli ufficiali: Abraham *et al.*, 2004; Groot *et al.*, 1998). Purtroppo però la somministrazione di *cocktail* può anche aggravare gli effetti anatomici ed istologici normalmente determinati dalla somministrazione del

solo clenbuterolo (Groot *et al.*, 1998). E' nota infatti l'azione immunosoppressiva dei corticosteroidi, che influenzano negativamente la morfologia e la funzionalità del timo, nonché la capacità degli estrogeni di influire negativamente sul numero di timociti (Groot *et al.*, 1998). Lo stesso dicasi per le lesioni a carico delle gonadi e del tratto genitale (Groot *et al.*, 1992).

### **Steroidi**

Gli steroidi sono composti naturali o di sintesi che presentano nella loro molecola, un nucleo comune tetraciclico di atomi di carbonio (ciclopentanoperidrofenantrene). La sintesi degli steroidi, nella cellula animale, prende il via dal colesterolo, che si trova all'interno del reticolo endoplasmatico liscio della cellula e viene trasportato nel mitocondrio dove, a seguito del distacco della catena laterale ad opera dell'enzima mitocondriale *cytochrome P450 side chain cleavage* (Sanderson e Van Den Berg, 2003), viene trasformato in pregnenolone, cioè nel precursore diretto di tutti gli steroidi. Quest'ultimo, a seguito di vie biosintetiche diverse, viene biotrasformato in vari steroidi, a seconda della tipologia di enzimi espressa nel tessuto considerato; ad esempio, nelle surrenali dal pregnenolone originano i corticosteroidi (mineralcorticoidi e glicocorticoidi), mentre nelle gonadi gli ormoni sessuali steroidei (androgeni, estrogeni e progesterone: vedi figura 1.8.1).

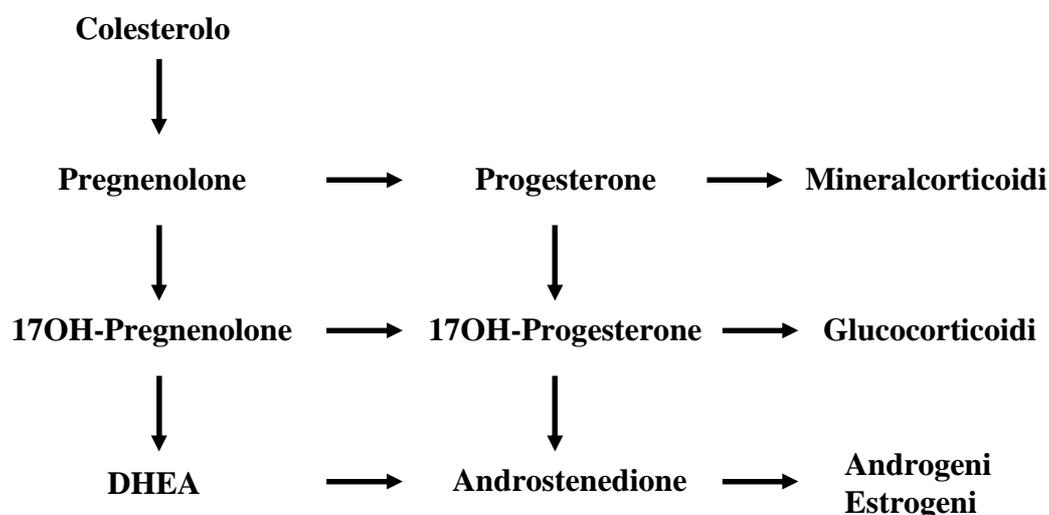


Figura 1.8.1: Biosintesi dei principali composti steroidei.

Gli steroidi sessuali sintetici sono composti che mimano l'attività degli ormoni steroidei naturali, ma vengono metabolizzati più lentamente; tra questi si annoverano estradiolo benzoato, TST palmitato, etinilestradiolo, metiltestosterone, 19-nortestosterone o nandrolone, stanozolo, melengestrol acetato, trenbolone acetato, dietilstilbestrolo, boldenone.

## Androgeni

Gli androgeni sono steroidi a 19 atomi di carbonio, che si trovano prevalentemente nel maschio: i due principali composti sono l'androstenedione, che si forma nella corteccia surrenale, ed il TST, che si forma solo nelle gonadi (testicoli e ovaie). Nel maschio, il TST viene prodotto, quasi totalmente, a livello del testicolo e (meno del 10%) consecutivamente all'interconversione dell'androstenedione plasmatico; quest'ultimo a sua volta viene sintetizzato per il 60% dalla corteccia surrenalica, dai testicoli e dal fegato (a seguito dell'interconversione del DHEA). Nella femmina, il TST viene prodotto per il 40% dalla corteccia del surrene, dalle ovaie e dal fegato (DHEA), e per il 60% dall'androstenedione plasmatico, che deriva per il 90% dal corticosurrene. La forma attiva del TST, in grado di legarsi ai recettori cellulari, è il DHT.

Nel testicolo, la maggior parte degli enzimi steroidogenetici si trova nelle cellule del Leydig; sotto l'azione dell'ormone luteinizzante (LH) e dell'ormone follicolo-stimolante (FSH), il progesterone viene idrossilato a 17 $\alpha$ -idrossiprogesterone e quest'ultimo, per perdita della catena laterale e ossidazione in C17 diviene androstenedione e successivamente TST, dopo riduzione dello stesso C17. Il TST viene poi secreto nel plasma e trasportato legato ad una  $\alpha$ -globulina (SHBG, *sex hormone binding globulin*), che viene sintetizzata a livello epatico. Sempre nel testicolo, ma nelle cellule del Sertoli, sotto stimolazione dell'FSH, viene prodotta una proteina in grado di legarsi agli androgeni (*androgen binding protein*) che ne mantiene elevata la concentrazione nei tubuli seminiferi. Il TST può essere convertito in DHT in molti tessuti: il DHT è l'ormone maschile più potente (attività 10 volte maggiore rispetto a quella del TST) ed agisce legandosi ad un recettore specifico intracellulare, denominato *androgen receptor*: la formazione del complesso ormone-recettore comporta una trasformazione conformazionale del recettore stesso, che lo attiva e lo rende capace di interagire con specifiche sequenze nucleotidiche del DNA (HRE), andando a modificare (attivare o reprimere) la trascrizione dei geni associati.

Il TST è indispensabile per il mantenimento della spermatogenesi, il comportamento sessuale e la libido. Espleta anche un'azione sullo sviluppo corporeo: in molte specie animali, i maschi hanno dimensioni superiori a quelle delle femmine, fino ad arrivare a dimorfismi evidenti. Infatti, gli androgeni agiscono sull'ossificazione delle epifisi ossee, promuovono lo sviluppo delle masse muscolari e lo sviluppo laringeo e possiedono una netta azione anabolizzante proteica. In particolare, gli androgeni determinano un aumento del peso corporeo, dovuto essenzialmente ad un aumento del deposito proteico a livello cellulare del muscolo, stimato intorno al 9% ed una diminuzione del grasso corporeo di circa il 32% (Choo *et al.*, 1991). Decisivo è anche il ruolo nella differenziazione del comportamento sessuale e nello sviluppo dei caratteri sessuali secondari.

Il DHEA è un ormone steroideo naturale secreto dalla corteccia surrenale. E' un precursore endogeno degli steroidi poiché, *in vivo*, può essere convertito in diversi composti, ivi compresi il TST (di cui è diretto precursore), l'androstenedione, l'androstenediolo o l'estradiolo (Griffin e Ojeda, 2004).

Il DHEA viene sintetizzato a partire dal colesterolo grazie all'azione di due enzimi, entrambi appartenenti al sistema enzimatico del CYP. La conversione del colesterolo in pregnenolone è mediata dall'enzima

CYP11A1, che si trova nei mitocondri; il successivo passaggio, da pregnenolone a DHEA richiede la duplice attività 17 $\alpha$ -idrossilasica e 17,20-liasica del CYP17, che si trova nel reticolo endoplasmatico. Inoltre il flusso di colesterolo nella via biosintetica sottostà alla regolazione di una particolare proteina definita *steroidogenic acute regulatory protein* (Auchus, 2004). Subisce solfatazione per mezzo della DHEA-ST (DHEA solfotransferasi) per essere convertito in DHEA-S, più idrofobico e più facile da trasportare (Falany, 1997).

Il DHEA è un composto endogeno che può promuovere la proliferazione dei perossisomi a livello epatico nonché indurre la trascrizione di geni coinvolti nel metabolismo dei lipidi e nella  $\beta$ -ossidazione dei perossisomi stessi, attraverso PPAR.

A seguito di somministrazioni in dosi elevate, il DHEA può provocare lesioni non solo a livello epatico (carcinoma) ma anche, più genericamente, a livello cellulare (i.e., apoptosi); è stato infatti dimostrato che il DHEA provoca apoptosi ed induce fenomeni perossidativi in fegato, rene e cuore di ratto (Correa *et al.*, 2003), inibisce la proliferazione cellulare e la respirazione mitocondriale, quest'ultima sia *in vivo*, sia *in vitro* (Yang *et al.*, 2002). Comparando il profilo di espressione genica, il DHEA esercita un effetto sovrapponibile a quello del DHT, la forma biologicamente attiva del TST, e per questa ragione viene considerato senza dubbio un anabolizzante (Labrie *et al.*, 2006).

Nell'uomo, la concentrazione plasmatica di DHEA diminuisce gradualmente dopo la pubertà; tuttavia, recentemente, oltre all'intrinseca azione androgenica, mediante esperimenti *in vivo* ed *in vitro*, sono stati scoperti gli effetti del DHEA sull'invecchiamento (Baulieu *et al.*, 2000; Morales *et al.*, 1998), sul sistema immunitario, sull'obesità (effetti anti-obesità, grazie alla conversione in TST a livello del testicolo: Taniguchi *et al.*, 1995), sul metabolismo lipidico, aterosclerosi, diabete mellito, memoria, osteoporosi ed effetti anti-stress favorendo l'inibizione del rilascio di catecolamine (Liu e Wang, 2004). Tali effetti si manifestano attraverso tre meccanismi d'azione alternativi: diretto, mediante un recettore specifico, sul gene *target*; indiretto, mediante conversione enzimatica del DHEA in TST ed estradiolo nei tessuti periferici e successivo legame a recettori per gli androgeni e per gli estrogeni; mediante alterazioni delle funzioni cellulari dopo legame ad alcune macromolecole proteiche, grazie alle caratteristiche idrofobiche del DHEA (Nawata *et al.*, 2002).

Il boldenone (androsta-1,4-diene-17  $\beta$ -ol-3-one), chiamato anche 1-deidrotosterone o 17 $\beta$ -boldenone (17 $\beta$ -bol) è uno steroide di sintesi con attività androgenica che differisce dal TST solamente per la presenza di un doppio legame in posizione 1. È stato sintetizzato per la prima volta nel 1956 e ottenuto dalla deidrogenazione del TST con idrossido di selenio (Meystre *et al.*, 1956). Tra gli steroidi strettamente correlati al 17 $\beta$ -bol e al TST si annoverano l'epimero del 17 $\beta$ -bol, il 17 $\alpha$ -boldenone (17 $\alpha$ -bol), l'androstadienedione (androsta-1,4-diene-3,17-dione), noto anche col nome di boldione (ADD) e l'androstenedione (androsta-4-ene-3,17-dione).

Nell'uomo l'ADD è il diretto precursore di 17 $\beta$ -bol (De Brabander *et al.*, 2004; Draisci *et al.*, 2003) e l'enzima che catalizza la conversione è la 17 $\beta$ -idrossisteroidodeidrogenasi. Lo stesso enzima è presente nel bovino, pertanto si ritiene che il 17 $\beta$ -bol possa essere il prodotto della conversione metabolica di ADD,

anche in questa specie (Juarez-Oropeiza *et al.*, 1995). L'utilizzo di 17 $\beta$ -bol, di esteri del 17 $\beta$ -bol (ad esempio gli esteri undecilinati) e di ADD, negli animali da reddito è vietato all'interno dell'Unione Europea. Tuttavia queste sostanze, oltre ad essere impiegate dall'uomo, possono essere somministrate a scopo illecito nel bovino come PdC e nei cavalli da corsa per aumentare le *performance* sportive. Gli esteri del 17 $\beta$ -bol sono idrolizzati a 17 $\beta$ -bol a seguito di somministrazione intramuscolare (Van Poucke e Van Peteghem, 2002); il 17 $\alpha$ -bol è considerato il principale metabolita del 17 $\beta$ -bol nelle urine di equini e di bovini ed è stato trovato insieme all'ADD e al 17 $\beta$ -bol in urine bovine, a seguito di trattamento illecito con boldenone o i suoi esteri (Van Puymbroeck *et al.*, 1998b). Tali metaboliti vengono escreti nelle urine in forma coniugata, come glucuronati (Merlanti *et al.*, 2007).

In uno studio effettuato nel 2003 eseguito nel vitello a carne bianca di 1-3 mesi di età, è stato determinato il profilo residuale urinario a seguito di trattamento con 17 $\beta$ -bol, i suoi esteri, ADD, o ancora, un'associazione di 17 $\beta$ -bol e ADD: tutti i campioni sono risultati sempre positivi per 17 $\alpha$ -bol, 17 $\beta$ -bol e ADD, ed il metabolita più rappresentato è risultato essere sempre il 17 $\alpha$ -bol. Laddove l'ADD veniva somministrato da solo, o in associazione con il 17 $\beta$ -bol, aumentava la concentrazione di 17 $\alpha$ -bol e 17 $\beta$ -bol nelle urine, dimostrando così la natura di precursore dell'ADD. Pertanto questi tre metaboliti sono stati definiti *marker* di trattamento illecito (Poelmans *et al.*, 2003). Esistono inoltre tesi contrastanti sulla possibile origine endogena del 17 $\beta$ -bol o sulla conversione, mediata da microrganismi, di fitosteroli introdotti con la dieta.

Istologicamente il 17 $\beta$ -bol può portare a degenerazione dell'epitelio germinale del testicolo, ipersecrezione e formazione di cisti nella prostata e nelle ghiandole bulbouretrali: queste lesioni sono peraltro reversibili e la loro gravità si riduce nel tempo; quindi il loro ritrovamento e la gravità delle lesioni riscontrabili al macello variano in funzione del tempo trascorso dall'ultimo trattamento (Groot e Biolatti, 2004).

Il 17 $\beta$ -bol è classificato dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro come un probabile cancerogeno nell'uomo, con un indice di cancerogenicità più alto di quello di altri androgeni quali nandrolone, stanozolo e clostebolone (De Brabander *et al.*, 2004); in merito a ciò, il 17 $\alpha$ -bol sembra giocare un ruolo nello sviluppo di carcinomi alla prostata (Baisch *et al.*, 1998).

### Estrogeni

Il 17 $\beta$ -estradiolo (E<sub>2</sub>) e l'estrone sono i principali estrogeni presenti rispettivamente negli animali non gravidi e gravidi; vengono prodotti principalmente a livello ovarico, sotto il controllo delle gonadotropine ipofisarie. L'LH stimola le cellule tecali del follicolo a secernere TST, il quale viene successivamente convertito ad E<sub>2</sub> nelle cellule della granulosa, sotto influenza dell'FSH (Kaltenbach e Dunn, 1984). In misura inferiore la sintesi degli estrogeni può avvenire anche a livello di feto e placenta (Schuler *et al.*, 2006) nonché nella corteccia surrenalica (Weng *et al.*, 2007).

Gli androgeni (essenzialmente il TST) vengono convertiti ad estrogeni per azione dell'aromatasi (CYP19), un enzima appartenente alla famiglia del CYP che, a livello ovarico, testicolare e placentare, catalizza le reazioni di rimozione del gruppo metilico in C19 e di aromatizzazione dell'anello A dello steroide

(Sanderson e Van Den Berg, 2003). L'aromatasi è espressa anche in alcuni tessuti non steroideogenici quali fegato, tessuto adiposo e sistema nervoso centrale (You, 2004).

Essendo molecole lipofile, gli estrogeni diffondono passivamente attraverso le membrane cellulari ma, una volta entrati nel circolo ematico, il loro trasporto richiede il legame con alcune proteine plasmatiche, tra le quali la SHBP (dotata di più elevata affinità) e l'albumina. Solo la frazione circolante libera degli steroidi, non legata a proteine, rappresenta quella biologicamente attiva (You, 2004).

Il meccanismo d'azione di base degli estrogeni è lo stesso di quello degli androgeni e prevede l'interazione diretta tra l'ormone (ligando) e specifici recettori per gli estrogeni (ER) presenti nelle cellule *target* (Akingbemi, 2005) e la successiva modulazione della trascrizione di specifici geni *target*.

Esistono due ER, ER $\alpha$  e ER $\beta$ , che non sono isoforme uno dell'altro ma sono il prodotto di geni distinti collocati su cromosomi separati; ER $\alpha$  e ER $\beta$  formano omodimeri e eterodimeri che hanno affinità simile per E<sub>2</sub> ma non per altri ligandi (Mutembei *et al.*, 2005). C'è una notevole specificità tissutale nell'espressione dei due recettori; infatti, ER $\alpha$  è la forma dominante e si trova in utero, fegato, tessuto adiposo, muscolo scheletrico, ipofisi e ipotalamo, mentre ER $\beta$  si trova prevalentemente in prostata, ovaio ed in alcune regioni del cervello (O'Donnel *et al.*, 2001).

Il ruolo primario degli estrogeni è da sempre considerato quello di garantire la funzionalità e lo sviluppo dell'apparato riproduttore femminile; in particolare, questi ormoni sono responsabili dell'accrescimento delle ghiandole endometriali e dei dotti della ghiandola mammaria; delle modificazioni istologiche dell'epitelio vaginale durante il ciclo estrale; della regolazione della secrezione delle gonadotropine, fra cui il rilascio pre-ovulatorio dell'LH, e del rilascio della prostaglandina F<sub>2</sub>-alpha (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) da parte dell'utero (Stabenfeldt, 2002). Tra gli altri effetti che concernono la riproduzione si annoverano l'induzione delle manifestazioni comportamentali tipiche dell'estro nella femmina e, in parte, anche nel maschio (Ball e Balthazart, 2004). Gli estrogeni svolgono funzioni importanti anche a livello testicolare, dal momento che vengono sintetizzati nelle cellule del Sertoli, sotto lo stimolo delle gonadotropine, secondo un meccanismo di regolazione endocrina simile a quello della femmina. Diversi studi hanno dimostrato che, nel topo, la delezione dei geni codificanti aromatasi e ER interferisce negativamente con la spermatogenesi e la steroidogenesi (Akingbemi, 2005).

Gli effetti aggiuntivi non strettamente attinenti alla riproduzione includono l'ossificazione e l'effetto anabolizzante a carico delle proteine (Parikka *et al.*, 2005).

I farmaci ad attività estrogenica impiegati nel bovino sono per lo più costituiti da esteri sintetici dell'estradiolo, quali l'estradiolo benzoato, il valerato ed il *p*-idrossibenzoato. Dopo somministrazione per via parenterale, tali esteri vengono rapidamente assorbiti, convertiti in estradiolo tramite idrolisi, metabolizzati ed escreti, in maniera analoga all'ormone naturale. Nei ruminanti, il metabolita principale è il 17 $\alpha$ -estradiolo, la cui escrezione avviene per via biliare e fecale (>75%: EMEA, CVMP-oestradiol, 1999). Nell'ambito della medicina veterinaria, l'uso terapeutico degli estrogeni negli animali destinati alla produzione di alimenti per l'uomo, è regolamentato dal D.L.vo 158/06 che prevede due deroghe rispetto al divieto di utilizzazione delle sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze beta-agoniste (art.2 e

art.3): in tale decreto si afferma che è possibile la somministrazione di medicinali veterinari contenenti E<sub>2</sub> e/o suoi derivati sottoforma di esteri “per il trattamento di macerazione o mummificazione fetale dei bovini o della piometra per i bovini” (art.4, comma 1, d) oppure per “l’induzione dell’estro nei bovini, negli equini, negli ovini e nei caprini, fino al 14 ottobre 2006” (art.5, comma 1, c). Attualmente, quindi, l’unico utilizzo consentito è quello contemplato dall’articolo 4.

Come tutti gli ormoni sessuali steroidei utilizzati come PdC, gli estrogeni stimolano l’accrescimento tramite un’azione diretta sulle cellule muscolari, in particolare mediante una modulazione della trascrizione di specifici geni che esita in un incremento della sintesi proteica e nell’aumento del volume delle masse muscolari (Schmidely, 1993). La capacità degli estrogeni di promuovere la crescita varia tra lo 0% e il 20%, in quanto strettamente dipendente da diversi parametri quali specie, razza, sesso, età, stato riproduttivo e regime alimentare dell’animale oggetto di trattamento (Meyer, 2001). L’E<sub>2</sub> manifesta un ulteriore effetto auxinico, che consegue alla sua azione indiretta di modificazione dell’attività di ormoni coinvolti nei meccanismi di regolazione della crescita, quali l’ormone della crescita (GH) e l’*insulin-like growth factor I* (IGF-I). L’interazione tra gli estrogeni e l’ipofisi anteriore è classicamente considerato come il principale meccanismo responsabile della loro azione anabolizzante; infatti, bovini da carne trattati con estrogeni o composti estrogeno-simili nella fase di finissaggio hanno evidenziato, rispetto ai soggetti di controllo, un incremento del peso dell’ipofisi, delle dimensioni e del numero delle cellule acidofile (responsabili della produzione e della secrezione del GH) e conseguentemente, delle concentrazioni plasmatiche di GH (Griffin, 1999). Uno studio di Kamanga-Sollo *et al.* (2004), in cui colture cellulari primarie ottenute dal muscolo semimembranoso di bovino sono state incubate con E<sub>2</sub>, hanno evidenziato un aumento dei profili di espressione genica dell’IGF-I, di ER $\alpha$  e dell’IGF *binding-protein* 3.

Nei Paesi in cui l’uso di questi composti è consentito, la somministrazione avviene tramite impianti sottocutanei (inseriti nel sottocute dell’orecchio ed in prossimità dei vasi venosi di maggior calibro).

Teoricamente, la massima assunzione giornaliera (*Total Maximum Daily Intake*, TMDI) di E<sub>2</sub> è pari a 4.3 ng; questo dato consegue al fatto che estrogeni e/o loro metaboliti sono normalmente presenti negli alimenti di origine animale, in quantità che variano a seconda di specie, sesso, età, alimentazione e stato fisiologico dell’animale di origine. E’ stato dimostrato che conseguentemente all’uso di PdC a base di E<sub>2</sub>, la TMDI può aumentare di un fattore pari a 4.6 (Daxenberger *et al.*, 2001).

Questi ormoni palesano un effetto cancerogenico, provocando neoplasie alle ghiandole mammaria ed endometriali, in quanto stimolano la proliferazione tissutale e si comportano come pro-cancerogeni in grado di indurre genotossicità (Tsuchiya *et al.*, 2005); nello specifico sembra che alcuni metaboliti degli estrogeni (in particolare i catecol estrogeni), dopo ossidazione e la formazione di chinoni e semichinoni, possano interagire con il DNA, determinando la formazione delle mutazioni responsabili della comparsa del tumore mammario (Zhang *et al.*, 2007).

## Glucocorticoidi

I glucocorticoidi sono ormoni steroidei prodotti nella zona fascicolata della corteccia surrenale, consecutivamente all'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Tale attivazione richiede l'increzione, a livello ipotalamico, del fattore di rilascio della corticotropina (CRH) e, a posteriori, il rilascio dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) da parte dell'ipofisi anteriore, il cui *target* è rappresentato dalla corteccia del surrene. I glucocorticoidi intervengono in questo meccanismo di controllo, stabilendo un *feedback* negativo; in particolare, inibiscono l'espressione (a livello genico) e l'increzione del CRH a livello ipotalamico ed interferiscono con l'increzione di ACTH a livello dell'ipofisi (Vegiopoulos e Herzig, 2007).

I principali glucocorticoidi naturali sono il cortisolo, il cortisone e l'11-deidrocorticosterone.

Questi ormoni esplicano le loro principali funzioni grazie all'interazione con uno specifico recettore citoplasmatico, il GR. Il legame tra il ligando ed il recettore provoca la conversione di quest'ultimo dalla forma inattiva a quella attiva, per esposizione del sito di legame con il DNA del recettore stesso, che consegue alla sua dissociazione dalla *heat shock protein 90* (HSP-90). Nella forma attiva, il complesso ormone-recettore può entrare nel nucleo, legarsi al DNA e, quindi, regolare la trascrizione di geni *target* (Derendorf e Hochhaus, 1995).

Gli effetti ormonali che derivano dai suddetti fenomeni richiedono tempi prolungati prima di palesarsi, in quanto conseguenti ad una sintesi *ex novo* di RNA e, quindi, di proteine. Parallelamente a questo meccanismo d'azione i glucocorticoidi, analogamente ad altri ormoni steroidei, ne possiedono un secondo, più rapido e non di natura genica attraverso il quale influenzano la concentrazione di alcuni ioni a livello intracellulare (Scheller e Sekeris, 2003).

I glucocorticoidi modulano fisiologicamente il metabolismo glucidico, protidico e lipidico. A livello epatico, il cortisolo stimola la deposizione di glicogeno e attiva la gluconeogenesi, grazie ad un incremento della trascrizione di enzimi come la glucosio-6-fosfatasi e la fosfoenolpiruvato carbossichinasi (The Merck Veterinary Manual, 2007); infatti, studi condotti su topi *knock out* per GR, hanno evidenziato una *down-regulation* dei geni codificanti gli enzimi gluconeogenetici (Opherk *et al.*, 2004).

Nei tessuti periferici questi ormoni stimolano da un lato il catabolismo proteico e la lipolisi, rilasciando glicerolo ed aminoacidi, che fungono da substrati per la gluconeogenesi; dall'altro, inducono insulino-resistenza, soprattutto nel muscolo e nel tessuto adiposo, determinando la comparsa di uno stato di iperglicemia (The Merck Veterinary Manual, 2007). Gli effetti metabolici dei glucocorticoidi si manifestano prevalentemente negli animali stressati, con deficit di insulina o a digiuno, e non in soggetti alimentati correttamente (Dickson, 2002).

I glucocorticoidi manifestano anche un'importante azione antinfiammatoria: infatti, aumentano la produzione di proteine come la lipocortina, che inibisce l'enzima fosfolipasi A<sub>2</sub> (responsabile della sintesi dell'acido arachidonico) e quindi, indirettamente, diminuiscono la produzione di prostaglandine e leucotrieni. Inoltre, intervenendo a monte del processo infiammatorio, interferiscono negativamente nella produzione di altri mediatori (cicloossigenasi, citochine, istamina, interleuchine ed enzimi come le collagenasi: The Merck Veterinary Manual, 2007).

Durante le flogosi acute, i glucocorticoidi diminuiscono la permeabilità vascolare ed inibiscono la migrazione dei leucociti polimorfonucleati nei tessuti; sopprimono l'immunità cellulo-mediata inducendo l'apoptosi delle cellule linfoidi, inibendo l'espansione clonale dei linfociti T e B nonché riducendo il numero di eosinofili, basofili e monociti circolanti. Nelle fasi finali del processo infiammatorio interferiscono con l'attività dei linfoblasti, ritardando i normali processi di cicatrizzazione tissutale (The Merck Veterinary Manual, 2007). In aggiunta, questi ormoni influiscono sui meccanismi di assorbimento del glucosio e del calcio a livello gastroenterico (Van Cromphaut *et al.*, 2007); hanno un effetto luteoprotettivo, poiché inibiscono selettivamente la produzione della PGF<sub>2α</sub> a livello endometriale (Lee *et al.*, 2007); inducono polidipsia e poliuria, aumentando la filtrazione glomerulare e potenziando l'azione centrale dell'aldosterone e dell'angiotensina II.

Tutti i corticosteroidi di sintesi utilizzati a scopo terapeutico possiedono una struttura molecolare con 21 atomi di carbonio, analoga a quella del cortisolo, e sono stati prodotti con lo scopo di incrementare le proprietà antinfiammatorie e metaboliche del composto originario nonché per aumentarne l'affinità di legame con le proteine e, quindi, la durata d'azione (The Merck Veterinary Manual, 2007). Il potenziamento dell'effetto glucocorticoide dei corticosteroidi sintetici si ottiene mediante formazione di un doppio legame in posizione 1 e 2, l'idrossilazione o la metilazione dell'atomo di carbonio in posizione 16 oppure l'alogenazione di quelli in posizione 6 e/o 9 (Courtheyn *et al.*, 2002).

I principali glucocorticoidi di sintesi sono prednisone, prednisolone, betametasone, DEX e flucortisolo. In particolare, il DEX è un potente corticosteroide che presenta un'elevata affinità per il GR e che, dopo somministrazione per via orale, viene ben assorbito con una biodisponibilità pari a circa l'80%. I suoi esteri (i.e. fosfato e succinato), essendo idrosolubili, raggiungono la concentrazione massima in circolo dopo 10 minuti dalla somministrazione per via endovenosa (Derendorf e Hochhaus, 1995). In tutte le specie, il DEX, per essere eliminato, viene dapprima idrossilato in posizione 6β e quindi eliminato con le urine e le feci (EMEA, CVMP-dexamethasone, 2004).

Le indicazioni terapeutiche sono molteplici e richiedono, in generale, trattamenti locali o sistemici. In particolare, le specialità medicinali contenenti DEX vengono impiegate per il trattamento di processi infiammatori (artriti, borsiti, tendiniti, tenosinoviti, periartriti), chetosi primarie, paresi puerperali atipiche, enfisema polmonare, sindromi allergiche, affezioni cutanee, malattie degli edemi dei suinetti, stress (da cattura, da trasporto, da modificazione dei gruppi e dei regimi alimentari, climatici, da trattamenti antiparassitari e vaccinazioni) e per gli stati di *shock* di genesi e natura diversi (Dizionario del Medicinale Veterinario, 2003).

La somministrazione di elevate dosi di glucocorticoidi di sintesi agli animali provoca una riduzione dell'accrescimento ed atrofia muscolare. L'induzione del catabolismo, a livello muscolare, è giustificato dall'incremento del fabbisogno di substrati gluconeogenetici nonché di energia che si riscontra in condizioni di stress, quali periodi di digiuno prolungato, presenza di processi infettivi o neoplastici. Il tessuto muscolare costituisce infatti il 40% della massa corporea totale e quindi, rappresenta un'importante fonte di aminoacidi per la sintesi proteica e la produzione energetica nell'animale. Inoltre, la capacità dei glucocorticoidi di

inibire l'utilizzazione del glucosio a livello muscolare aumenta indirettamente le concentrazioni dello stesso in altri tessuti come cervello, sistema immunitario e tessuto tumorale (Vegiopoulos e Herzig, 2007).

Studi condotti su ratti adrenalectomizzati hanno dimostrato che la somministrazione esogena di corticosterone, se il trattamento avviene con un dosaggio simile a quello fisiologico, non modifica la capacità di accrescimento dei roditori; quindi, solo in presenza di concentrazioni plasmatiche dello steroide sovrapponibili a quelle riscontrate negli stati di stress, aumenta il catabolismo proteico e conseguentemente, viene inibita la crescita (Young, 1980).

Inoltre, studi successivi, hanno evidenziato come la somministrazione di DEX negli animali da reddito e a dosaggi ridotti, subterapeutici, aumenti l'ingestione di alimento e conseguentemente il peso corporeo, diminuisca gli indici di conversione e la ritenzione azotata, aumenti la ritenzione di acqua ed infine limiti la deposizione di grasso (Istasse *et al.*, 1989).

Conseguentemente, questi ormoni, utilizzati singolarmente e a basse dosi, sono i composti attualmente più sfruttati in Europa per ottenere illegalmente un miglioramento delle *performances* produttive degli animali in allevamento. In origine invece, i glucocorticoidi si usavano in associazione con i beta-agonisti e gli steroidi sessuali, per impedire la *down-regulation* dei recettori o per interferire sulla qualità della carne, aumentandone il contenuto di acqua (Courtheyn *et al.*, 2002); la presenza dei glucocorticoidi nelle preparazioni illegali contenenti beta-agonisti e stroidi sessuali sembra infatti aumentare l'effetto ripartitivo e anabolizzante di questi ultimi (Abraham *et al.*, 2004), in particolare impedendo una diminuzione del numero di recettori  $\beta$ -adrenergici, nonché alterando l'escrezione degli stessi beta-agonisti (Groot *et al.*, 1998; Abraham *et al.*, 2004).

Il DEX e gli altri corticosteroidi non possono essere somministrati a scopo auxinico agli animali da reddito all'interno del territorio dell'Unione Europea, ma sono invece ampiamente sfruttati in campo terapeutico per le loro proprietà antinfiammatorie; sono stati perciò stabiliti per queste sostanze, dei tempi di sospensione, pari a 60 giorni per la carne di bovini trattati con DEX nonché dei limiti massimi residuali (LMR), stabiliti dal Regolamento 2377/90/CE.

La tabella 1.8.1 riporta i valori di riferimento dei LMR per il latte ed altre matrici alimentari in diverse specie.

| <b>Principio attivo</b> | <b>Specie animale</b> | <b>Tessuto</b> | <b>LMR (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b> |
|-------------------------|-----------------------|----------------|---|
| Desametazone            | Bovino                | Muscolo        | 0.75  |
|                         | Suino                 | Fegato         | 2.0   |
|                         | Equino                | Rene           | 0.75  |
|                         | Bovino                | Latte          | 0.3   |

Tabella 1.8.1: Limiti massimi residuali (LMR) rinvenibili nel latte ed in altre matrici alimentari in animali appartenenti alle specie bovina, suine ed equina.

## 1.9. Tecniche bio-molecolari

### Clonaggio

I progressi nelle tecniche usate per manipolare gli acidi nucleici *in vitro* hanno aumentato considerevolmente la comprensione della struttura e della funzione dei geni a livello molecolare. Inoltre, queste tecniche possono essere usate per modificare il genoma di un organismo (ingegneria genetica), ad esempio per creare un batterio capace di sintetizzare una proteina estranea. I metodi sono spesso chiamati “tecnologia del DNA ricombinante” perché comportano la creazione di nuove combinazioni di DNA (cioè DNA ricombinante) in condizioni controllate di laboratorio.

In generale queste metodiche prevedono i seguenti passaggi:

- l'isolamento della sequenza di DNA (gene) di interesse dal genoma di un organismo o da una libreria di geni: ciò comporta in genere la purificazione del DNA seguita da digestione enzimatica o frammentazione meccanica per liberare la sequenza bersaglio di DNA;
- creazione di una molecola artificiale di DNA ricombinante mediante inserzione del gene (oggetto di studio) in una molecola di DNA capace di replicarsi in una cellula ospite, cioè un “vettore di clonaggio”: tra i vettori di clonaggio adatti alle cellule batteriche si annoverano i plasmidi ed i batteriofagi;
- introduzione della molecola di DNA ricombinante in un ospite adatto, ad esempio *E. coli*: questo processo viene definito trasformazione, quando si usa un plasmide, o trasfezione, nel caso di un vettore virale ricombinante;
- selezione e crescita della cellula trasformata (o trasfettata) usando le tecniche di coltura cellulare: poiché una singola cellula ospite trasformata può essere fatta crescere per dare un clone di cellule geneticamente identiche, ciascuna delle quali porta il gene di interesse, la tecnica è spesso chiamata “clonazione del gene” o “clonazione molecolare” (Reed *et al.*, 2002).

Passiamo ora a descrivere più nel dettaglio ciascuna delle fasi sopra enunciate.

Per ottenere la purificazione del DNA plasmidico da cellule batteriche per il clonaggio, è necessario prima digerire la parete cellulare, poi solubilizzare le membrane cellulari e denaturare parzialmente le proteine, far aggregare il DNA cromosomico, purificare chimicamente la soluzione (di solito si usa una soluzione di fenolo/cloroformio) ed infine far precipitare il DNA con una soluzione etanolo:acqua al 70% (v/v). Successivamente deve essere preparato il DNA da clonare.

Per produrre frammenti lineari di DNA con “estremità appiccicose” a singolo filamento (necessarie per l'inserimento nel vettore plasmidico) si possono usare le endonucleasi di restrizione: la maggior parte delle preparazioni commerciali di questi enzimi taglia completamente un campione di DNA producendo dei frammenti di DNA entro un'ora a 37°C. La predizione della posizione dei singoli siti di restrizione può essere usata per creare una mappa di restrizione diagnostica per una molecola di DNA ed anche per un vettore plasmidico di clonaggio, come riportato in figura 1.9.1.

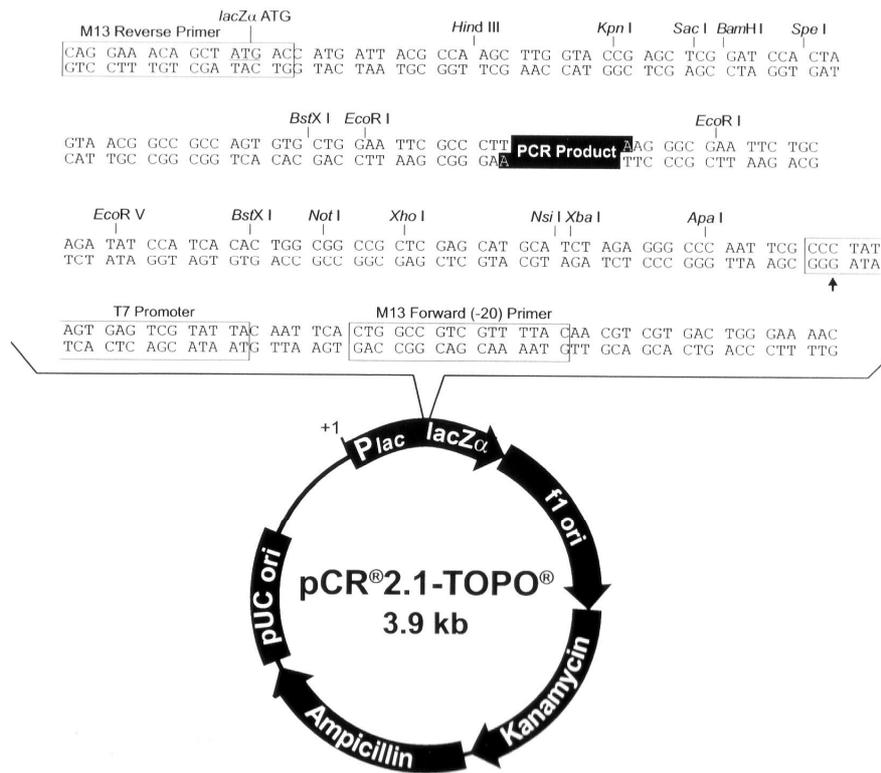


Figura 1.9.1: Rappresentazione schematica del vettore pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen) con la sequenza codificante per il gene lacZ, con i siti di restrizione e la regione in cui viene inserito il gene da clonare (in questo caso prodotto mediante PCR); si possono inoltre notare i geni codificanti per la resistenza agli antibiotici ampicillina e kanamicina.

Un'ulteriore caratteristica importante è che, in condizioni appropriate, due frammenti qualunque tagliati con lo stesso enzima possono appaiarsi in seguito a formazione di ponti idrogeno fra singole basi all'interno di questa regione, il che permette di unirli insieme indipendentemente dalla provenienza dei due frammenti di restrizione. Per costruire poi una molecola di DNA ricombinante, deve essere legato un vettore adatto al frammento di DNA da clonare: ciò viene effettuato utilizzando un enzima microbico, la DNA ligasi: questo enzima ATP-dipendente è capace di formare legami fosfodiesteri covalenti fra molecole di DNA appaiate. La legatura di solito si esegue a temperature più basse (per favorire l'appaiamento) e per un periodo di tempo di parecchie ore (per permettere all'enzima di operare: vedi figura 1.9.2).

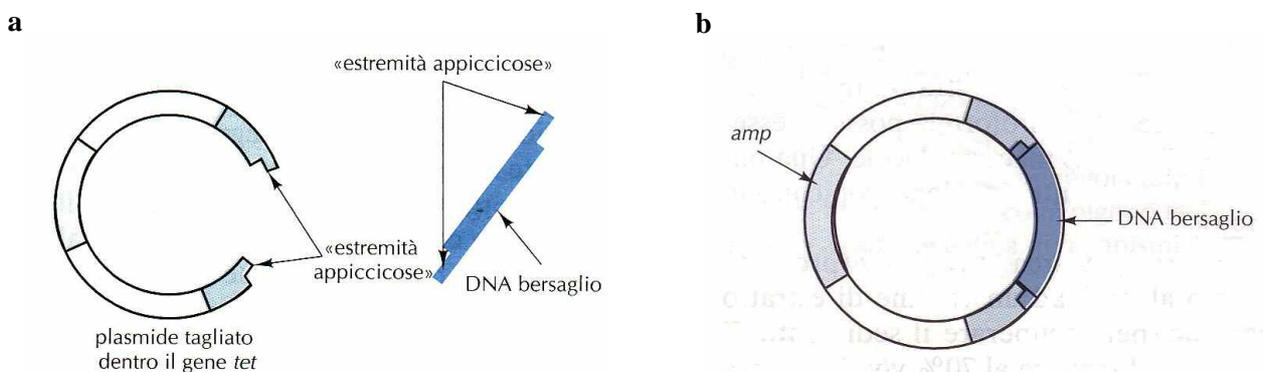


Figura 1.9.2: (a) Restrizione di DNA plasmidico ed estraneo con l'endonucleasi HindIII; (b) Appaiamento e legatura di DNA plasmidico e bersaglio per dare origine ad un plasmide ricombinante che conferisce resistenza soltanto ad ampicillina, in quanto il DNA bersaglio è stato inserito all'interno del gene tet (conferisce resistenza alla tetraciclina), che ora è discontinuo e inattivo (Reed *et al.*, 2002).

Quando si deve selezionare un vettore adatto, tra plasmidi, fagi, cosmidi ed altri, è necessario considerare le seguenti caratteristiche:

- la facilità di purificazione: sono stati sviluppati infatti procedimenti affidabili che permettono l'estrazione e la purificazione di DNA plasmidico da cellule batteriche;
- l'efficienza di inserzione del vettore ricombinante in una nuova cellula ospite;
- la presenza di copie singole di siti di restrizione adatti;
- la presenza di *marker* selezionabili, come geni di resistenza ad antibiotici o "geni *reporter*";
- le dimensioni dell'inserito di DNA da clonare;
- il numero di copie del vettore nella cellula ospite.

I vettori di clonaggio batterici più semplici sono quelli basati su piccoli plasmidi, molecole circolari di DNA, capaci di replicare autonomamente all'interno di una cellula batterica. Uno dei primi vettori di clonaggio sviluppato per *E. coli* è stato BR322, un plasmide ingegnerizzato geneticamente di 4.4 kb che conteneva un'origine di replicazione, due geni di resistenza agli antibiotici e siti singoli per una gamma di enzimi di restrizione. Successivamente sono stati sviluppati altri vettori plasmidici, con caratteristiche ulteriori: per esempio i plasmidi della serie pUC sono oggi largamente usati per la trasformazione di *E. coli*, perché hanno sui tipi precedenti i seguenti vantaggi:

- alto numero di copie: in una cellula batterica possono essere presenti migliaia di copie del plasmide, il che determina una maggiore resa di DNA plasmidico;
- selezione dei ricombinanti in un singolo passaggio usando il gene *lacZ*;
- raggruppamento di siti di restrizione all'interno di una breve regione del gene *lacZ*: la restrizione con due enzimi (doppia digestione) taglia un piccolo frammento da questo "sito multiplo di clonaggio" o "*polylinker*", producendo un plasmide tagliato con due estremità appiccicose diverse (ad esempio EcoRI ad un'estremità e HindIII all'altra), il che permette di legare in un particolare orientamento frammenti complementari di DNA bersaglio ("clonaggio direzionale").

I vettori fagici invece possono offrire diversi vantaggi rispetto ai vettori plasmidici: sono stati ingegnerizzati per accettare grossi frammenti di DNA estraneo, anche più di 10 kb, mentre i plasmidi funzionano con frammenti di 1-2 kb; sfruttano un meccanismo molto simile alla trasduzione fagica per inserire il DNA estraneo nella cellula ospite. Dal fago  $\lambda$  di *E. coli* sono stati sviluppati diversi vettori, per esempio  $\lambda$ ZAPII, un vettore di inserzione capace di accettare fino a 10 kb di DNA aggiuntivo che possiede il gene *lacZ* e un sito di clonaggio multiplo per la selezione. La maggior parte dei vettori basati sul  $\lambda$  sono fagi virulenti, rilasciati per lisi dalla cellula infettata alla fine della fase di replicazione: questi vettori vengono clonati usando tecniche standard per i fagi; in alcuni casi invece si deve usare un secondo fago (un fago *helper*) insieme al vettore, per svolgere alcune delle funzioni tolte al genoma del vettore, ad esempio confezionamento del fago e funzioni di assemblaggio (Reed *et al.*, 2002).

I vettori cosmidici contengono le sequenze terminali coesive a singolo filamento del fago  $\lambda$  (cosiddetti siti "cos") inseriti in un vettore di clonaggio plasmidico. Essi possono essere usati per clonare fino a 40 kb di DNA estraneo, usando i siti cos per permettere il confezionamento *in vitro* nell'involucro del fago  $\lambda$ .

Altri vettori ibridi sono stati prodotti mediante fusione di un fago con un vettore plasmidico: questi possono essere manipolati in laboratorio come plasmidi per la facilità dell'inserzione di DNA o convertiti in forma articolata similfagica per la facilità di conservazione.

Una volta che è stato prodotto *in vitro* un vettore ricombinante, questo deve essere introdotto in una cellula ospite adatta. I vettori fagici confezionati hanno un proprio meccanismo di trasferimento, mentre il DNA fagico nudo ed i plasmidi devono essere introdotti mediante trattamenti che causano un aumento temporaneo della permeabilità di membrana, come lo *shock* fisico-chimico (temperatura o  $\text{CaCl}_2$ ), elettroporazione con *shock* elettrico o microiniezione.

Molti vettori plasmidici usati in ingegneria genetica portano geni che codificano per la resistenza ad un antibiotico, come per esempio pBR322 presenta geni distinti per la resistenza all'ampicillina e alla tetraciclina. Questi geni agiscono come *marker* per il vettore, permettendo così di selezionare i trasformanti, che possono crescere su agar contenente l'antibiotico. Per quei geni il cui prodotto è un enzima, la presenza o l'assenza del gene funzionante può essere valutata usando un substrato adatto, per esempio l'inattivazione inserzionale di *lacZ* può essere rivelata includendo un induttore adatto alla beta-galattosidasi (ad esempio isopropiltiogalattoside, IPTG) e il substrato cromogenico 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galattoside (Xgal) dentro l'agar: una colonia trasformante derivata dal plasmide nativo sarà blu mentre un trasformante contenente la molecola ricombinante crescerà producendo una colonia bianca (Reed *et al.*, 2002).

### **Real Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (Q RT-PCR)**

La *Real Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* è una metodica innovativa largamente utilizzata per la quantificazione di acidi nucleici, in particolare per il rilevamento di basse concentrazioni di RNA spesso ottenute da matrici limitate e problematiche (Bustin, 2000), e grazie alla sua elevata sensibilità, specificità e riproducibilità, è divenuta uno strumento essenziale nella ricerca: è la tecnica infatti più comunemente adottata per caratterizzare o confermare i *pattern* di espressione di un dato gene o per confrontare i livelli di mRNA di più popolazioni di campioni.

Tale metodica si è evoluta dalla *polymerase chain reaction* classica (*PCR end point*), messa a punto nella metà degli anni '80 da Mullis *et al.* (1986), che consente di amplificare *in vitro* mediante una reazione enzimatica in un termociclatore uno o più specifici segmenti di DNA situati tra due sequenze oligonucleotidiche note, producendone un elevato numero di copie attraverso un ciclo di reazioni di denaturazione del DNA, ibridazione degli inneschi (*primers*) e polimerizzazione dei nuovi filamenti.

La PCR classica viene effettuata su un campione di DNA-stampo (detto *templato*), che può essere a singolo o a doppio filamento. All'inizio di ogni ciclo, il DNA genomico è soggetto a denaturazione mediante riscaldamento a 93-95°C; questa temperatura determina la rottura dei legami idrogeno tra le basi azotate e la separazione dei due filamenti della doppia elica. Segue il raffreddamento ad una temperatura tra 37 e 55°C, in funzione della lunghezza dei *primers*, che ne permette l'ibridazione sul DNA stampo secondo il principio della complementarità tra le basi. A conclusione di ogni ciclo, l'enzima, una polimerasi termostabile, in presenza di deossiribonucleotidi trifosfati (dNTPs) e alla temperatura di 72°C, catalizza la sintesi di un

nuovo filamento di DNA complementare a quello stampo. In questo modo, alla fine di ogni ciclo di reazioni, la quantità di molecole di DNA presenti risulta teoricamente duplicato e quindi il numero di copie aumenta in modo esponenziale ciclo dopo ciclo.

L'introduzione della Q RT-PCR nel 1992 per opera di Higuchi e collaboratori ha permesso di superare una serie di limiti legati alla tradizionale PCR quali scarsa precisione, bassa sensibilità e risoluzione; a differenza infatti della PCR *end point*, che permette di analizzare il prodotto amplificato solo al termine della reazione mediante elettroforesi su gel oppure *Southern blotting*, la Q RT-PCR consente di seguire la reazione in tempo reale fin dalle prime fasi dell'amplificazione determinando, ad ogni ciclo, la quantità di amplificato ottenuto, grazie infatti all'utilizzo di un marcatore (*reporter*) fluorescente. Dal grafico "fluorescenza vs numero del ciclo", che riporta il segnale del *reporter*, si possono distinguere quattro fasi principali: fase di crescita lineare (solitamente corrisponde ai primi 10-15 cicli) in cui il segnale è troppo debole per poter essere distinto dal rumore di fondo (*background*), fase esponenziale iniziale in cui la fluorescenza ha raggiunto la soglia ed è diventata significativamente più alta del livello di *background*, fase logaritmica in cui l'amplificazione diviene ottimale (la cinetica di reazione assume un andamento esponenziale nel quale, assumendo un'efficienza di reazione del 100%, ad ogni ciclo la quantità di amplificato raddoppia) e infine fase di *plateau*, raggiunta quando i reagenti iniziano a scarseggiare e l'intensità di fluorescenza non è più considerata per il calcolo dei dati (Wong e Medrano, 2005). La figura 1.9.3 rappresenta le fasi della curva di amplificazione.

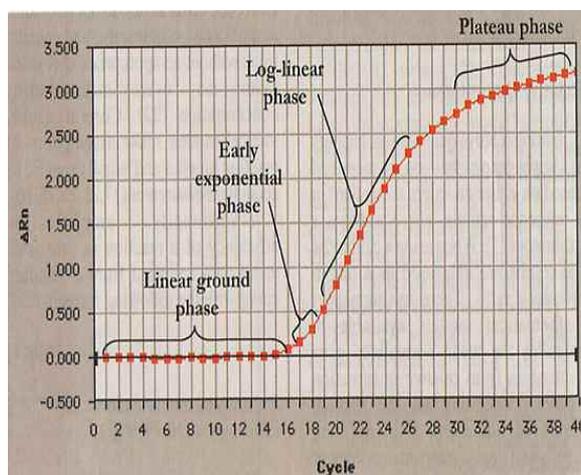


Figura 1.9.3: Fasi della curva di amplificazione mediante PCR (Wong e Medrano, 2005)

Durante i primi 15-18 cicli di PCR le emissioni di fluorescenza generano un segnale troppo debole per distinguersi dal *background*: in questa fase viene definita la linea di base (*baseline*); un incremento della fluorescenza al di sopra di tale livello indica la formazione di prodotto. Nella fase di amplificazione esponenziale viene fissato automaticamente o manualmente un valore soglia di fluorescenza (*threshold*), generalmente pari a 10 volte la deviazione standard del segnale di *background*, da cui si ricava il valore di Ct (*threshold cycle*) che rappresenta il numero di cicli necessari affinché il campione in esame raggiunga tale livello di fluorescenza (Ginzinger, 2002: vedi figura 1.9.4). Il valore di Ct è inversamente proporzionale alla

quantità di DNA di partenza per cui più elevato è il titolo iniziale di DNA, prima salirà la curva e più basso sarà il Ct (Kubista *et al.*, 2006).

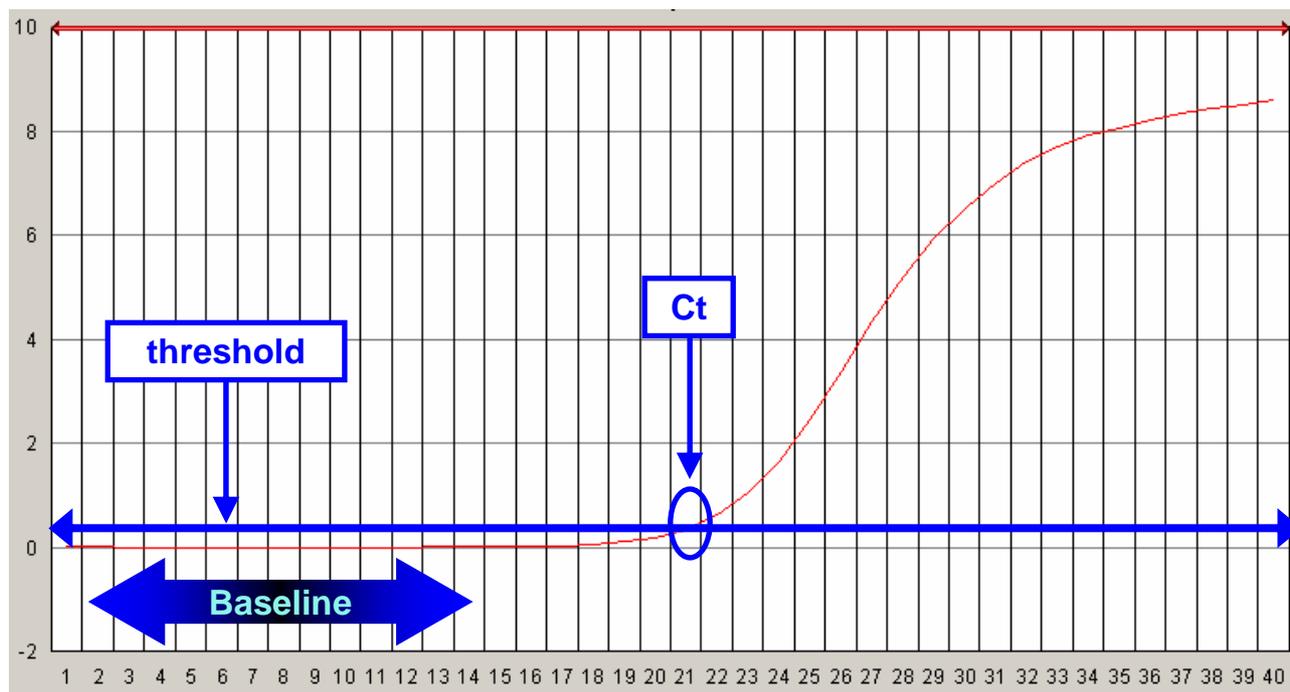


Figura 1.9.4: Grafico della curva di Real Time PCR (fluorescenza vs numero di cicli). Sono rappresentati la *baseline*, il valore soglia di fluorescenza (*threshold*) ed il punto (Ct) in cui la curva sigmoide incrocia questa retta che definisce il livello soglia di fluorescenza.

Per definire la soglia sono disponibili vari *software* basati su diversi modelli matematici; molto spesso però la scelta è arbitraria, poiché occorre considerare le molteplici caratteristiche della strumentazione in utilizzo (Kubista *et al.*, 2006).

Questo sistema prevede inoltre che le fasi di amplificazione e rilevazione siano combinate in un sistema chiuso che evita i passaggi di post-PCR, riducendo la variabilità ed i rischi di contaminazione che possono compromettere la PCR classica. I vantaggi di questa metodica sono dunque molteplici:

- capacità di unire al potenziale qualitativo della PCR tradizionale, un'analisi quantitativa per tutta la sua durata;
- elevata sensibilità e specificità del metodo che consente di rilevare anche una singola copia di acido nucleico (Palmer *et al.*, 2003);
- ampio *range* dinamico che permette un chiaro confronto tra mRNAs che differiscono abbondantemente nella loro concentrazione (Morrison *et al.*, 1998);
- assenza di manipolazioni post-PCR.

Rispetto ad altri metodi che permettono di quantificare la trascrizione di una sequenza (*Northern blot*, ibridazione *in situ*, saggi con RNasi e *array* a cDNA), la Q RT-PCR è in assoluto la tecnica più sensibile. Tuttavia è proprio questa elevata sensibilità che può portare, a livello pratico, all'introduzione di errori sperimentali, che possono essere dovuti alla presenza di inibitori nella matrice complessa del campione (di conseguenza è molto importante la preparazione dell'analita), alla scelta dei *primers*, compresi quelli per la

retrotrascrizione, alla selezione della trascrittasi inversa, ma anche alla definizione del saggio, ai reagenti e strumenti di PCR usati ed infine, all'errore umano (Wong e Medrano, 2005).

La preparazione del campione è dunque molto importante, poiché l'acquisizione dello stesso e la purificazione del suo RNA costituiscono la prima fase dell'intera analisi e la qualità del template è forse il determinante più importante per la riproducibilità e la rilevanza biologica dei risultati. L'accuratezza della valutazione dell'espressione genica, è infatti, influenzata dalla quantità e dalla qualità dell'RNA di partenza (Bustin e Nolan, 2004); l'RNA, e soprattutto frammenti di mRNA più lunghi di 10 kb, al contrario del DNA, sono estremamente delicati una volta rimossi dall'ambiente cellulare, perciò la loro estrazione è complicata e il template deve essere di alta qualità per consentire di ottenere dati quantitativi rilevanti.

L'RNA totale ottenuto dalla procedura di estrazione e purificazione, infatti, deve essere libero da proteine, DNA genomico, inibitori enzimatici della retrotrascrizione e della PCR (per esempio sali, alcool, fenolo), nucleasi o qualsiasi sostanza che funga da cofattore di reazione ( $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ ) e non deve essere degradato (il rapporto 28S:18S dovrebbe essere 2:1).

### Trascrizione inversa

Negli studi di espressione genica si lavora con RNA; occorre pertanto una fase aggiuntiva iniziale di retrotrascrizione dell'RNA in cDNA, eseguita solitamente tra i 40 e i 50 °C, mediata da una trascrittasi inversa, in un processo che viene denominato *Real Time reverse transcription polymerase chain reaction*. In commercio sono disponibili diverse retrotrascrittasi, compresi *mix* di enzimi; tra le più note ci sono la MMLV (*Moloney Murine Leucemia Virus*) e la AMV (*Avian Myeloblastosis Virus*), aventi differenti dimensioni e temperature ottimali (Kubista *et al.*, 2006).

Si distinguono due tipi di Q RT-PCR (Bustin, 2000):

- *single step*: la trascrizione inversa e l'amplificazione avvengono in unico tubo (due enzimi/un tubo) ed il *primer forward* viene aggiunto a retrotrascrizione terminata, riducendo così il rischio di formazione di dimeri di *primers* e massimizzando la sensibilità dell'analisi; si può anche utilizzare un unico enzima (un enzima/un tubo) capace di effettuare entrambe le reazioni;
- *two steps*: la retrotrascrizione e l'amplificazione avvengono in due fasi successive ed in due tubi differenti, utilizzando rispettivamente una DNA-polimerasi RNA-dipendente e una DNA-polimerasi DNA-dipendente (due enzimi/due tubi); ciò consente di generare un *pool* di cDNA stabile e virtualmente conservabile in modo indefinito.

Per la scelta dei *primers* possono essere adottate diverse strategie (Bustin *et al.*, 2005; Kubista *et al.*, 2006):

- oligo(dT): sono complementari alla coda poli(A) presente all'estremità 3' dell'RNA messaggero eucariotico, perciò non permettono di amplificare rRNA né tRNA;
- sequenze *random* (esameri o ottametri): permettono di copiare tutti gli RNA (messaggeri, ribosomiali e transfer); è il metodo di elezione per lo studio di molti geni, inoltre le sequenze *random* rappresentano la strategia più economica;

- *primers* specifici per il gene di interesse: rappresentano la miglior strategia da adottare se si desidera analizzare solo un limitato numero di mRNA (Wang e Seed, 2003).

### Le chimiche di rilevazione

I sistemi odierni per la rilevazione degli ampliconi si basano sull'utilizzo di coloranti intercalanti non tossici o sonde fluorescenti specifiche, che, legandosi all'acido nucleico, emettono un segnale luminoso che aumenta in modo proporzionale all'aumentare dei prodotti di reazione (Kubista *et al.*, 2006).

I coloranti aspecifici maggiormente utilizzati sono i derivati asimmetrici del cianuro, come gli intercalanti SYBR Green e 4',6-diamidino-2-fenilindolo, che si legano saldamente al solco minore nelle regioni ricche di AT e si intercalano in quelle ricche in GC (Wilson *et al.*, 1990), ma anche SYTOX Orange (Yan *et al.*, 2000) e PicoGreen (Zipper *et al.*, 2004), arancio tiazolo, giallo oxazolo e il suo dimero (Larsson *et al.*, 1995), che si legano sia internamente che esternamente (solco minore) al dsDNA, ed infine coloranti asimmetrici che si legano al solco minore del DNA, come BETO e BOXTO (Eriksson *et al.*, 2003; Karlsson *et al.*, 2003). Questi *reporter* sono scarsamente o per nulla fluorescenti quando sono liberi in soluzione, ma lo diventano se legati al DNA a doppio filamento; quando monitorati in Q RT-PCR, permettono infatti di rilevare un aumento del segnale di fluorescenza durante la fase di polimerizzazione ed una riduzione dell'emissione durante la denaturazione. Nella PCR, la fluorescenza di questi marcatori aumenta con l'aumentare della quantità di prodotto a doppio filamento neosintetizzato.

Sin dalla sua introduzione nei primi anni '90, SYBR Green I è stato applicato con successo in numerose tecniche analitiche, compresa la Q RT-PCR (Zipper *et al.*, 2004), consentendo di superare la necessità di sonde fluorescenti *target*-specifiche; si tratta infatti del *reporter* più economico, ma la sua specificità è data esclusivamente dai *primers* e non dal marcatore colorato, il quale può legarsi a qualsiasi molecola di dsDNA, come gli amplificati aspecifici conseguenti ad errori di appaiamento (*mispriming*) o i dimeri di *primers* (falsi positivi: Simpson *et al.*, 2000): è quindi necessaria l'analisi degli amplificati mediante una curva di *melting*. Un altro svantaggio è dovuto al fatto che l'ammontare del segnale generato dopo l'irradiazione dipende dalla massa del DNA, quindi l'amplificazione di una sequenza lunga darà un segnale maggiore di quello emesso da una sequenza più ridotta (Bustin, 2000): per ovviare a questo problema è necessario utilizzare amplificati delle stesse dimensioni.

Per verificare la specificità di reazione è quindi opportuno eseguire il protocollo termico di dissociazione (*melting*) dei prodotti di amplificazione per caratterizzare l'amplicone specifico e per individuare eventuali prodotti aspecifici (Ririe *et al.*, 1997). L'analisi della curva di *melting* (fluorescenza vs temperatura) dopo il completamento dell'amplificazione consiste nell'aumentare gradualmente la temperatura (solitamente 0.02°C/sec) da 60 a 95°C fino a denaturare il doppio filamento di DNA e nel frattempo monitorare la fluorescenza (dovuta alla presenza del *reporter*). Tale procedura sfrutta la diversa temperatura di denaturazione ( $T_m$ , temperatura di *melting*), ovvero la temperatura necessaria affinché il 50% degli ampliconi sia ridotta a singolo filamento. I dimeri di *primers* infatti hanno una  $T_m$  molto inferiore rispetto ai normali prodotti, quindi sono facilmente individuabili nel grafico "derivata della fluorescenza (-dF/dT) vs

temperatura”, che riporta i picchi di *melting* (Kubista *et al.*, 2006: vedi figura 1.9.5); infatti la forma e la posizione dei picchi dipendono dal rapporto GC/AT, dalla lunghezza e dalla sequenza e possono costituire un mezzo per differenziare i prodotti di amplificazioni aventi  $T_m$  che differiscono di meno di 2°C, eliminando in molti casi la necessità dell'elettroforesi per l'analisi degli amplificati (Ririe *et al.*, 1997).

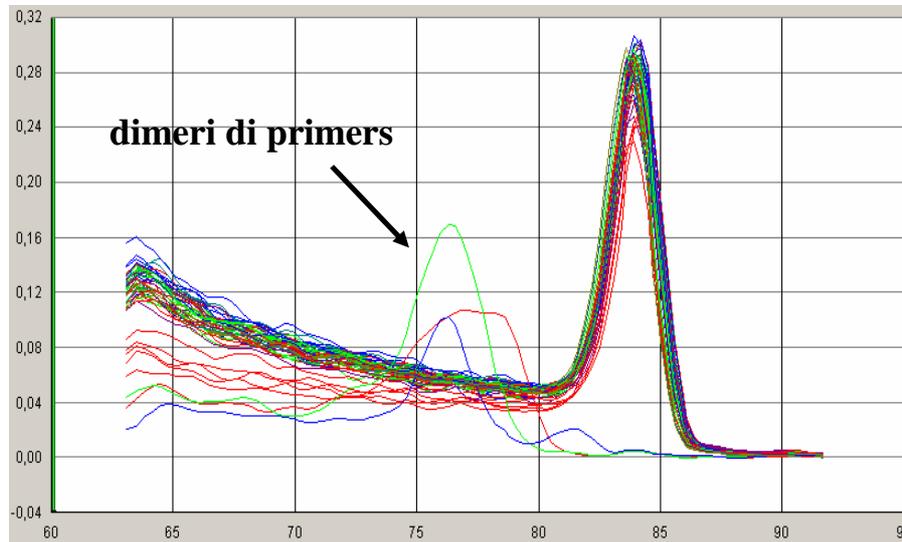


Figura 1.9.5: Grafico della derivata della fluorescenza vs la temperatura; si possono evidenziare dei picchi aberranti con una temperatura di *melting* inferiore rispetto a tutti gli altri campioni analizzati e che corrispondono ai dimeri di *primers*.

In alternativa, possono essere usate sonde specifiche marcate con fluorofori con fluorescenza intrinseca (come fluorescina, rodamina o i loro derivati) o con fluorofori che variano le loro proprietà dopo aver legato l'acido nucleico. Le sonde sono più costose dei coloranti intercalanti in quanto devono essere sintetizzate *ex novo* in base alle diverse sequenze di interesse, ma, essendo *target*-specifiche, eliminano il rischio di risultati falsi-positivi dovuti alla formazione di prodotti aspecifici (compresi i dimeri di *primers*) e la necessità di procedure post-PCR quali l'analisi della sequenza o della curva di *melting* per confermare il prodotto di amplificazione.

Tra gli altri (vedi figura 1.9.6), i principali sistemi di rilevazione basati sull'utilizzo delle sonde sono i sistemi Taqman: sono sonde oligonucleotidiche specifiche dotate di un colorante ad alta energia definito *reporter* (generalmente il FAM<sup>TM</sup>) all'estremità 5' ed un colorante a bassa energia definito *quencher* (generalmente TAMRA<sup>TM</sup>) all'estremità 3' (Giulietti *et al.*, 2001): esse vengono disegnate in modo da legarsi specificatamente ad una sequenza di DNA *target* posta fra i due *primers* (Gibson *et al.*, 1996). Nella fase successiva alla denaturazione, i *primers* e la sonda si legano alla sequenza *target* di DNA; l'emissione di fluorescenza del *reporter* però è soppressa dal *quencher* come risultato della stretta prossimità tra i due coloranti. Durante la fase di estensione, invece, la rottura della sonda da parte dell'attività 5'-esonucleasica dell'enzima Taq DNA polimerasi provoca l'aumento della distanza tra i due coloranti e l'emissione del segnale di fluorescenza da parte del *reporter*. Un tipo particolare di sonde Taqman è dato dalle *minor groove binding*. Esse presentano un peptide, come il diidrociclopiprroloindolo-tripeptide, attaccato all'estremità 3', che stabilizza il complesso *probe-target* grazie all'alta  $T_m$ . In questo modo è possibile utilizzare sonde più corte (13-16 nucleotidi). Queste sonde sono meno costose da produrre, mostrano meno fluorescenza di fondo

ed un *range* dinamico più ampio grazie alla maggior efficienza nel *quencing* del *reporter* (Kutyavin *et al.*, 2000).

Altro sistema è quello delle *Molecular Beacons*: sono sonde di ibridazione con struttura secondaria ad *hairpin*, costruite mediante sequenze invertite ripetute che fiancheggiano la regione di interesse (Giulietti *et al.*, 2001); *reporter* e *quencer*, attaccati alle due estremità complementari della molecola, si trovano in stretta vicinanza tra loro: quando la sonda si lega al filamento stampo del DNA *target*, si apre separando in questo modo il *reporter* dal *quencer* e promuovendo l'emissione del segnale di fluorescenza (Tyagi e Kramer, 1996).

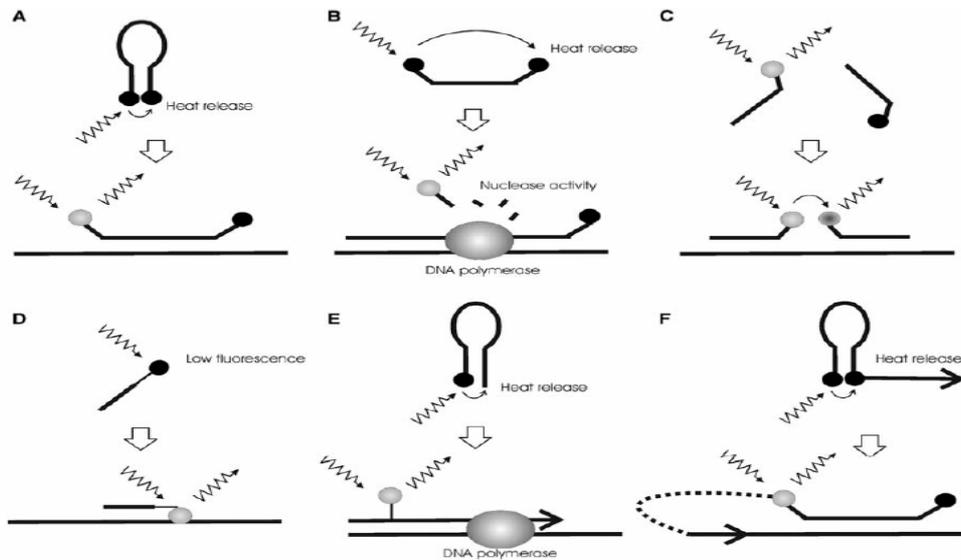


Figura 1.9.6: Reporter specifici usati nella Real Time PCR: *molecular beacon* (A), sonde *Taqman* (B), sonde a ibridazione (C), sonde *Lightup* (D), sonde semplici (E) e *primer Scorpion* (F) (Kubista *et al.*, 2006).

### Quantificazione dell'espressione genica

La tecnica della Q RT-PCR consente di compiere saggi di tipo quantitativo misurando l'ammontare dell'acido nucleico *target* durante ogni ciclo di amplificazione. Il principio di quantificazione dell'amplificato è semplice: più copie di *target* sono presenti all'inizio dell'analisi, meno cicli di amplificazione saranno necessari per sintetizzare una quantità di amplificato sufficientemente elevata da essere rilevabile. La quantificazione può essere assoluta o relativa.

La quantificazione assoluta determina in modo preciso il numero di copie di amplificato per cellula, concentrazione di RNA totale o unità di tessuto presente in un campione, di solito mettendo in relazione il segnale di fluorescenza di tale *target* a concentrazione non nota con la curva standard di un campione a concentrazione nota (Wong e Medrano, 2005). Come standard si può selezionare un frammento di DNA a singolo o doppio filamento o di RNA contenente la sequenza *target* (Fey *et al.*, 2004); tuttavia l'utilizzo di DNA ha permesso di ottenere un più ampio *range* di quantificazione, nonché maggiore sensibilità, riproducibilità e stabilità.

La quantificazione relativa, invece, determina la quantità di amplificato *target* presente in un campione paragonandolo ad un altro campione, chiamato calibratore, che viene scelto arbitrariamente e al quale viene attribuito un livello di espressione unitario.

Per normalizzare i risultati sperimentali dei geni *target* la strategia più comunemente utilizzata si basa sulla selezione di un gene *reference*, cioè un riferimento endogeno o esogeno, determinato per ciascun campione contemporaneamente al gene *target*. I *reference* sono in genere geni *housekeeping* e dovrebbero essere idealmente espressi in modo ubiquitario, avere elevati e costanti livelli di espressione e non essere sottoposti a regolazione trascrizionale; l'utilizzo del gene *reference* ha quindi lo scopo di compensare le differenze qualitative dell'RNA di partenza utilizzato per ciascun campione.

I più utilizzati sono i geni gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi, glucosio-6-fosfato-deidrogenasi, beta-actina, beta2-microglobulina, nonché proteine istoniche, subunità ribosomiali (rRNA 18S e 28S) o campioni di controllo; per individuare il *reference* che meglio si adatta alle condizioni sperimentali occorre attuare un'approfondita ricerca per assicurarsi che la sua espressione non subisca significative variazioni.

Per poter applicare questo tipo di normalizzazione è però necessario che le efficienze del gene *reference* e dei geni *target* siano comparabili. L'efficienza di amplificazione viene valutata mediante la costruzione di una curva standard, che viene disegnata riportando in ordinata i valori di Ct ottenuti dopo l'amplificazione ed in ascissa il logaritmo delle concentrazioni seriali di una sequenza scelta come standard ed avente una concentrazione nota (Wong e Medrano, 2005). Se la reazione ha una buona efficienza i valori di Ct e le concentrazioni iniziali del campione sono legati da una relazione lineare; la curva che fornisce la migliore interpolazione dei punti nel grafico è una retta con coefficiente angolare ideale (*slope*) di -3.322, a cui corrisponde un'efficienza di reazione del 100%. Noto il coefficiente della retta, l'efficienza di amplificazione è quindi determinata dall'equazione:

$$E = [10^{(-1/slope)}] - 1$$

L'utilizzo dello stesso calibratore per ciascun campione permette anche un secondo livello di normalizzazione tra le diverse reazioni di amplificazione, compensando le eventuali differenze nell'efficienza della PCR stessa.

I dati ottenuti dalla PCR possono essere rielaborati mediante diversi metodi matematici (Wong e Medrano, 2005), ma il più frequentemente adottato è quello del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , che calcola i cambiamenti di espressione genica analizzando le differenze tra un campione sperimentale ed un calibratore. Durante la Q RT-PCR, il Ct (ciclo soglia) del *target* è confrontato direttamente con quello del calibratore e la differenza dei due Ct ( $\Delta Ct$ ) è l'esponente della base 2, che rappresenta la differenza dell'ammontare dei templati relativi ai due geni (Bustin, 2000).

Il metodo del  $\Delta\Delta Ct$  consiste quindi nel determinare il  $\Delta Ct$  del gene *target* rispetto al *reference* per ciascun campione ( $\Delta Ct = Ct^{target} - Ct^{reference}$ ) e successivamente determinare il  $\Delta\Delta Ct$  sottraendo il  $\Delta Ct$  del calibratore al  $\Delta Ct$  del campione testato ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct^{campione} - \Delta Ct^{calibratore}$ ). Infine, assumendo che l'efficienza della reazione di amplificazione sia del 100%, l'espressione del gene *target*, normalizzata col gene *reference* e relativa al calibratore, è data da  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak e Schmittgen, 2001).

## 2. SCOPO DELLA TESI

Storicamente, gli studi concernenti l'espressione e la regolazione degli enzimi biotrasformativi (DMEs), hanno sempre ricevuto scarsa attenzione nelle specie di interesse veterinario, se confrontate con l'uomo e le specie da laboratorio. Queste stesse specie sono però continuamente esposte all'azione di farmaci, pesticidi o contaminanti ambientali, pericolosi non solo per l'animale stesso, ma anche per l'uomo, consumatore finale di derrate di origine animale, nelle quali si possono accumulare i residui di tali composti (Sivapathasundaram *et al.*, 2001).

Ad oggi tuttavia, pur conoscendo l'importanza economica del bovino, una delle specie maggiormente impiegate nella produzione di derrate alimentari, gli studi sul metabolismo biotrasformativo in questa specie sono limitati, o perlomeno ristretti alla valutazione dell'attività catalitica o dell'espressione proteica (Sivapathasundaram *et al.*, 2001; Machala *et al.*, 2003; Szotáková *et al.*, 2004; Nebbia *et al.*, 2003; Gusson *et al.*, 2006; Dacasto *et al.*, 2005).

Recentemente nel campo della Tossicologia ha assunto notevole importanza una nuova disciplina denominata "tossicogenomica", ove si studiano le correlazioni tra la struttura e l'attività del genoma e gli effetti tossici degli xenobiotici (Aardema e McGregor, 2002), la quale ha permesso di affiancare ed approfondire anche lo studio del "Drug Metabolism" (DM: De Longueville *et al.*, 2002; Gerhold *et al.*, 2001; Furukawa *et al.*, 2004) grazie all'impiego di metodiche biomolecolari innovative, sensibili e specifiche, quali la *Real Time PCR* (Q RT-PCR) ed i *microarray* (Tugwood *et al.*, 2003). Nel bovino, a nostro avviso, pochi autori al momento attuale hanno studiato il metabolismo biotrasformativo a livello genico: Greger *et al.* (2006) hanno valutato l'ontogenesi di alcuni recettori orfani e dei corrispettivi geni *target* nel vitello, Krüger *et al.* (2005) hanno determinato l'effetto del colostro e della vitamina A sullo stesso *pattern* di geni, infine Reiter *et al.* (2007) hanno valutato l'effetto di alcune sostanze ormonali (melengestrol acetato, trenbolone acetato e zeranolo) su un *panel* di 24 geni, tra i quali CYP1A1, GR ed ER $\alpha$ .

A questo proposito, nel progetto di ricerca oggetto della presente tesi di dottorato, si è provveduto alla messa a punto e all'applicazione di alcune tecniche biomolecolari (clonaggio e Q RT-PCR) allo scopo di:

- 1) meglio caratterizzare il metabolismo biotrasformativo nel bovino anche dal punto di vista genico, prendendo in considerazione un fattore intrinseco in grado di modularne l'attività (la razza): è noto infatti come l'attività biotrasformativa del CYP e degli enzimi coniugativi possa essere influenzata da fattori intrinseci quali l'età, il sesso, la razza, la specie e le condizioni patofisiologiche (gravidanza) nonché da fattori estrinseci come l'induzione e l'inibizione da parte degli xenobiotici (Nebbia, 2001);
- 2) individuare tra i più importanti enzimi biotrasformativi di fase I e II (e relativi fattori di trascrizione coinvolti nella loro regolazione), alcuni possibili biomarcatori indiretti di trattamento illecito nella specie bovina.

E' risaputo, a tal proposito, che nell'allevamento del bovino da carne vengano sempre più spesso impiegati promotori della crescita (PdC) sebbene tale uso non sia consentito a livello comunitario (Courtheyn *et al.*, 2002) e vengano applicati dei piani di monitoraggio volti all'individuazione dei suddetti trattamenti. Le

procedure di sorveglianza tuttavia molto spesso sono ostacolate dall'impiego di vie di somministrazione diverse dalle usuali, di basse dosi per tempi prolungati (per massimizzare gli effetti farmacologici e ridurre il rischio di positività ai controlli) o di *cocktails* di più molecole con effetti sinergizzanti. Per questo ordine di motivi le classiche metodiche analitiche adottate per legge, pur essendo sempre più performanti, falliscono nell'individuazione di questo tipo di trattamenti; è necessario pertanto definire nuovi metodi di *screening* più attendibili, ed i biomarcatori molecolari sembrano da questo punto di vista piuttosto promettenti (Nebbia, 2005).

Pertanto la presente tesi è stata suddivisa nelle seguenti parti:

- esperimento I, condotto su campioni di fegato di vitelli di controllo e trattati con fenobarbitale, nel corso del quale sono stati clonati e sequenziati alcuni geni del metabolismo bovino, nonché alcuni recettori nucleari, le cui sequenze nucleotidiche non erano allora disponibili nelle banche dati, per la successiva messa a punto di saggi in Q RT-PCR;
- esperimento II, eseguito su vitelloni da carne appartenenti a tre razze diverse (Charolais, Piemontese e Blonde d'Aquitaine), nel corso del quale sono stati valutati gli effetti della razza sul metabolismo biotrasformativo epatico, ed in particolare sulla:
  - espressione genica dei più importanti enzimi di fase I (CYPs) e II (uridindifosfoglucuronosiltransferasi e glutatione S-transferasi), applicando dei saggi in Q RT-PCR messi a punto contestualmente;
  - attività catalitica *in vitro* specifica per ogni singola isoforma di enzimi di fase I e II utilizzando substrati modello utilizzati nell'uomo e nelle specie da laboratorio;
  - espressione proteica delle isoforme CYP1A, CYP2B, CYP2C, CYP2E e CYP3A mediante immunoelettroforesi delle proteine microsomiali epatiche;
  - correlazione tra attività catalitica ed espressione genica dell'ipotetica isoforma coinvolta nel metabolismo del substrato *marker* utilizzato;
- esperimento III, condotto su vitelloni da carne, volto alla valutazione dell'effetto di un trattamento con due diversi PdC, secondo due diverse vie di somministrazione, sull'espressione e la regolazione degli enzimi biotrasformativi, nonché all'individuazione di potenziali biomarcatori molecolari di trattamento; tali finalità sono state perseguite in due differenti esperimenti pilota:
  - vitelloni di razza Marchigiana trattati con desametazone (DEX) *per os* o per via intramuscolare;
  - vitelloni incroci di meticci francesi trattati *per os* con il solo DEX o in combinazione con 17 $\beta$ -estradiolo, somministrato per via intramuscolare;

- esperimento IV, eseguito su vitelloni da carne e su epatociti in coltura primaria di bovino trattati/incubati con due PdC (i precursori degli androgeni ADD e DHEA), con l'obiettivo di individuare gli effetti del trattamento (confronto *vivo/vitro*) sull'espressione degli enzimi biotrasformativi ed i relativi fattori di trascrizione;
- esperimento V, che completa uno studio iniziato in un'altra Tesi di Dottorato, in cui il DEX è somministrato *per os* o per via intramuscolare (come nell'esperimento III) in vitelli a carne bianca; in particolare sono stati valutati:
  - espressione genica degli enzimi CYP2B6, CYP2C9 e CYP3A4, e dei recettori CAR, PXR, RXR $\alpha$ , HNF4 $\alpha$  e GR;
  - espressione proteica dell'isoforma CYP3A mediante immunoelettroforesi delle proteine microsomiali epatiche.

In appendice a quanto sopra riportato, è necessario sottolineare che, a causa dell'assenza di studi bioinformatici e di filogenesi delle sequenze codificanti per i DMEs nelle specie da reddito, al momento attuale non è ancora disponibile una nomenclatura precisa e definitiva per questi stessi geni nel bovino. Finora in questa specie è stata utilizzata la nomenclatura umana, sulla base dell'identità della sequenza aminoacidica; nella presente Tesi di Dottorato è stato utilizzato il medesimo approccio, per permettere una più immediata correlazione con i dati dell'attività catalitica e dell'immunoelettroforesi, qualora disponibili, anche se sarebbe stato necessario identificare ogni singolo gene con il suffisso "simil-".



***CLONAGGIO E SEQUENZIAMENTO DI ALCUNI GENI DEPUTATI  
AL METABOLISMO DEI FARMACI NEL BOVINO***

CANTIELLO M., GIANTIN M., NEBBIA C., BOLLO E., LASSERRE F., MARTIN P., PINEAU T., DACASTO M. (2005):

Sequencing and cloning of some relevant drug metabolism genes in cattle: The Programma Galileo 2003 Summary Report.

*Pharmacologyonline* **3**, 66 – 76 (2005)



### 3.1. MATERIALI E METODI

Le metodologie di biologia molecolare qui di seguito riportate, sono state apprese dall'*Equipe de Pharmacologie moleculaire*, presso il "Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, I.N.R.A." di Toulouse, Francia, sotto la supervisione del Dr. Thierry Pineau.

#### Campioni biologici

Per questa sperimentazione sono stati utilizzati un totale di 7 vitelli a carne bianca di razza Frisona dell'età di 10 mesi, suddivisi in due gruppi: un primo denominato PB, costituito da 4 vitelli trattati con 18 mg/kg di fenobarbitale somministrati *per os* per 7 giorni consecutivi ed un secondo di controllo, identificato con K, costituito da 3 animali non sottoposti a trattamento.

Al termine del protocollo di trattamento, gli animali sono stati sacrificati ed in sede di macellazione, sono state prelevate in sterilità delle aliquote di fegato di circa 100 mg dal lobo caudato per la successiva estrazione dell'RNA totale. Tali aliquote sono state immediatamente congelate in azoto liquido e stoccate a -80°C fino all'utilizzo.

#### Estrazione RNA totale da tessuti

*Questa fase risulta essere di particolare importanza in quanto può condizionare tutte le fasi successive: è importante assicurarsi infatti che l'RNA isolato rappresenti il reale pattern in vivo dei geni presenti nel campione. Ciò può essere ostacolato da eventuali modificazioni che si possono verificare prima, durante la manipolazione del campione stesso e dopo, nel corso dell'isolamento dell'acido nucleico. L'RNA è soggetto facilmente a degradazione ad opera delle RNasi tissutali presenti nel campione, nonché sulla superficie cutanea dell'operatore. Per questo motivo è necessario lavorare in condizioni opportune per evitare spiacevoli inconvenienti e stabilizzare l'RNA attraverso una corretta procedura operativa: utilizzare sempre guanti, materiale di consumo DNasi ed RNasi-free, utensili puliti con RNase-Zap (reagente in grado di bloccare l'azione delle RNasi), rispettare la catena del freddo (usare sempre il ghiaccio) ed estrarre il campione nel più breve tempo possibile.*

#### **Reattivi**

- ❖ TRIzol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen, Milano, Italia): fenolo acido-guanidina tiocianato
- ❖ Cloroformio, J.T. Baker, Mallinckrodt, Olanda
- ❖ Isopropanolo, J.T. Baker, Mallinckrodt, Olanda
- ❖ Etanolo 70-75%, J.T. Baker, Mallinckrodt, Olanda
- ❖ Acqua DEPC, AppliChem, Milano, Italia

#### **Procedimento**

- Porre il campione, tolto dal -80°C e conservato in una scatola a tenuta termica, in un microtubo da 2 mL contenente 1 mL di TRIzol<sup>®</sup>; omogenare con UltraTurrax<sup>®</sup> con punta da 7 mm di diametro (Ika, Vetrotecnica, Padova).

- Aggiungere 200  $\mu\text{L}$  di cloroformio e agitare vigorosamente per inversione almeno 15 secondi. Incubare 2 minuti (min) a temperatura ambiente.
- Centrifugare a  $4^\circ\text{C}$  per 5 min a 12.000xg. A questo punto il *mix* risulta separato in tre fasi. La fase organica inferiore, di colore rossastro, contiene proteine, fenolo e cloroformio; nella fase intermedia, biancastra, sono presenti DNA genomico e proteine denaturate; infine, nella parte acquosa superiore (incolore) si trova l'RNA.
- Trasferire la porzione acquosa (all'incirca 500  $\mu\text{L}$ ) in un nuovo microtubo da 1.5 mL.
- Aggiungere un ugual volume di isopropanolo, agitare per inversione ed incubare per 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugare a  $4^\circ\text{C}$  per 5 min a 12.000xg.
- Eliminare il surnatante utilizzando una pompa a vuoto.
- Riprendere il *pellet* in 1 mL di etanolo al 70-75% e vortexare.
- Centrifugare a  $4^\circ\text{C}$  per 5 min a 12.000xg.
- Eliminare il surnatante utilizzando una pompa a vuoto, facendo attenzione a non far seccare il *pellet*, altrimenti ne si riduce la solubilità.
- Dissolvere il *pellet* in acqua DEPC (da 30 a 150  $\mu\text{L}$ , a seconda delle dimensioni del *pellet*) ed attendere 5 min a temperatura ambiente per ottenerne il completo scioglimento. Porre a  $+4^\circ\text{C}$  per 10 min. Dopo lettura allo spettrofotometro, conservare il campione a  $-80^\circ\text{C}$ .

#### **Valutazione qualitativa dell'estratto: elettroforesi su gel denaturante di agarosio all'1.2%**

##### **Reattivi**

- ❖ Formamide deionizzata filtrata, AppliChem, Milano, Italia
- ❖ SDS 20% in acqua (p/v), AppliChem, Milano, Italia
- ❖ EDTA 0.5 M, AppliChem, Milano, Italia
- ❖ Bromuro di etidio, Sigma, Milano, Italia
- ❖ Blu di bromofenolo 1%, Sigma, Milano, Italia
- ❖ Colorante di caricamento denaturante per RNA (*Loading buffer 2X*) composto da:

| <b>Reattivi</b>              | <b>Volume (<math>\mu\text{L}</math>)</b> |
|------------------------------|--|
| Formamide deionizzata        | 950.00                                   |
| SDS 20%                      | 1.25                                     |
| EDTA 0.5 M                   | 1.00                                     |
| Bromuro di etidio (10 mg/mL) | 10.00                                    |
| Blu di bromofenolo 1%        | 10.00                                    |
| Acqua deionizzata (qbp 1 mL) | 27.75                                    |

- ❖ Agarosio, AppliChem, Milano, Italia
- ❖ Acqua deionizzata
- ❖  $\text{NaHPO}_4$  1 M, pH 7.4, Sigma, Milano, Italia

- ❖ Formaldeide 36.5%, Fluka, Milano, Italia
- ❖ Tampone di migrazione contenente formaldeide 3.25% in tampone fosfato 0.1 M pH 7.4

### Procedimento

- Preparare il gel di agarosio all'1.2% in tampone fosfato 0.1 M, pH 7.4.
- Sotto cappa aggiungere lentamente un volume di formaldeide 36.5% in modo tale da ottenere una soluzione finale al 3.25%.
- Colare il gel, mettere il pettine e lasciar polimerizzare sotto cappa.
- Preparare le diluizioni di RNA in acqua (10 µg di RNA in un volume finale di 8 µL).
- Aggiungere al campione 4 µl di *Loading buffer 2X*, che ha sull'RNA un'azione denaturante.
- Denaturare i campioni a 65°C per 5 min in un termoblocco e mettere in ghiaccio per i successivi 5 min.
- Centrifugare per pochi secondi a 16.110xg per far scendere l'eventuale condensa.
- Caricare, sotto cappa, i campioni sul gel (volume finale di caricamento di 12 µl) e sottoporli ad elettroforesi a 100 V per 20 min, usando il tampone di migrazione contenente formaldeide.
- Dopo la corsa, visualizzare e fotografare i campioni di RNA al transilluminatore a luce UV *Image Master VDS* (Amersham Biosciences, Milano). In questo modo, se l'RNA è integro, vengono visualizzate due bande corrispondenti alle due componenti di RNA ribosomiale: 18S (1.9 kb) e 28S (5 kb). Se le bande non presentano *smear*, indici di degradazione, l'RNA può essere impiegato nelle reazioni successive.

### Quantificazione dell'RNA e valutazione del grado di purezza

La concentrazione dell'RNA può essere determinata con uno spettrofotometro misurandone l'assorbanza a 260 nm ( $A_{260}$ ). L'assorbanza di 1 unità a 260 nm corrisponde a 40 µg di RNA per mL ( $A_{260} = 1 \rightarrow 40 \mu\text{g/mL}$ ). Dato che questa relazione è valida solo per le misurazioni in acqua, quando fosse necessario, il campione deve essere diluito in tale solvente:

- Diluire 2 µL di RNA purificato in 498 µL di acqua (fattore di diluizione 1:250).
- Misurare l'assorbanza del campione diluito in una cuvetta di quarzo da 0.5 mL.
- Calcolare la concentrazione dell'RNA [RNA]:

$$[\text{RNA}] \mu\text{g/mL} = 40 \times A_{260} \times \text{fattore di diluizione}$$

$$[\text{RNA}] \mu\text{g/mL} = 40 \times A_{260} \times 250$$

$$[\text{RNA}] \mu\text{g/mL} = 10000 \times A_{260}$$

$$[\text{RNA}] \mu\text{g}/\mu\text{L} = 10 \times A_{260}$$

Il rapporto tra le letture a 260 nm ed a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) è stato usato per stimare la purezza degli acidi nucleici, in rapporto allo spettro di assorbimento delle proteine ( $A_{280}$ ), che rappresentano i principali contaminanti. Quando tale rapporto è compreso tra valori di 1.6 e 2.0, si ha un buon grado di purezza (2 è ottimale per l'RNA; 1.8 per il DNA). L'assorbanza a 230 nm invece riflette la contaminazione del campione dovuta a sostanze come carboidrati, fenoli, peptidi o composti aromatici.

**Analisi bioinformatica e scelta dei primers**

Per la ricerca di informazioni relative ai geni coinvolti nel metabolismo e nella sua regolazione, per la verifica della loro disponibilità nelle banche dati e per l'analisi delle rispettive sequenze finalizzata alla costruzione di *primers*, sono disponibili diverse risorse bioinformatiche.

Nella prima parte della ricerca, la maggior parte dei dati è stata ottenuta dal sito del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*: <http://ncbi.nlm.nih.gov/>), impiegando motori di ricerca per accedere sia alle pubblicazioni (*Pubmed*) che alle sequenze genomiche, dei trascritti e delle proteine (*Nucleotide*, *Gene* e *Protein*).

Una volta verificata l'assenza nelle banche dati della sequenza bovina di interesse, è stato necessario effettuare una ricerca delle sequenze corrispondenti in diverse specie di mammiferi (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Canis familiaris*, *Felis catus*, *Sus scrofa*, *Oryctolagus cuniculus*,...). Successivamente tali sequenze, codificanti per lo stesso gene in esame, sono state confrontate tra di loro per individuare le regioni omologhe, mediante l'utilizzo di un programma disponibile in rete denominato *Multalin* ([www.toulouse.inra.fr/multalin/multalin](http://www.toulouse.inra.fr/multalin/multalin)), il quale evidenzia ogni punto di mal appaiamento (*mismatch*). Mediante questa procedura sono state identificate le regioni altamente conservate tra le specie, su cui possono essere disegnati *primers* specifici per il gene di interesse, che possono essere potenzialmente utilizzati anche nel bovino. Mediante questo allineamento è stata scelta la sequenza più idonea, con la quale proseguire l'analisi.

Qui di seguito, nella Tabella 3.1.1, sono riportati i geni selezionati per il clonaggio ed il sequenziamento, dei quali non erano disponibili in rete le sequenze bovine di riferimento.

| <b>Gene</b>   | <b>Nome</b>   | <b>Categoria funzionale</b> |
|---------------|---|-----------------------------|
| CYP2B         | Citocromo P450 2B                                     | Metabolismo                 |
| CYP4A         | Citocromo P450 4A                                     | Metabolismo                 |
| RXR $\alpha$  | <i>Retinoid-X-receptor</i> isoforma $\alpha$          | Recettore                   |
| UGT1A4        | Uridindifosfoglucuronosiltransferasi 1A4              | Metabolismo                 |
| GR            | Recettore per i glucocorticoidi                       | Recettore                   |
| HNF4 $\alpha$ | <i>Hepatocyte nuclear factor 4<math>\alpha</math></i> | Recettore                   |

Tabella 3.1.1: Lista dei geni bovini sottoposti a clonaggio

Successivamente, per la progettazione dei *primers* è stato utilizzato il programma Primer3, disponibile in rete sul sito web ([http://frodo.wi.mit.edu/egibin/primer3/primer3\\_www.egi](http://frodo.wi.mit.edu/egibin/primer3/primer3_www.egi)) il quale, data la sequenza di cDNA e scelta la lunghezza desiderata dell'amplicone, fornisce una lista di coppie di *primers* con le loro caratteristiche di lunghezza, temperatura di appaiamento, percentuale in GC e "score" di appaiamento intramolecolare.

Sono state costruite coppie di *primers* di circa 20 nucleotidi, con temperature di appaiamento simili tra loro (comprese tra 58 e 60°C) e con una struttura primaria tale da evitare appaiamenti intramolecolari (per ridurre

il più possibile la formazione di strutture a forcina (*hairpin*) e di dimeri tra il *primer* senso (*forward*) ed antisenso (*reverse*).

La percentuale di basi GC (%GC) è stata mantenuta all'interno dell'intervallo tra 53% e 61% e sono stati preferiti *primers* senza sequenze di più G e C consecutive.

I *primers* ottenuti sono stati poi oggetto di verifica mediante controllo della corrispondenza degli oligonucleotidi stessi nonché dell'amplicone, con la sequenza scelta, utilizzando *Blastn* disponibile come *link* dal sito del NCBI.

Infine, data la sequenza di riferimento, è stata ottenuta la mappa di restrizione mediante l'utilizzo del sito *web webcutter 2.0* (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>): data la lista delle endonucleasi in grado di tagliare la sequenza di interesse e/o il plasmide, è possibile così calcolare la lunghezza dei frammenti che si ottengono in seguito alla digestione.

### **Trascrizione inversa (RT)**

*In questa fase l'RNA estratto viene convertito dall'enzima trascrittasi inversa in DNA complementare (cDNA), rendendo il templatato disponibile per la successiva amplificazione mediante PCR (polymerase chain reaction). Le trascrittasi inverse generalmente usate a questo scopo sono quelle dell'Avian Myeloblastosis virus (AMV) o del Moloney Murine Leucemia Virus (M-MLV). Questa tecnica è particolarmente utilizzata in analisi che riguardano l'espressione differenziale di geni in tessuti o il clonaggio di cDNA da mRNA.*

### **Reattivi**

- ❖ Random Primers 50  $\mu$ M (Invitrogen, Milano, Italia): *primers* esameri (miscela di tutte le possibili sequenze a sei basi)
- ❖ dNTPs 10 mM (Promega Italia, Milano, Italia): soluzione contenente dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- ❖ Ditiotreitolo (DTT) 0.1 M (Invitrogen, Milano, Italia): stabilizzatore di membrana
- ❖ Tampone 5X per SSII (Invitrogen, Milano, Italia) contenente Tris-HCl 500 mM (pH 8.3), KCl 750 mM, MgCl<sub>2</sub> 30 mM
- ❖ RNasi OUT<sup>TM</sup> 40 UI/ $\mu$ L (Invitrogen, Milano, Italia): inibitore delle ribonucleasi
- ❖ SuperScript II<sup>TM</sup> 200 UI/ $\mu$ L, Invitrogen, Milano, Italia
- ❖ Acqua DEPC

### **Procedimento**

- Scongellare i campioni ed i reagenti in ghiaccio, tranne gli enzimi, che devono essere lasciati nel *criobox* a -20°C fino all'utilizzo.
- Porre in un microtubo da 500  $\mu$ L un volume di campione necessario per avere 2  $\mu$ g di RNA e portare a volume con acqua, qbp 10  $\mu$ L.
- Aggiungere 1  $\mu$ L di random *primers* ed 1  $\mu$ L di *mix* dNTPs.
- Incubare nel termociclatore a 65°C (denaturazione) per 5 min ed a 4°C per altri 5 min.

- Durante la denaturazione preparare il seguente *mix* per ciascun campione:

| <b>MIX RT (<math>\mu\text{L}/\text{campione}</math>)</b> |   |
|--|---|
| Tampone 5X   | 4 |
| DTT 0.1 M  | 2 |
| RNasi OUT <sup>TM</sup> (40 UI/ $\mu\text{L}$ )          | 1 |
| SSII (200 UI/ $\mu\text{L}$ )                            | 1 |

N.B. l'inibitore delle RNasi e l'enzima vanno aggiunti solo quando manca 1 min alla fine della denaturazione.

- Aggiungere il *mix* al campione (volume finale 20  $\mu\text{L}$ ), incubare a 25°C per 10 min, a 42°C per 50 min (elongazione), poi a 70°C per 15 min (distruzione della trascrittasi inversa); porre il microtubo in ghiaccio ed eseguire una PCR oppure
- Conservare i tubi a 4°C per un utilizzo rapido o conservarli a -20°C.

### **PCR end point**

Scoperta da Kary Mullis nel 1984, la PCR, reazione a catena mediata dall'enzima DNA polimerasi, è una tecnica che permette l'amplificazione selettiva di una sequenza genomica delimitata da due sequenze specifiche (primers), fissate dal ricercatore. Questa metodologia è dunque caratterizzata da elevata sensibilità ed efficienza, poiché a partire da minime quantità di DNA di partenza (DNA a doppio filamento di origine genomica o anche cDNA), in poche ore si possono ottenere milioni di copie del frammento desiderato. A tale proposito, si sfruttano le proprietà di resistenza all'inattivazione termica di polimerasi termostabili, come la Taq polimerasi, estratta dal batterio *Thermophilus aquaticus*. Il processo di amplificazione, infatti, consiste nella ripetizione di cicli termici successivi, che si possono riassumere come segue: denaturazione (in forma lineare) del DNA a 92-98°C (30-60 secondi); ibridizzazione (o annealing) dei primers, con temperatura variabile dai 40 ai 68°C a seconda delle sequenze (30-60 secondi); estensione o sintesi di un nuovo filamento di DNA a 72°C, la temperatura ottimale delle DNA polimerasi termostabili (30-90 secondi).

### **Reattivi**

- ❖ Tampone 10X per Taq polimerasi (Finnzymes, Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France) contenente Tris-HCl 200 mM (pH 8.3), KCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM
- ❖ dNTPs 10 mM
- ❖ Primers 15  $\mu\text{M}$ , MWG Biotech, M-Medical, Milano, Italia
- ❖ DyNAzyme<sup>TM</sup> EXT DNA polymerase (1 UI/ $\mu\text{L}$ ), Finnzymes, Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France
- ❖ Acqua DEPC

**Procedimento**

- Scongellare i reagenti in ghiaccio e preparare il seguente *mix* (volume finale 96  $\mu$ L):

| <b>MIX PCR (<math>\mu</math>L/campione)</b> |      |
|---|------|
| H <sub>2</sub> O                            | 68.8 |
| Tampone 10X                                 | 10.0 |
| dNTPs 2.5 mM                                | 8.0  |
| <i>Primer forward</i> 15 $\mu$ M            | 4.0  |
| <i>Primer reverse</i> 15 $\mu$ M            | 4.0  |
| Taq polimerasi 1UI/ $\mu$ L                 | 1.2  |

- Porre il *mix* in un microtubo da 200  $\mu$ L, aggiungere 4  $\mu$ L di campione (cDNA) e miscelare con il puntale (volume finale della reazione: 100  $\mu$ L).
- Impostare il termociclatore ed iniziare la reazione.

Esempio:

| <b>T (°C)</b> | <b>EFFETTI</b>   | <b>TEMPO</b> | } Numero di cicli |
|---------------|--|--------------|-------------------|
| 95            | denaturazione iniziale                                   | 3 min        |                   |
| 95            | denaturazione  | 45 sec       |                   |
| 60            | ibridizzazione o " <i>annealing</i> " dei <i>primers</i> | 1 min        |                   |
| 72            | estensione o sintesi di un nuovo filamento di DNA        | 1 min        |                   |
| 72            | estensione finale  | 7 min        |                   |
| 4             | inattivazione Taq  | $\infty$     |                   |

### **Elettroforesi su gel di agarosio**

*Per confermare l'avvenuta PCR e verificare che la lunghezza degli ampliconi ottenuti corrisponda a quella attesa, si procede con un'elettroforesi di controllo su gel di agarosio secondo il protocollo riportato qui di seguito.*

#### **Reattivi**

- ❖ Tampone TBE 1X contenente Tris-HCl 89 mM, acido borico 89 mM ed EDTA 2 mM (pH 8.0), Sigma, Milano, Italia
- ❖ Agarosio in polvere, AppliChem, Milano, Italia
- ❖ Bromuro di etidio (10 mg/mL), Sigma, Milano, Italia
- ❖ *Loading buffer* contenente EDTA 60 mM, glicerolo 50%, blu di bromofenolo 0.01% (tutti reagenti Sigma, Milano, Italia)
- ❖ *Marker* di peso molecolare per DNA, Invitrogen, Milano, Italia

#### **Procedimento**

- Preparare il gel sciogliendo l'agarosio (1 o 2 % p/v a seconda della taglia dei frammenti da visualizzare) in TBE 1X, portandolo ad ebollizione.
- Lasciar raffreddare la soluzione e prima che si solidifichi, aggiungere etidio bromuro ad una concentrazione finale di 0.5 µg/mL.
- Versare l'agarosio in un'apposita vaschetta in presenza di un pettine per la creazione dei pozzetti ed attendere la completa polimerizzazione.
- Immergere il gel nell'apparato elettroforetico in presenza di TBE 1X, pH 8.
- Diluire 10 µl di campione con 2 µl di *loading buffer*: tale tampone colorato, contenente blu di bromofenolo, permette di visualizzare il fronte di migrazione dei campioni durante la corsa e grazie al glicerolo, facilita la fase di caricamento degli stessi nei pozzetti.
- Caricare i campioni sul gel (volume finale di caricamento di 12 µl) e sottoporli ad elettroforesi a 100 V per 20 min.
- Dopo la corsa, visualizzare e fotografare i campioni di PCR al transilluminatore a luce UV *Image Master VDS*. In questo modo, mediante il confronto con il marcatore di peso molecolare, viene confermato se il prodotto di PCR ottenuto presenta la taglia attesa.

**Clonaggio di una sonda a DNA (protocollo TOPO TA cloning®)**

*La purificazione e l'amplificazione di un gene in esame possono essere effettuate solamente mediante selezione clonale molecolare. Per fare ciò, il genoma o parte di esso viene integrato all'interno di un vettore (DNA plasmidico), che successivamente permetterà l'introduzione e la moltiplicazione della sequenza in esame all'interno di un batterio, che verrà poi selezionato ed amplificato. Le dimensioni del DNA e le sue estremità, devono essere modificate per poter essere inserite nel vettore; in particolare queste ultime devono essere compatibili con quelle del vettore utilizzato. La sonda di cDNA, ottenuta mediante PCR, rappresenta una sequenza nucleotidica, costituita da almeno 20 nucleotidi, complementare ad una sequenza di mRNA, con la quale essa si ibrida in maniera stabile e specifica per appaiamento di basi complementari (Kaplan e Delpech, 1995); essa, inoltre, è caratterizzata dall'aver l'estremità 3' terminante con adenina (A), infatti viene sintetizzata a partire da mRNA, che ha sempre delle ripetizioni di A all'estremità 3' (cosiddetta coda di poli(A)). Il vettore TOPO® è rappresentato da un plasmide linearizzato, terminante all'estremità 5' con una timidina (T), su cui l'enzima topoisomerasi è stato fissato in modo covalente. Il legame T-A, che si viene ad instaurare ad opera di tale enzima, permette l'inserzione diretta del prodotto di PCR all'interno del plasmide in soli 5 minuti a temperatura ambiente.*

*Successivamente il plasmide verrà introdotto nei batteri (E. coli), che vengono resi competenti (i.e. in grado di incorporare il DNA estraneo) in seguito a shock termico, che ne dilata i pori di membrana.*

*Il plasmide pCR® 2.1-TOPO presenta delle peculiarità:*

- 1. contiene il gene di resistenza all'ampicillina ed alla kanamicina → l'uso di questi antibiotici permette di selezionare i cloni che hanno integrato il plasmide;*
- 2. a livello della zona di inserzione, è presente il gene lacZ della β-galattosidasi (enzima che promuove l'utilizzo del lattosio), in un prodotto di colore blu. I batteri, che hanno integrato un plasmide senza inserto, presentano un gene lacZ attivo, perciò formano colonie blu; al contrario, quelli che hanno un plasmide ricombinante (i.e. con l'inserto) presentano un gene lacZ inattivo, quindi danno origine a colonie bianche, facilmente distinguibili dalle altre. L'espressione del gene lacZ viene indotta attraverso l'utilizzo dell'IPTG (isopropyl-beta-D-tiogalattopiranoside).*
- 3. possiede una serie di siti di restrizione (sequenze di DNA riconosciute e tagliate specificatamente da un determinato enzima di restrizione), che sono molto utili, ad esempio, per verificare la corretta inserzione del DNA in esame. Nella tabella 3.1.2 sono riassunte alcune caratteristiche del plasmide ed alcuni enzimi di restrizione utilizzabili.*

**Reattivi**

- ❖ Kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen, Milano, Italia) contenente: vettore pCR®2.1-TOPO (10 ng/μL) e soluzione salina (NaCl 1.2 M, MgCl<sub>2</sub> 0.06 M)
- ❖ Kit One Shot® (Invitrogen, Milano, Italia) contenente: batteri *Escherichia coli* TOP10F' e SOC medium (triptone 2%, estratto di lievito 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucosio 20 mM)
- ❖ Acqua ultrapura

- ❖ IPTG (AppliChem, Milano, Italia) 100 mM.  
Sciogliere 238 mg di IPTG (p.m. = 238.31) in 10 mL di acqua pura; ripartire in 10 microtubi e conservare a -20°C
- ❖ X-gal (AppliChem, Milano, Italia) 40 mg/mL.  
Dissolvere 400 mg di X-gal in 10 mL di dimetilformamide o dimetilsolfossido; suddividere in 10 microtubi e conservare a -20°C
- ❖ Terreno LB-Agar (Merck, Darmstadt, Germany) contenente ampicillina alla concentrazione finale 100 µg/mL.  
Sciogliere la polvere in 900 mL di acqua e portare a volume; autoclavare a 121°C per 15 min; lasciare raffreddare il terreno fino a circa 45°C, aggiungere 1 mL di ampicillina (100 mg/mL) per ciascun litro di LB, mescolare e versare il terreno nelle piastre Petri. Attendere la solidificazione del terreno, chiudere le piastre Petri con parafilm; conservarle a 4°C fino all'uso.
- ❖ Ampicillina (AppliChem, Milano, Italia) 100 mg/mL.  
Sciogliere 1 g di ampicillina in 10 mL di acqua pura, ripartire in 10 microtubi e conservare a -20°C. Aggiungerne 1 mL/L di LB per ottenere una concentrazione finale di 100 µg/µL.

### Procedimento

- Porre in ghiaccio il cDNA, il vettore, la soluzione salina, l'acqua milliQ, i batteri TOP10F' ed il terreno SOC.
  - Vicino alla fiamma di un becco Bunsen, preparare un microtubo da 200 µL per ciascun gene da clonare e aggiungere:
    - 2 µL di prodotto di PCR
    - 2 µL di acqua milliQ
    - 1 µL di vettore
    - 1 µL di soluzione salina
- e lasciare incubare per 5 min a temperatura ambiente.
- Nel frattempo, prendere 2 capsule Petri per ciascun campione e metterle in stufa a secco a 37°C, capovolte e semiaperte, in modo che si asciugano bene dalla condensa formata durante la conservazione in frigorifero.
  - Trascorsi i 5 min, aggiungere 2 µL del *mix* sonda-vettore nel tubo contenente i batteri e lasciare per 30 min in ghiaccio.
  - Sottoporre i batteri ad uno shock termico: 30 secondi a 42°C, poi 2 min in ghiaccio.
  - Vicino al becco Bunsen, aggiungere ai batteri 250 µL di terreno SOC ed incubare a 37°C per 30-60 min in un bagnetto dotato di agitazione.
  - Nel frattempo, per ciascun campione e per ciascuna piastra Petri, preparare un *mix* contenente 40 µL di IPTG 100 mM e 40 µL di Xgal 40 mg/mL (totale: 80 µL/piastra).
  - Prendere le piastre Petri dall'incubatore ed appoggiarle sul bancone. Prendere un'ansa di Henle, immergerla in alcool, flambarla, attenderne il raffreddamento, aprire la piastra ed appoggiare l'ansa sul

terreno per farla ulteriormente raffreddare. Dopodiché, restando il più possibile vicino al bunsen, aggiungere in ciascuna capsula 80  $\mu\text{L}$  del mix IPTG-Xgal e con l'aiuto dell'ansa distribuire uniformemente il liquido fino a completo assorbimento.

Incubare le piastre Petri a 37°C per 30 min in stufa a secco.

- Trascorsi i 30 min, in prossimità del becco Bunsen aggiungere il *mix* batteri-sonda-vettore alle piastre Petri: 75  $\mu\text{L}$  nella prima e 200  $\mu\text{L}$  nella seconda. Mettere ad incubare nella stufa a secco a 37°C per tutta la notte.
- 

- Il giorno seguente, chiudere le piastre Petri (in cui si sono formate le colonie bianche e blu) con parafilm e conservarle a 4°C.

Tabella 3.1.2. Caratteristiche del plasmide ed enzimi di restrizione

| <b>TAGLIA del plasmide: 3908 bp; INSERZIONE DNA: entro le basi 295 e 296 del plasmide</b> |                             |                  |
|---|-----------------------------|------------------|
| <b><u>ENZIMI a 2 TAGLI, a monte ed a valle dell'inserto</u></b>                           |                             |                  |
| <b>ENZIMA</b>   | <b>TAGLI (paia di basi)</b> | <b>TAMPONI</b>   |
| <b>BstXI</b>  | 280 - 324                   | O+ (T = 55°C)    |
| <b>EcoRI</b>  | 284 - 302                   | EcoRI+           |
| <b><u>ENZIMI a 1 TAGLIO, subito a monte dell'inserto</u></b>                              |                             |                  |
| <b>ENZIMA</b>   | <b>TAGLI (paia di basi)</b> | <b>TAMPONI</b>   |
| <b>Acc65I</b>   | 241                         | O+               |
| <b>BamHI</b>  | 253                         | BamHI+           |
| <b>BcuI (SpeI)</b>  | 259                         | Y+ tango 1X      |
| <b>BspTI (Afl II)</b>   | 293                         | O+               |
| <b>HindIII</b>  | 235                         | R+               |
| <b>KpnI</b>   | 245                         | KpnI+            |
| <b>SacI</b>   | 251                         | SacI+            |
| <b><u>ENZIMI a 1 TAGLIO, subito a valle dell'inserto</u></b>                              |                             |                  |
| <b>ENZIMA</b>   | <b>TAGLI (paia di basi)</b> | <b>TAMPONI</b>   |
| <b>AdeI (DraIII)</b>  | 782                         | G+               |
| <b>ApaI</b>   | 357                         | B+ o Y+ tango 1X |
| <b>Eco88I (AvaI)</b>  | 335                         | Y+ tango 1X      |
| <b>Eco0109I (DraII)</b>   | 353                         | Y+ tango 1X      |
| <b>Eco32I (EcoRV)</b>   | 314                         | R+               |
| <b>Mph1103I (AvaIII, NsiI)</b>  | 346                         | R+               |
| <b>NotI</b>   | 329                         | O+               |
| <b>XbaI</b>   | 347                         | Y+ tango 1X      |
| <b>XhoI</b>   | 335                         | R+               |
| <b><u>ENZIMI a 1 TAGLIO, a valle dell'inserto, lontano</u></b>                            |                             |                  |
| <b>ENZIMA</b>   | <b>TAGLI (paia di basi)</b> | <b>TAMPONI</b>   |
| <b>BclI</b>   | 1266                        | G+ (T = 55°C)    |
| <b>BglII</b>  | 1261                        | O+               |
| <b>MlsI (BalI, MscI)</b>  | 1507                        | R+               |
| <b>NcoI</b>   | 1857                        | Y+ tango 1X      |
| <b>PagI (BspHI)</b>   | 3064                        | O+               |
| <b>PauI (BssHII, BsePI)</b>   | 1822                        | R+               |
| <b><u>ALTRI ENZIMI DI INTERESSE</u></b>   |                             |                  |
| <b>ENZIMA</b>   | <b>TAGLI (paia di basi)</b> | <b>TAMPONI</b>   |
| <b>XapI (ApoI)</b>  | 284 - 302 - 960             | Y+ tango 1X      |
| <b>Eco52I (EagI, XmaIII)</b>  | 267 - 329 - 1331            | Eco52I+          |
| <b>XceI (NspI)</b>  | 3788 - 344 - 1830           | Y+ tango 1X      |

**MiniPrep (mini preparation) di DNA plasmidico**

*Questa tecnica permette di analizzare i cloni prodotti a partire da piccole quantità di coltura (microamplificazione), estraendone e purificandone il plasmide ricombinante e sottoponendo quest'ultimo a prime verifiche (digestione con enzima EcoRI).*

*Ciascun clone di interesse (avente il plasmide ricombinante) viene innanzitutto amplificato una notte a 37°C in una piccola quantità di terreno selettivo (contenente ampicillina).*

*Dopo la coltura, una centrifugazione permette di sedimentare i batteri. Il pellet viene lisato con un tensioattivo (TENS) contenente tris-HCl ed EDTA, che tamponano il medium a pH 7.4 ed in più NaOH ed SDS che lisano le cellule.*

*Una centrifugazione in presenza di acetato di sodio permette di eliminare i residui cellulari e il DNA genomico che rimarranno nel pellet. La successiva aggiunta di etanolo assoluto glaciale al surnatante permette di precipitare il DNA plasmidico, dopo un'ulteriore centrifugazione.*

*A questo punto il pellet viene reidratato, solubilizzato e purificato con una soluzione di fenolo-cloroformio: il DNA plasmidico si concentra nella fase acquosa superiore, mentre il fenolo trattiene le proteine residue.*

*Questa procedura non permette di ottenere del DNA plasmidico puro per il successivo sequenziamento, bensì rappresenta una procedura che permette di estrarre del template non in purezza (rimangono infatti dei contaminanti, soprattutto RNA) per controlli preliminari (verifica della taglia dell'inserito mediante digestione enzimatica con EcoRI).*

**Reattivi**

- ❖ Acqua milliQ autoclavata
- ❖ TENS:

| Componenti   | Quantità | Concentrazione finale |
|--------------|----------|-----------------------|
| Tris-HCl     | 1.2 g    | 10 mM                 |
| EDTA         | 0.372 g  | 1 mM                  |
| NaOH         | 4.0 g    | 0.1 M                 |
| SDS 20%      | 25 mL    | 0.5%                  |
| Acqua milliQ | Qbp 1 L  |                       |

Sciogliere Tris-HCl, NaOH (Sigma, Milano, Italia) ed EDTA (Invitrogen, Milano, Italia) in 900 mL di acqua, aggiungere SDS 20% e portare a volume con acqua.

- ❖ Acetato di Sodio (Sigma, Milano, Italia) 3M, pH 5.2.

Sciogliere 246 g di acetato di sodio anidro in 800 mL di acqua. Tamponare il pH con acido acetico glaciale e portare a volume.

- ❖ Terreno LB brodo (Merck, Darmstadt, Germany): suddiviso in aliquote da 200 mL ed autoclavato
- ❖ Ampicillina 100 mg/mL

- ❖ Soluzione fenolo:cloroformio v/v, pH 7.5: portare il fenolo (AppliChem, Milano, Italia) a pH 7.5 con la soluzione tamponante (*phenol equilibration buffer*, AppliChem, Milano, Italia); mescolare un volume di fenolo a pH 7.5 con un volume di cloroformio.
- ❖ Etanolo assoluto glaciale

### Procedimento

- Vicino alla fiamma di un becco Bunsen preparare 10 provette sterili da 15 mL per ciascuna sonda clonata; in ciascuna di esse aggiungere 3 mL di medium LB brodo addizionato di ampicillina (200 µL in 200 mL di terreno, per ottenere una concentrazione finale di 100 µg/mL)
  - Prendere le capsule Petri contenenti le colonie batteriche dal frigorifero e restando sempre vicino alla fiamma, con un puntale giallo picchiettare una colonia bianca e mettere il puntale nella provetta preparata con il terreno, lasciandovelo all'interno. Ripetere per tutti i 10 tubi.
  - Mettere ad agitare per tutta la notte a 37°C utilizzando il bagnetto termostato con agitazione.
- 
- La mattina seguente, prelevare un volume di 1.5 mL di ciascuna colonia e porlo in un microtubo da 1.5 mL.
  - Centrifugare 10 secondi a 16.110xg a 4°C.
  - Aspirare il surnatante con una pompa a vuoto, ma lasciarne circa 50 µL assieme al *pellet* cellulare (per facilitare la successiva omogeneizzazione). Vortexare per 10 secondi.
  - Aggiungere 300 µL di TENS. Omogeneizzare per inversione e lasciare riposare per 5 min in ghiaccio (LISI BATTERICA)
  - Aggiungere 150 µL di acetato di sodio 3M, pH 5.2. Vortexare e lasciare riposare per 5 min in ghiaccio. La soluzione in questa fase diventa viscosa (PRECIPITAZIONE del DNA GENOMICO).
  - Centrifugare 5 min a 16.110xg a 4°C. Trasferire il surnatante (circa 450 µL) in un nuovo microtubo identificato.
  - Aggiungere 1 mL di etanolo assoluto glaciale. Omogeneizzare per inversione e lasciare per almeno 5 min a -20°C o a -80°C.
  - Centrifugare 15 min a 16.110xg a 4°C. Aspirare il surnatante in due tempi: prima prelevarne la maggior parte, poi ricominciare facendo attenzione al *pellet*. Successivamente è possibile far evaporare bene l'etanolo, lasciando il campione per qualche minuto sotto una cappa aspirante.
  - Risospendere il *pellet* in 50 µL di acqua. Vortexare bene e lasciare 15 min a 4°C.
  - Sotto cappa aggiungere 400 µL di soluzione fenolo-cloroformio v/v, pH 7.5 e vortexare.
  - Centrifugare 5 min a 16.110xg a 4°C: il DNA di interesse rimane nella fase acquosa superiore.
  - Sotto cappa eliminare 350 µL di fase inferiore (fenolo-cloroformio).
  - Centrifugare 5 min a 16.110xg a 4°C.
  - Conservare a 4°C o a -20°C.

**Verifiche della MiniPrep****Digestione del plasmide con enzima di restrizione EcoRI**

*Il plasmide pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> presenta i siti di restrizione dell'endonucleasi EcoRI subito prima e subito dopo il sito di inserzione del DNA in esame. Questa caratteristica determina la possibilità di “tagliare” l'inserto e valutarne le corrette dimensioni mediante elettroforesi su gel di agarosio.*

**Reattivi**

- ❖ Tampone EcoRI+ 10X, Fermentas, M-Medical, Milano, Italia
- ❖ EcoRI 10 UI/  $\mu$ L, Fermentas, M-Medical, Milano, Italia
- ❖ RNase A 1 mg/mL, Fermentas, M-Medical, Milano, Italia

**Procedimento**

- Per effettuare la digestione, preparare per ciascun clone ricombinante il seguente *mix*:

| Reagenti               | $\mu$ L/tubo |
|------------------------|--------------|
| Plasmide               | 2            |
| RNasi (1 mg/mL)        | 3            |
| Tampone EcoRI+ 10X     | 2            |
| EcoRI (10 UI/ $\mu$ L) | 1            |
| Acqua                  | 12           |
| Totale                 | 20           |

- L'endonucleasi va messa nel *mix* dopo tutti gli altri reattivi.
- Effettuare la digestione ponendo i campioni in un bagnomaria a 37°C per 2 ore.
- Controllare l'esattezza della taglia dell'inserto mediante elettroforesi in gel di agarosio, seguita da lettura del gel agli UV per visualizzare le bande separate.

**PCR del DNA plasmidico**

*Il DNA plasmidico può essere oggetto di controllo dell'avvenuto inserimento dell'amplicone mediante PCR dello stesso con i primers gene-specifici utilizzati nella precedente fase di PCR.*

- Per ciascun clone preparare il seguente *mix*:

| <b>MIX PCR (<math>\mu</math>L/campione)</b> |           |
|---|-----------|
| H <sub>2</sub> O                            | 35.4      |
| Tampone 10X                                 | 5.0       |
| dNTPs 2.5 mM                                | 4.0       |
| Primer forward 15 $\mu$ M                   | 2.0       |
| Primer reverse 15 $\mu$ M                   | 2.0       |
| Taq polimerasi 1UI/ $\mu$ L                 | 0.6       |
| <b>Volume finale</b>                        | <b>49</b> |

- Porre il *mix* in un microtubo da 200  $\mu$ L, aggiungere 1  $\mu$ L di DNA plasmidico e miscelare con il puntale (volume finale della reazione 50  $\mu$ L).
- Impostare il termociclatore ed iniziare la reazione.
- Controllare l'avvenuto inserimento e la taglia dell'amplicone mediante elettroforesi in gel di agarosio, confrontando l'altezza della banda ottenuta con quelle del marcatore di peso molecolare.

**MidiPrep (*midi preparation*) di DNA plasmidico:**

**protocollo QIAfilter™ Plasmid Midi kit (Qiagen®)**

*Una volta verificata la presenza dell'inserto e la sua taglia nei cloni ricombinanti, attraverso la metodica MiniPrep, si procede con la preparazione "Midi", una tecnica che permette di ottenere una grande quantità di plasmide ricombinante puro. I batteri contenenti il plasmide vengono coltivati in 50 mL di terreno. Dopodiché, il principio del kit utilizzato consiste nel centrifugare la coltura e risospendere il pellet batterico con un tampone Tris-EDTA pH 8, contenente RNasi. Dopo un trattamento con un detergente (SDS) in mezzo alcalino (NaOH), che porta alla lisi batterica ed al passaggio del plasmide in soluzione, i detriti cellulari, le proteine ed il DNA genomico vengono fatti precipitare dall'acetato di potassio. Il surnatante (lisato chiaro) viene, dunque, caricato in una colonna contenente una resina a scambio ionico in grado di trattenere gli acidi nucleici. Dopo un lavaggio (NaCl-MOPS-isopropanolo, pH 7), l'eluizione per shock osmotico (NaCl-Tris-isopropanolo, pH 8.5) libera il plasmide che in seguito viene concentrato attraverso una precipitazione con isopropanolo. Seguono una centrifugazione ed un lavaggio del pellet con etanolo, che favorisce l'eliminazione dei sali residui.*

*Grazie a questa procedura il DNA plasmidico risulta opportunamente purificato per la successiva digestione con enzimi di restrizione ed il sequenziamento.*

**Reattivi**

- ❖ Ampicillina 100 mg/mL
- ❖ 50 mL di LB brodo (autoclavato) per ciascun clone ricombinante
- ❖ Glicerolo 100% (Invitrogen, Milano, Italia)
- ❖ Isopropanolo
- ❖ Etanolo 70-75%
- ❖ Bromuro di etidio (10 mg/mL)
- ❖ TBE 1X
- ❖ Kit QIAfilter™ Plasmid Midi Kit (Qiagen, Milano, Italia) contenente:

| TAMPONE                                    | COMPOSIZIONE   | CONSERVAZIONE                |
|--|--|------------------------------|
| <b>P1</b> ( <i>Resuspension buffer</i> )   | Tris-HCl 50 mM, pH 8.0;<br>EDTA 10 mM;<br>RNasi A 100 $\mu$ g/mL | 2-8°C dopo aggiunta RNasi A  |
| <b>P2</b> ( <i>Lysis buffer</i> )          | NaOH 200 mM; SDS 1% (p/v)  | Temperatura ambiente         |
| <b>P3</b> ( <i>Neutralization buffer</i> ) | Acetato di K 3.0 M, pH 5.5                                       | Temperatura ambiente o 2-8°C |

|  |  |                      |
|--|--|----------------------|
| <b>QBT</b> ( <i>Equilibration buffer</i> ) | NaCl 750 mM;<br>MOPS <sup>(*)</sup> 50 mM, pH 7.0;<br>Isopropanolo 15% (v/v);<br>Triton <sup>®</sup> X-100 0.15% (v/v) | Temperatura ambiente |
| <b>QC</b> ( <i>Wash buffer</i> )           | NaCl 1.0 M;<br>MOPS 50 mM, pH 7.0;<br>Isopropanolo 15% (v/v)   | Temperatura ambiente |
| <b>QF</b> ( <i>Elution buffer</i> )        | NaCl 1.25 M<br>Tris-HCl 50 mM, pH 8.5;<br>Isopropanolo 15% (v/v)   | Temperatura ambiente |

(\*) MOPS = acido 3-(N-morfolino)propanesulfonico,  $pK_a$  7.2

### Procedimento

- La sera prima: sotto cappa a flusso laminare, preparare una beuta con tappo a vite da 500 mL autoclavata per ciascun campione con 50 mL di LB, addizionato di 50 µL di ampicillina.
  - A partire da una minicoltura testata precedentemente con Miniprep, prelevare 50 µL, pipettarli nella beuta e lasciarli in coltura per tutta la notte a 37°C con agitazione. La purificazione viene eseguita la mattina dopo.
- 
- La mattina dopo, preparare 5 microtubi da 2 mL autoclavati per ciascun campione e diluire in parti uguali un campione della coltura con glicerolo 100% autoclavato (per esempio 3 mL di coltura + 3 mL di glicerolo), mescolare il campione spipettando, distribuire equamente la soluzione nei microtubi. Conservare a -80°C.
  - Trasferire la coltura restante in un tubo Falcon da 50 mL sterile, equilibrare con LB o con acqua sterile e centrifugare a 4°C per 20 min a 5525xg.
  - Eliminare il surnatante con un gesto delicato, lento ma unico, facendo attenzione a non perdere il *pellet*.
  - Riprendere il *pellet* in 4 mL di tampone P1 (tampone di risospensione) e vortexare bene, fino a completa risospensione.
  - Aggiungere 4 mL di tampone P2 (tampone di lisi). Agitare manualmente. Non vortexare perché altrimenti si rischia di frammentare il DNA genomico. Lasciare 5 min a temperatura ambiente: al termine il lisato deve apparire viscoso.
  - Nel frattempo, installare una colonna per ciascun campione su una Falcon da 50 mL (tubo collettore), utilizzando l'apposito anello blu che si trova nel kit. Con una pipetta equilibrare la colonna con 4 mL di QBT (tampone che deterge la colonna e la prepara alle fasi successive) ed eliminare il liquido di raccolta; preparare 5 microtubi da 1,5 mL per ciascun campione che serviranno a prelevare dei campioni di controllo (50 µL) in ciascuna tappa:

N°1 = campione filtrato PRIMA del passaggio in colonna (presenza plasmide)

N°2 = campione filtrato DOPO il passaggio in colonna (assenza plasmide)

N°3 = liquido di lavaggio (assenza plasmide)

N°4 = eluito (presenza plasmide)

N°5 = campione finale di plasmide diluito 1:10

- Aggiungere 4 mL di tampone P3 (tampone di precipitazione). Agitare manualmente. Trasferire il tutto in una Falcon da 15 mL sterile e lasciare 5 min in ghiaccio. Si può notare la formazione di un precipitato bianco lanuginoso, che contiene DNA genomico, proteine, detriti cellulari ed SDS. Bilanciare le Falcon con tampone P3.
- Centrifugare a 4°C per 20 min a 5525xg. Si ottiene un *pellet* denso, biancastro ed un surnatante limpido con una sorta di isoletta bianca compatta in superficie. Trasferire delicatamente il liquido, esclusa l'isoletta bianca, in un altro tubo da 15 mL. Questo passaggio permette di compattare meglio il precipitato in modo da facilitare la successiva filtrazione. Se l'isoletta non permette il passaggio del liquido, spostarla con l'aiuto di un puntale. Se il liquido presenta delle impurità centrifugare nuovamente.
- Versare il liquido trasparente direttamente nella colonna. Prelevare un campione di 50 µl prima e dopo il passaggio in colonna (microtubo N° 1 e 2 ).
- Dopo il passaggio completo del filtrato, svuotare il tubo collettore e lavare la colonna 2 volte con 10 mL di tampone QC. Il primo lavaggio rimuove tutti i contaminanti dalla maggior parte delle precipitazioni plasmidiche. Il secondo è particolarmente necessario quando si usano grandi volumi di coltura o si utilizzano ceppi batterici che producono elevate quantità di carboidrati. Prelevare un campione dopo il passaggio in colonna (microtubo N°3).
- Cambiare il tubo collettore da 50 mL. Eluire con 5 mL di tampone QF. Prelevare un campione di eluito (microtubo N° 4).
- Aggiungere all'eluito 3,5 mL di isopropanolo con pipetta di vetro sterile. Mescolare, equilibrare i tubi Falcon e centrifugare a 4°C per 1 h a 5525xg.
- Eliminare delicatamente il surnatante con un unico gesto e riprendere il *pellet* in 2 mL di etanolo 70-75%. Vortexare velocemente e centrifugare a 4°C per 30 min a 5525xg.
- Aspirare tutto l'etanolo con una pompa a vuoto.
- Riprendere il *pellet* con 40 µl di acqua sterile. Porre il tubo qualche minuto a 4°C per attendere la reidratazione del *pellet*.
- Vortexare e trasferire il plasmide in un microtubo da 1,5 mL.
- Centrifugare a 4°C per 1 min a 16.110xg per precipitare ed eliminare il DNA salificato.
- Prelevare il surnatante, riporlo in un microtubo da 1,5 mL ben identificato (nome e data di purificazione del plasmide) e verificare la purezza del plasmide allo spettrofotometro.
- Conservare a -80°C.

### Controlli della purificazione del plasmide

#### **Determinazione della concentrazione con lo spettrofotometro**

Misurare l'assorbanza a 260 nm e a 280 nm di 2,5 µl di plasmide + 497,5 µl di acqua sterile (fattore di diluizione 200).

L'assorbanza di 1 unità a 260 nm corrisponde a 50 µg di DNA per mL ( $A_{260} = 1 \rightarrow 50 \mu\text{g/mL}$ )

Stima della concentrazione:  $[\text{DNA}] \mu\text{g/mL} = 50 \times A_{260} \times \text{fattore di diluizione}$

Verifica della purezza del campione:  $A_{260}/A_{280}$  deve essere  $> 1,6$

#### **Elettroforesi in gel d'agarosio 0,8% addizionato di bromuro di etidio**

##### **Reattivi**

- ❖ Bromuro di etidio 10 mg/mL
- ❖ TBE 1X
- ❖ Agarosio in polvere
- ❖ *Loading buffer*
- ❖ *Marker* di peso molecolare

##### **Procedimento**

- Preparare i campioni nel modo seguente:
  - N° 1-2-3-4  $\rightarrow$  5 µl di campione + 5 µl di TBE + 2 µl di BBP
  - N°5  $\rightarrow$  2 µl di plasmide diluito 1:10 + 8 µl di TBE + 2 µl di BBP
- Caricare i campioni nei pozzetti del gel e far migrare a 100 V per circa 15 min (finché il fronte di migrazione del blu di bromofenolo raggiunge la metà del gel).
- Dopo l'elettroforesi il plasmide dovrà essere visibile agli UV in grande quantità prima del passaggio in colonna e nell'eluato purificato, ma non dovrà essere visibile né dopo il passaggio in colonna né dopo il lavaggio.

**Digestione con enzimi di restrizione**

*Il plasmide viene sottoposto indirettamente a verifica della sequenza attraverso la digestione con enzimi in grado di riconoscere e scindere solo determinate sequenze target.*

**Reattivi**

- ❖ Enzimi di restrizione, Fermentas, M-Medical, Milano Italia
- ❖ Tampone 10X specifico per ciascun enzima di restrizione, Fermentas, M-Medical, Milano Italia
- ❖ Acqua DEPC sterile
- ❖ Agarosio
- ❖ Bromuro di etidio 10 mg/mL
- ❖ TBE 1X

**Procedimento**

- Inserire nel programma *webcutter 2.0*, presente nel sito web <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/> la sequenza nucleotidica utilizzata come riferimento ed annotare gli enzimi di restrizione che possono essere utilizzati per la digestione del plasmide in questione.
- Preparare le mappe di restrizione per ciascun gene clonato. La mappa di restrizione consiste nel riordinamento dei siti di restrizione, in modo da poter conoscere la lunghezza in paia di basi (bp) dei frammenti che si formeranno in seguito alla digestione enzimatica. Ciò faciliterà la verifica o meno della corretta amplificazione e purificazione del plasmide.
- Per ciascun enzima di restrizione scelto, preparare il seguente *mix*:

|  | <b>µl / microtubo</b>        |
|--|------------------------------|
| <b>Plasmide</b>                        | Volume corrispondente a 1 µg |
| <b>Tampone 10X ideale per l'enzima</b> | 2                            |
| <b>Enzima di restrizione</b>           | 1                            |
| <b>Acqua sterile</b>                   | Qbp 20 µl                    |

- L'endonucleasi va aggiunta nel *mix* come ultimo reattivo. La digestione viene effettuata ponendo i campioni in un bagnomaria per 2 ore, alla temperatura ideale per l'enzima utilizzato (solitamente 37°C).
- Controllare l'esattezza della taglia dei frammenti con un'elettroforesi in gel d'agarosio, seguita da lettura del gel agli UV per visualizzare le bande separate.

### Sequenziamento

- Determinare la concentrazione del plasmide purificato mediante lettura allo spettrofotometro e diluirlo opportunamente in acqua.
- Porre in un microtubo da 200  $\mu$ L un volume corrispondente a 500 ng di DNA (massimo 10  $\mu$ L).
- Aggiungere un volume corrispondente a 6.4 pmol di un solo *primer* (specifico per il gene di interesse o universale: per esempio T7, M13 *forward*, M13 *reverse*).
- Portare a secco il campione ponendo il tubo nel termociclatore a 65°C per 20-30 min (se il *pellet* non è ancora secco ripetere questo passaggio).
- Spedire il campione al Servizio di Sequenziamento di DNA del C.R.I.B.I. (Centro Ricerche Interdipartimentale sulle Biotecnologie Innovative del Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova). In questa sede, il sequenziamento viene eseguito in piastre da 96 pozzetti mediante sequenziatori automatici ABI 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con la chimica del Big Dye™ Terminator v 3.1 (metodo enzimatico di Sanger).
- Leggere sotto forma di cromatogramma le sequenze degli amplificati ed analizzarle mediante l'uso del programma Chromas, che permette di visualizzare i picchi corrispondenti al segnale di fluorescenza emesso dalle diverse sonde corrispondenti alle quattro basi del DNA.

### 3.2. RISULTATI

I dati di concentrazione e purezza dell'estratto di RNA totale utilizzato in questo esperimento vengono riportati in tabella 3.2.1.

| Campione        | Abs 260 nm | Abs 280 nm | Abs 260/ Abs 280 | Concentrazione ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) |
|-----------------|------------|------------|------------------|--|
| K <sub>2</sub>  | 0.220      | 0.084      | 2.6              | 2.20   |
| K <sub>3</sub>  | 0.197      | 0.084      | 2.3              | 1.97   |
| PB <sub>1</sub> | 0.125      | 0.051      | 2.5              | 1.25   |
| PB <sub>2</sub> | 0.242      | 0.109      | 2.2              | 2.42   |

Tabella 3.2.1: Valutazione quali- e quantitativa dei campioni di RNA estratti. Vengono riportati i dati di concentrazione ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e di purezza (rapporto assorbanza a 260 e 280 nm) ottenuti mediante lettura allo spettrofotometro.

La qualità dell'RNA estratto è stata valutata anche attraverso l'elettroforesi su gel denaturante di agarosio. L'integrità dell'acido nucleico può essere stimata attraverso l'osservazione comparativa delle bande ribosomiali 28S e 18S. In una buona preparazione, la banda superiore (28S) dovrebbe essere due volte più rifrangente della banda inferiore (18S), la banda 5S (RNA di piccole dimensioni) dovrebbe essere poco evidente e non dovrebbero esserci effetti di *smear* (vedi figura 3.2.1).

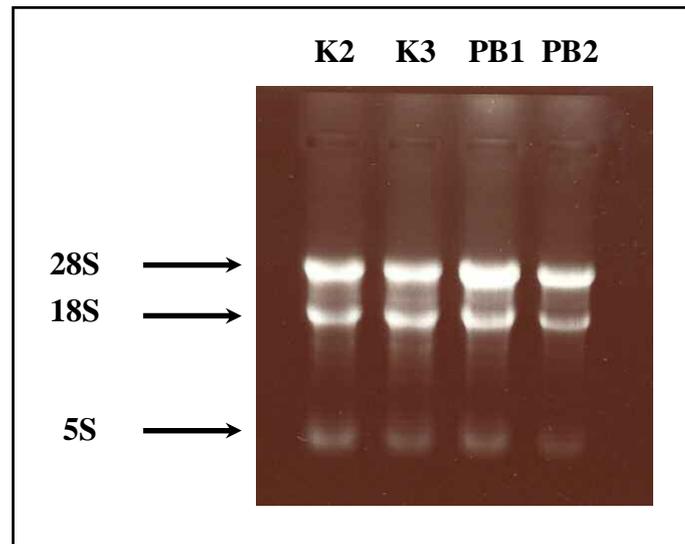


Figura 3.2.1: Elettroforesi su gel denaturante di agarosio 1.2% di 10  $\mu\text{g}$  di RNA per ciascun campione estratto (K = estratti di controllo, PB = estratti di animali trattati con fenobarbitale).

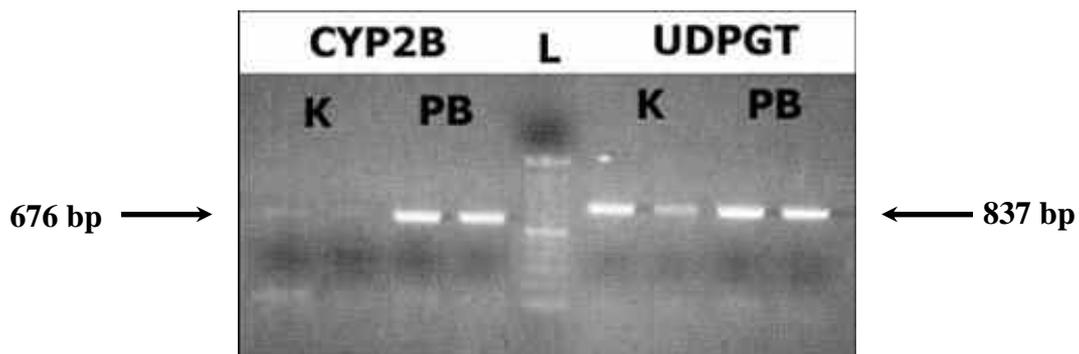
L'RNA è stato quindi retrotrascritto in cDNA per la successiva amplificazione e si è quindi proceduto con l'analisi bioinformatica e con il disegno di *primers* gene-specifici. Nella tabella sottostante (tabella n. 3.2.2) vengono riportati i geni oggetto di studio, le sequenze di riferimento utilizzate per il disegno dei *primers* e gli oligonucleotidi disegnati con le relative specifiche.

| Gene          | Sequenza di riferimento | Primers (5' - 3')                                   | Lungh. (bp) | Tm (°C)        | % GC     | Lungh. amplicone (bp) |
|---------------|-------------------------|---|-------------|----------------|----------|-----------------------|
| <b>CYP2B</b>  | NM_214413               | F: GCTCTACTCCGCCTTCTTGA<br>R: AGTTCTGGAGGATGGTGGTG  | 20<br>20    | 59.72<br>59.96 | 55<br>55 | 676                   |
| <b>CYP4A</b>  | CB455420                | F: AGAATGGAGAATGGGAGCAG<br>R: GGATCTCAGCACCATGATTG  | 20<br>20    | 59.24<br>59.04 | 50<br>50 | 560                   |
| <b>GRa</b>    | AY238475                | F: GGAAGCTCGAATGAGGACTG<br>R: AGCAGTGACACCAGTGTGG   | 20<br>20    | 59.95<br>60.04 | 55<br>55 | 850                   |
| <b>HNF4a</b>  | AY318752                | F: CGTGGTGGACAAAGACAAGA<br>R: TACTGGCGGTTCGTTGATGTA | 20<br>20    | 59.72<br>60.13 | 50<br>50 | 638                   |
| <b>RXRa</b>   | BM251204                | F: ACGAGTCGTGTGGAAAACG<br>R: GGAACGAGCTGCTCATCG     | 19<br>18    | 59.74<br>60.68 | 53<br>61 | 573                   |
| <b>UGT1A4</b> | NM_174762               | F: AAGTCAACCTGCTCCTCCAA<br>R: AAGTCAACCTGCTCCTCCAA  | 20<br>20    | 59.84<br>60.06 | 50<br>50 | 837                   |

Tabella n. 3.2.2: Geni oggetto di studio per clonaggio e sequenziamento, sequenze utilizzate come riferimento e *primers* disegnati per il saggio in PCR *end-point*. Vengono riportate le caratteristiche di lunghezza (bp), temperatura di *melting* (Tm) e % in GC dei *primers* e la lunghezza dell'amplicone atteso (bp).

I geni amplificati mediante PCR *end-point* sono stati poi sottoposti a verifica mediante elettroforesi su gel di agarosio per controllare l'avvenuta reazione, nonché l'esattezza della taglia dell'amplicone ottenuto. Nelle figure sottostanti (3.2.2 A e B) ne vengono riportati due esempi.

A



B

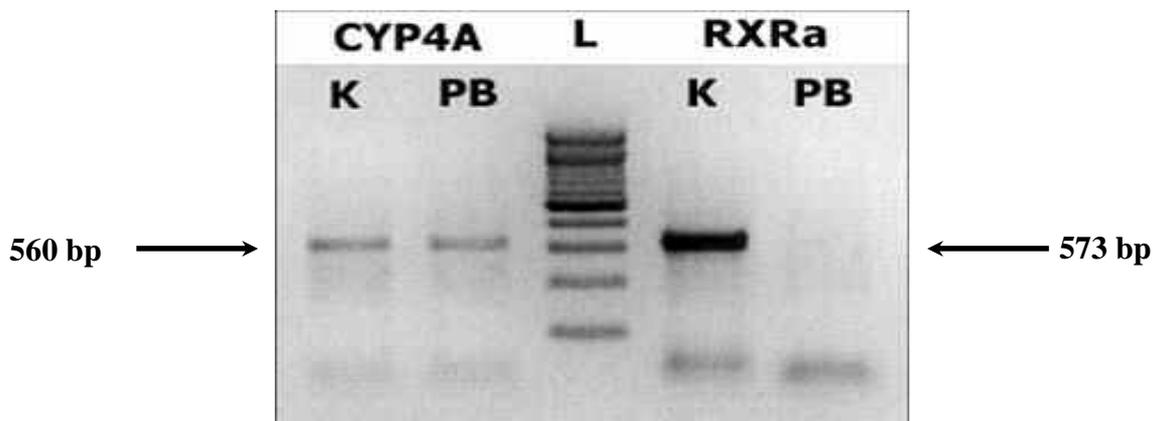


Figura n. 3.2.2: Elettroforesi su gel di agarosio 1.2% di prodotti di PCR ottenuti in seguito all'amplificazione dei geni CYP2B, UDPGT (A), CYP4A e RXR $\alpha$  (B) sia in vitelli di controllo (K) e trattati con fenobarbitale (PB). L: *ladder* (marker di peso molecolare) di 100 bp (A) e 200 bp (B).

I geni amplificati sono stati poi oggetto di clonaggio mediante l'utilizzo del kit TOPO TA cloning<sup>®</sup>, come riportato nella sezione Materiali e Metodi. Successivamente sono state microamplificate in brodo LB dieci

colonie bianche (cloni con l'inserto in oggetto), scelte casualmente. Tali cloni sono stati processati utilizzando la metodica della MiniPrep, che permette di estrarre e purificare il plasmide ricombinante. Il DNA plasmidico ottenuto è stato sottoposto a digestione con enzima EcoRI, per verificare l'esattezza dell'inserto. La figura 3.2.3 rappresenta l'elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti della digestione dei plasmidi ricombinanti ottenuti da 10 cloni differenti: questo approccio permette di scegliere la colonia da sottoporre a Midi-amplificazione e MidiPrep.

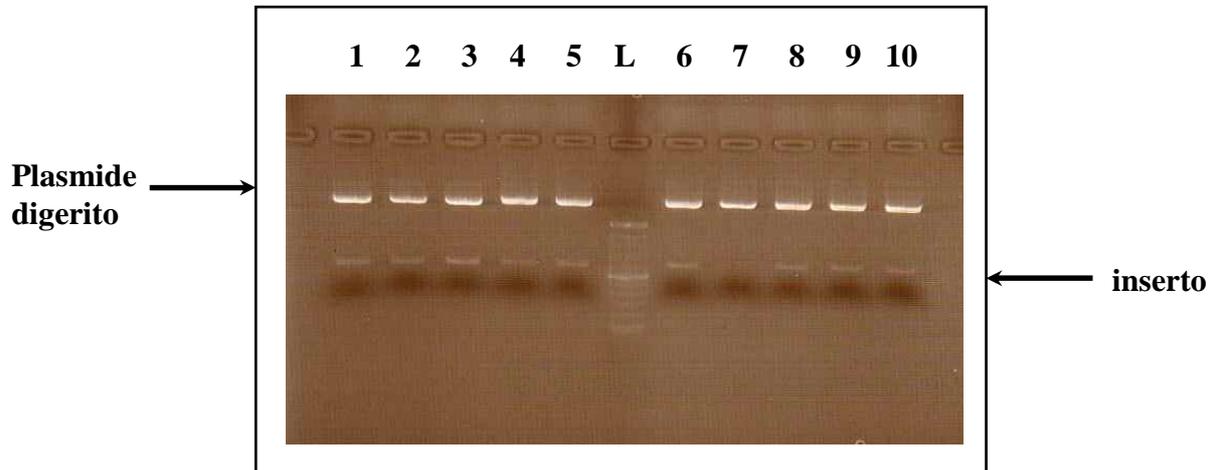


Figura 3.2.3: elettroforesi su gel di agarosio 1.5% dei prodotti della digestione con EcoRI dei plasmidi ricombinanti ottenuti da 10 cloni diversi, indicati con i numeri da 1 a 10. L = marcatore di peso molecolare (100 bp). Con le frecce vengono indicati l'inserto di DNA di HNF4 $\alpha$  (lunghezza di 657 bp data dalla somma della lunghezza dell'amplicone + 19 bp corrispondenti ai frammenti del plasmide, posti a monte e a valle dell'inserto, soggetti a restrizione da parte di EcoRI) e il plasmide rimanente (circa 3900 bp). Nella colonia indicata con il numero 7, per esempio, non si evidenzia l'inserto.

Scelta la colonia batterica contenente l'inserto oggetto di studio, viene sottoposta ad amplificazione e purificazione (MidiPrep di DNA plasmidico) per il successivo sequenziamento. Per accertarsi ulteriormente che la sequenza del DNA amplificato corrisponda a quella attesa, il plasmide ricombinante viene digerito con enzimi di restrizione (vedi figura 3.2.4).

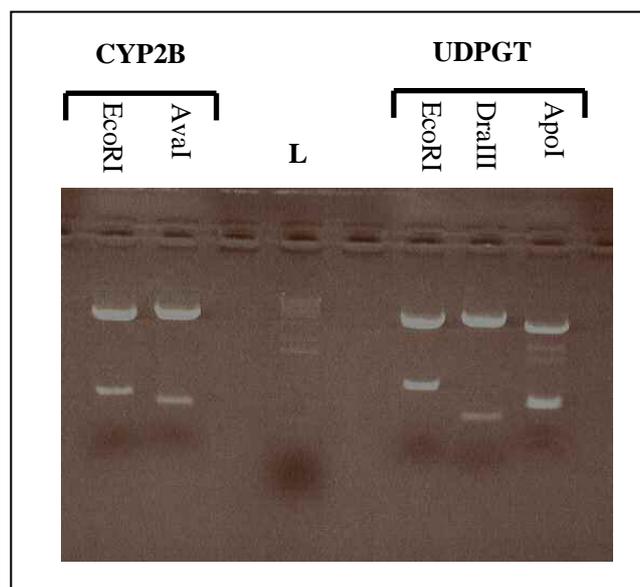


Figura 3.2.4: Elettroforesi su gel di agarosio 1.5% dei prodotti della digestione con enzimi di restrizione dei plasmidi ricombinanti contenenti gli inserti CYP2B e UDPGT. L = marcatore di peso molecolare (200 bp).

Il DNA plasmidico purificato è stato poi quantificato e diluito in modo opportuno per il sequenziamento: la sequenza degli ampliconi così ottenuta è stata poi letta sottoforma di cromatogramma ed analizzata mediante l'uso del programma Chromas, che permette di visualizzare i picchi corrispondenti al segnale di fluorescenza emesso dalle diverse sonde corrispondenti alle quattro basi del DNA (vedi esempio sottostante: figura 3.2.6).

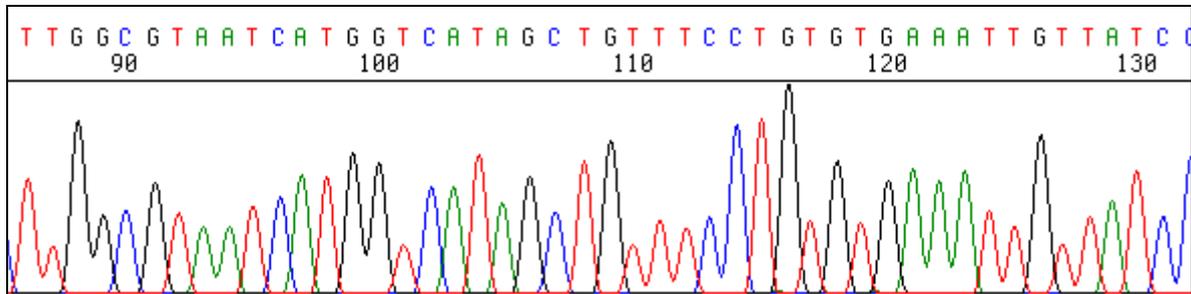


Figura 3.2.6: Esempio di cromatogramma ottenuto dal sequenziamento.

Le sequenze così ottenute sono state controllate mediante confronto con le sequenze disponibili nelle banche dati e dopo l'avvenuta conferma, sono state inserite nel sito dell'NCBI con la denominazione ed il codice di accesso indicati nella tabella 3.2.3.

| Gene          | Nome  | GenBank ID | Taglia (bp) |
|---------------|---|------------|-------------|
| CYP2B         | Bos taurus cytochrome P450 family 2 subfamily B (CYP2B) mRNA, partial cds             | DQ087595   | 676         |
| CYP4A         | Bos taurus cytochrome P450 family 4 subfamily A (CYP4A) mRNA, partial cds             | DQ100360   | 560         |
| GR $\alpha$   | Bos taurus retinoid X receptor alpha (RXR $\alpha$ ) mRNA, partial cds                | DQ100361   | 850         |
| HNF4 $\alpha$ | Bos taurus UDP-glycosyltransferase 1 family polypeptide A4 (UGT1A4) mRNA, partial cds | DQ192584   | 638         |
| RXR $\alpha$  | Bos taurus glucocorticoid receptor (GR) mRNA, partial cds                             | DQ192585   | 573         |
| UDPGT         | Bos taurus hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4A) mRNA, partial cds                | DQ192586   | 837         |

Tabella 3.2.3: Geni di bovino clonati, la cui sequenza è stata inserita nella banca dati dell'NCBI. Vengono riportati il nome del gene bovino, la denominazione per esteso, il codice identificativo (ID) e la lunghezza della sequenza parziale.

### 3.3. DISCUSSIONE

Negli ultimi decenni si è assistito allo sviluppo e all'applicazione di nuovi metodi e tecnologie in grado di analizzare il completo genoma, comprendere le interazioni tra i suoi costituenti, identificare e quantificare i cambiamenti di espressione genica globale che avvengono nella cellula. Questo approccio è stato possibile grazie al completamento di progetti di sequenziamento, che hanno reso disponibili le sequenze del genoma completo di diversi organismi (compreso l'uomo a partire dal febbraio 2001) come *Drosophila*, due specie di lievito e molte specie di mammifero (Waring e Halbert, 2002), come, tra le altre, scimmia, topo, ratto, cavia, cane, gatto, coniglio, bovino e gallo, nonché allo sviluppo di potenti programmi bioinformatici in grado di analizzare estensivamente il genoma e di costruire mappe di distribuzione dei geni.

Benché ad oggi il genoma bovino sia stato completamente sequenziato, occorre segnalare la carenza di informazioni relative alle sequenze codificanti per i geni del metabolismo in questa specie animale, nonché l'esistenza di tutta una serie di problematiche legate alla corretta denominazione e classificazione di questi stessi geni.

Lo scopo del presente lavoro è stato quindi quello di implementare le conoscenze sulle sequenze bovine adottando delle tecniche standardizzate di biologia molecolare messe a punto e successivamente apprese nel corso di un soggiorno di studio presso l'Istituto Nazionale di Ricerca Agronomica "I.N.R.A." di Toulouse (Francia). Queste tecniche hanno permesso di ottenere un template di buona qualità (RNA totale integro e puro) per la successiva amplificazione in PCR. L'analisi bioinformatica effettuata ha permesso la progettazione di *primers* efficienti per l'amplificazione di regioni di cDNA altamente conservate tra le specie e quindi anche nel bovino, pur non avendo a disposizione la sequenza specie-specifica. Infine il clonaggio e la successiva amplificazione del DNA plasmidico, hanno permesso di ottenere un template ottimale per il successivo sequenziamento. L'approccio sperimentale utilizzato pertanto, ha permesso di fornire ai *database* dei dati utili all'elaborazione delle informazioni ottenute invece inizialmente solo da potenti programmi bioinformatici di predizione.

I risultati ottenuti in questo lavoro, hanno rappresentato quindi un primo piccolo passo verso l'implementazione dei dati disponibili per il bovino e determinano le basi per la successiva definizione di tecnologie *-omics* per lo *screening* dei trattamenti illeciti nel bovino da carne. Le sequenze riportate in questa tesi infatti, oltre alle altre inserite nella pubblicazione Cantiello *et al.* (2005), sono state utili per la definizione dei saggi di *Real Time PCR* riportati negli esperimenti seguenti, nonché per il disegno di sonde per *Northern blotting*, che sono state impiegate con successo in esperimenti in cui vitelli a carne bianca sono stati trattati a scopo illecito con un *cocktail* di promotori della crescita o con solo desametazione (Cantiello *et al.*, 2008a, Cantiello *et al.*, 2008b). In più, le sequenze depositate nelle banche dati, sono state citate anche da altri autori (Greger *et al.*, 2006), ed utilizzate in uno studio sull'ontogenesi degli enzimi biotrasformativi e dei recettori nucleari nel vitello a carne bianca.

***EFFETTO DELLA RAZZA SULL'ESPRESSIONE  
DEL CITOCROMO P450 E DEGLI ENZIMI DI FASE II  
NEL FEGATO DI BOVINO***

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

Effect of breed upon cytochrome P450s and phase II enzymes expression in cattle liver.

*Drug Metabolism and Disposition (submitted)*



#### 4.1. MATERIALI E METODI

##### Animali

In questa sperimentazione sono stati utilizzati 25 vitelloni maschi da carne appartenenti a tre razze diverse, in particolare Charolais (CH, n = 10, peso medio 700 kg), Piemontese (PM, n = 8, peso medio 650 kg) e Blonde d'Aquitaine (BA, n = 7, peso medio 600 kg), provenienti da allevamenti certificati della Regione Piemonte. Tali animali, dell'età di 18-20 mesi sono stati scelti sulla base di un Progetto di Ricerca finanziato dalla Regione Piemonte, volto a definire dei parametri immunologici, istologici, zootecnici e farmacotossicologici di controllo standard, utilizzabili nello *screening* dei trattamenti illeciti nella filiera bovina.

Tali animali, sono stati macellati secondo la normativa italiana vigente (Regolamenti della Comunità Europea 853/2004 e 854/2004 che riportano i criteri igienici specifici da seguire nell'organizzazione dei controlli ufficiali dei prodotti di origine animale destinati al consumo umano).

In questa sede, è stato rimosso il lobo caudato epatico, da cui sono state prelevate in sterilità delle aliquote di circa 100 mg per l'estrazione dell'RNA messaggero, immediatamente sottoposte a congelamento in azoto liquido e stoccate a -80°C fino all'utilizzo.

La rimanente parte del lobo caudato invece, è stata perfusa con una soluzione isotonica fredda di KCl per rimuovere il più possibile l'emoglobina presente, poi tagliata a pezzetti, rivestita con carta stagnola e trasportata in laboratorio in ghiaccio nell'arco di un massimo di due ore dal sacrificio dell'animale. Una volta in laboratorio, aliquote di 20-30 g di fegato, esenti da alterazioni patologiche evidenti, sono state sottoposte ad omogeneizzazione per l'allestimento delle frazioni subcellulari epatiche.

Su tali frazioni sono state determinate le principali attività catalitiche ossidative P450-dipendenti e coniugative (uridindifosfoglucuroniltransferasi e glutatione S-transferasi), utilizzando substrati modello dedotti da precedenti studi di metabolismo condotti in uomo e nelle specie da laboratorio, nonché l'espressione proteica, mediante immunoblotting delle isoforme CYP1A, CYP2B, CYP2C, CYP2E e CYP3A.

### Estrazione RNA totale da campioni di fegato

#### Reattivi

- ❖ TRIzol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen, Milano, Italia): fenolo acido-guanidina tiocianato
- ❖ Cloroformio, J.T. Baker, Mallinckrodt, Olanda
- ❖ Isopropanolo, J.T. Baker, Mallinckrodt, Olanda
- ❖ Etanolo 70-75%, J.T. Baker, Mallinckrodt, Olanda
- ❖ Acqua DEPC, AppliChem, Milano, Italia

#### Procedimento

- Preparare un numero di microtubi da 2 mL con tappo a vite contenenti Sylica Beads Lysin Matrix D (Qbiogene, MP Biomedicals, Illkirch, France) corrispondenti ai campioni da processare. Siglarli opportunamente e porli in un *criobox* a -70°C o in ghiaccio secco per permetterne il raffreddamento.
- Porre i campioni, tolti dal -80°C nei tubi raffreddati conservati nella scatola a tenuta termica.
- Sotto cappa, aggiungere in ciascun tubo 1 mL di TRIzol<sup>®</sup> freddo.
- Omogeneizzare i campioni con FastPrep<sup>®</sup> (Qbiogene, MP Biomedicals, Illkirch, France) a velocità 6 per 10 secondi.
- Ripetere il punto precedente per un massimo di 3 volte per non rischiare di scaldare troppo il campione.
- Centrifugare a 12.000xg per 10 secondi, a 4°C per far depositare sul fondo del tubo le *beads* e le particelle di tessuto non omogeneizzate.
- Prelevare il surnatante (1 mL circa) e porlo in un nuovo tubo da 1.5 mL opportunamente siglato.
- Aggiungere 200 µL di cloroformio e agitare vigorosamente per inversione almeno 15 secondi. Incubare 5 minuti (min) a temperatura ambiente.
- Centrifugare a 4°C per 10 min a 12.000xg.
- Trasferire la porzione acquosa (all'incirca 500 µL) in un nuovo microtubo da 1.5 mL.
- Aggiungere un ugual volume di isopropanolo, agitare per inversione ed incubare per 5 min a temperatura ambiente.
- Centrifugare a 4°C per 10 min a 12.000xg ed eliminare il surnatante utilizzando una pompa a vuoto.
- Riprendere il *pellet* in 1 mL di etanolo al 70-75% e vortexare fintanto che il *pellet* non si stacca dal fondo.
- Centrifugare a 4°C per 10 min a 12.000xg ed eliminare il surnatante utilizzando una pompa a vuoto.
- Dissolvere il *pellet* in acqua DEPC (da 30 a 150 µL, a seconda delle dimensioni del *pellet*) ed attendere fino a completo scioglimento in ghiaccio e vortexare.
- Centrifugare a 4°C per 1 min a 12.000xg per far precipitare l'RNA salificato eventualmente presente.
- Recuperare il surnatante.
- Preparare aliquote per elettroforesi in gel di agarosio, lettura al NanoDrop e retrotrascrizione.
- Conservare il campione a -80°C.

### **Valutazione qualitativa e quantitativa dell'estratto:**

#### **Elettroforesi su gel di agarosio all'1% e lettura al NanoDrop**

*Per valutare l'integrità dell'RNA è necessario effettuare l'elettroforesi su gel d'agarosio 1% in presenza di bromuro di etidio (marcatore intercalante) e tampone TBE 1X. La qualità, oltre alla quantità dell'estratto, può essere anche valutata mediante lettura al Nanodrop: con lo spettrofotometro infatti viene misurato il grado di purezza attraverso il calcolo del rapporto tra i valori delle assorbanze lette a 260 nm e a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) e quello  $A_{260}/A_{230}$ : se l'RNA è privo di contaminanti, tali valori sono compresi tra 1.8 e 2.1. Il rapporto  $A_{260}/A_{280}$  indica la presenza di residui proteici, lipidici o polisaccaridici, mentre il rapporto  $A_{260}/A_{230}$  segnala la contaminazione dell'estratto da parte di solventi quali Tris, EDTA, fenolo o da parte della guanidina tiocianato, che assorbe tra 230 nm e 260 nm. I vantaggi dell'utilizzo del NanoDrop consistono nel minimo consumo di RNA (1-2  $\mu$ l) e nel fatto che il campione bagna direttamente il sistema ottico, riducendo così le variazioni e le contaminazioni dovute alla sostituzione delle cuvette; infine, lo spettro misurato è tra 220 e 750 nm, consentendo di ottenere maggiori informazioni relativamente all'integrità dell'RNA o alla presenza di contaminanti chimici. Tuttavia, come tutti gli spettrofotometri, non è in grado di discriminare tra RNA e DNA genomico, poiché entrambi assorbono a 260 nm, quindi per valutare l'eventuale contaminazione dell'estratto, è importante confrontare i dati quantitativi con il gel di corsa in elettroforesi.*

#### **Reattivi**

- ❖ Colorante di caricamento (SSCP *Loading dye*) composto da blu di bromofenolo 0.1%, xilene cianolo FF 0.1%, EDTA 10 mM (pH 8.0) e formaldeide 98% (Sigma, Milano, Italia)
- ❖ Agarosio, AppliChem, Milano, Italia
- ❖ TBE 1X contenente Tris-HCl 89 mM, acido borico 89 mM ed EDTA 2 mM, pH 8.0 (Sigma, Milano, Italia)
- ❖ Bromuro di etidio, Sigma, Milano, Italia

#### **Procedimento**

- Aggiungere a 5  $\mu$ l di campione 1  $\mu$ l di SSCP, che ha sull'RNA un'azione denaturante.
- Denaturare i campioni a 70°C per 5 min in un termoblocco o in un termociclatore e mettere in ghiaccio per i successivi 5 min.
- Caricare i campioni sul gel (volume finale di caricamento di 6  $\mu$ l) e sottoporli ad elettroforesi a 100 V per 20 min.
- Dopo la corsa, visualizzare e fotografare i campioni di RNA al transilluminatore a luce UV *Image Master VDS* (Amersham Biosciences, Milano). In questo modo, se l'RNA è integro, vengono visualizzate due bande corrispondenti alle due componenti di RNA ribosomiale: 18S (1.9 kb) e 28S (5 kb).
- Per valutare, invece, la quantità dell'estratto, viene effettuata l'analisi della densità ottica con spettrofotometro *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop Technologies, Wilmington, UK) utilizzando 1.5  $\mu$ l di campione.

### Lettura dei campioni con Agilent 2100 Bioanalyser

#### Reattivi

- ❖ LabChip (Agilent Technologies, Waldbroon, Germany)
- ❖ RNA 6000 Nano gel matrix (Agilent Technologies, Waldbroon, Germany)
- ❖ RNA 6000 Nano gel dye (Agilent Technologies, Waldbroon, Germany)
- ❖ RNase Zap<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France)
- ❖ RNA Nano *Marker* 6000 (Agilent Technologies, Waldbroon, Germany)
- ❖ RNA ladder (Agilent Technologies, Waldbroon, Germany)
- ❖ Acqua RNasi-free

#### Procedimento

- Porre 550 µL di RNA 6000 Nano gel matrix in un tubo con filtro e centrifugare a 1500xg per 10 min; ripartire 65 µL di gel filtrato in tubi da 0.5 mL opportunamente identificati.
- Porre l'RNA 6000 Nano dye concentrato a temperatura ambiente per 30 min; vortexare per 10 secondi, spinnare velocemente ed aggiungere 1 µL di questa soluzione in un tubo contenente i 65 µL di gel filtrato. Vortexare e centrifugare 10 min a 13000xg a temperatura ambiente.
- Diluire con acqua nucleasi-free l'RNA da dosare in modo tale da ottenere una concentrazione tra 25 e 500 ng/µL (ottimale da 100 a 200 ng/µL) e conservare i campioni in ghiaccio.
- Denaturare i campioni di RNA ed un'aliquota da 5 µL di RNA *ladder* per 2 min a 70°C e poi porre i tubi in ghiaccio per almeno 2 min.
- Pulire gli elettrodi dello strumento con i *chip* per il lavaggio: prima per 1 min con 350 µL di RNase Zap<sup>®</sup> e poi per un altro min con 350 µL di acqua nucleasi-free.
- Prendere la Chip Priming Station e posizionare un nuovo *chip* al suo interno.
- Prendere la siringa e posizionare lo stantuffo ad un volume di 1 mL; infilare la siringa ed avvitarla sull'adattatore "Luer Lock".
- Porre 9 µL del *mix gel-dye* nel pozzetto identificato con una G su fondo scuro, andando con il puntale fino in fondo al pozzetto.
- Chiudere la Chip Priming Station e spingere sullo stantuffo della siringa in modo lento e continuo fino a fine corsa per distribuire omogeneamente il gel all'interno del *chip*. Attendere 30 secondi e poi rilasciare il bottoncino di chiusura: il pistone si alzerà da solo ma sarà necessario riposizionarlo al volume di 1 mL.
- Porre 9 µL del *mix gel-dye* in ciascuno degli altri due pozzetti contrassegnati da una G.
- Porre 5 µL di RNA Nano *Marker* 6000 nel pozzetto in basso a destra (contrassegnato da una scaletta) ed in tutti i 12 pozzetti dedicati all'analisi dei campioni; nei pozzetti che rimarranno vuoti invece porre 6 µL di RNA Nano *Marker* 6000.
- Porre 1 µL di RNA *ladder* nel pozzetto contrassegnato da una scaletta e 1 µL di campione di RNA nei pozzetto per i campioni.
- Vortexare il *chip* utilizzando l'apposito supporto per 1 min a 2400 rpm.
- Inserire il *chip* nello strumento ed effettuare la lettura al Bioanalyser (5 min).

**Trascrizione inversa (RT)****Reattivi**

- ❖ High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) contenente: Random *Primers* RT 10X, *mix* dNTPs 25X (100 mM), tampone RT 10X e Multiscribe™ Reverse Transcriptase 50 U/μL
- ❖ Acqua DEPC

**Procedimento**

- Scongellare i reagenti e l'RNA in ghiaccio; lasciare invece l'enzima a -20°C fino al momento dell'uso.
- Diluire i campioni di RNA con acqua DEPC in modo tale da ottenere una concentrazione di 200 ng/ μL.
- Preparare il *mix* 2X secondo il seguente schema:

| Reagenti                                   | Volume (μL) |
|--|-------------|
| Tampone RT 10X                             | 2.0         |
| dNTPs mix 25X                              | 0.8         |
| Random <i>Primers</i> RT 10X               | 2.0         |
| Multiscribe™ Reverse Transcriptase 50 U/μL | 1.0         |
| Acqua                                      | 4.2         |
| Volume finale                              | 10.0        |

- Distribuire 10 μL del *mix* 2X in ciascun microtubo da 200 μL.
- Aggiungere in ciascun pozzetto di una piastra a 96 pozzetti (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) 10 μL di RNA 200 ng/μL (totale 2 μg di RNA) e mescolare bene con la pipetta.
- Preparare il controllo negativo (RT-) secondo quanto riportato in precedenza, sostituendo la trascrittasi inversa con acqua.
- Chiudere la piastra con *cover* di alluminio (Qbiogene, MP Biomedicals, Illkirch, France) e vortexare per alcuni secondi per miscelare bene RNA e *mix*.
- Incubare nel termociclatore (adatto per piastre a 96 pozzetti) a 25°C per 10 min e a 37°C per 2h.
- Al termine della reazione, preparare diluizioni 1:20 del cDNA con acqua DEPC.
- Conservare le diluizioni di cDNA a 4°C per un utilizzo rapido o conservarle a -20°C.

### **Risorse bioinformatiche**

Per la ricerca di informazioni relative ai geni coinvolti nel metabolismo ossidativo e coniugativo nel bovino, per la verifica della disponibilità delle sequenze nelle banche dati e per l'analisi delle stesse finalizzata alla costruzione di *primers*, sono disponibili diverse risorse bioinformatiche.

Nella prima parte della ricerca sono stati utilizzati i siti NCBI (*National Center for Biotechnology Information*: <http://ncbi.nlm.nih.gov/>) ed Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>), che hanno permesso di accedere alle sequenze genomiche, dei trascritti e delle proteine, nonché alle pubblicazioni relative. Una volta identificate una o più sequenze di mRNA del gene bovino selezionato, esse sono state confrontate usando il programma *Multalin* ([www.toulouse.inra.fr/multalin/multalin](http://www.toulouse.inra.fr/multalin/multalin)), disponibile in rete ed è stata poi scelta la sequenza più idonea, con la quale proseguire l'analisi. Poiché i geni del metabolismo ossidativo e coniugativo appartengono a superfamiglie multigeniche (i.e. CYP, UGT, GST), le cui famiglie, sottofamiglie e singole isoforme vengono classificate sulla base dell'identità nella sequenza aminoacidica (Guengerich, 2003), risulta di notevole importanza individuare mediante allineamento le regioni delle sequenze su cui disegnare *primers* specifici per una certa isoforma e che nel contempo permettano di differenziare un enzima da un altro appartenente alla stessa famiglia o sottofamiglia (per esempio CYP1A1 e CYP1A2). anche quest'ultima analisi è stata effettuata utilizzando il programma citato subito sopra.

Ci si è serviti successivamente di un altro strumento informatico, l'*USCS Genome Browser* (*Genome Bioinformatics Group of UC Santa Cruz*: <http://genome.uscs.edu/>), il quale visualizza le sequenze genomiche delle specie sottoposte a completo sequenziamento, mostra esoni ed introni e fornisce annotazioni sulle caratteristiche della sequenza stessa. Dallo stesso sito si può accedere anche a *Blat*, che consente di eseguire ricerche di omologia tra una sequenza immessa ed il genoma di organismi noti e completamente sequenziati; questo è particolarmente utile se si vuole capire dove la sequenza si collochi nel genoma, in quale cromosoma ed in che posizione esonica di un gene vada a localizzarsi; è possibile, inoltre, vedere se ci sono *splicing* alternativi, isoforme geniche, eventuali polimorfismi, conoscere le giunzioni esone-introne ed avere informazioni sulla struttura tridimensionale della proteina correlata.

### Selezione dei geni target

Nella Tabella 4.1.1, sono riportati i geni, coinvolti nel metabolismo ossidativo e coniugativo, che sulla base di ricerche bibliografiche, sono stati selezionati per le successive analisi.

| <b>Gene target</b> | <b>Nome</b>                       | <b>ID GenBank</b> |
|--------------------|-----------------------------------|-------------------|
| CYP1A1             | Citocromo P450 1A1                | XM_588298         |
| CYP1A2             | Citocromo P450 1A2                | XM_591450         |
| CYP2B6             | Citocromo P450 2B6                | NM_001075173      |
| CYP2C8             | Citocromo P450 2C8                | XM_868633         |
| CYP2C9             | Citocromo P450 2C9                | XM_612374         |
| CYP2C18            | Citocromo P450 2C18               | NM_001076051      |
| CYP2C19            | Citocromo P450 2C19               | XM_600421         |
| CYP2E1             | Citocromo P450 2E1                | NM_174530         |
| CYP3A4             | Citocromo P450 3A4                | NM_174531         |
| UGT1A1             | UDP glucuronosil-transferasi 1A1  | DQ115935          |
| UGT1A6             | UDP glucuronosil-transferasi 1A6  | NM_174762         |
| UGT2B17            | UDP glucuronosil-transferasi 2B17 | NM_001075724      |
| GSTA1              | Glutatione-S-transferasi A1       | NM_001078149      |
| GSTM1              | Glutatione-S-transferasi M1       | NM_175825         |
| GSTP1              | Glutatione-S-transferasi P1       | NM_177516         |

Tabella 4.1.1: Lista dei geni bovini selezionati per il saggio di *Real Time* PCR.

### Scelta dei primers

La progettazione dei *primers* è stata eseguita mediante l'utilizzo del programma specifico *Primer Express 2.0* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), che consente di costruire oligonucleotidi con caratteristiche appropriate per un protocollo di *Real Time* PCR (Q RT-PCR) ed ottenere dei profili termici adeguati. Sulla base della sequenza di cDNA, sono state costruite coppie di *primers* di circa 20 nucleotidi (*range* tra 9 e 40 bp), con temperature di appaiamento simili tra loro (comprese tra 58 e 60°C, con optimum di 59°C) e con una struttura primaria tale da evitare appaiamenti intramolecolari (ripiegamenti a forcina e dimeri di *primers*). La percentuale di basi GC (%GC) è stata mantenuta all'interno dell'intervallo tra 20% e 80% e sono stati preferiti *primers* senza sequenze di più G e C consecutive e con più ripetizioni. Infine, tra i parametri di ricerca, la lunghezza dell'amplicone è stata definita tra 50 e 120 bp. Il rispetto di tutti questi requisiti e l'idoneità della coppia di *primers* vengono alla fine riassunti dal *software* con un coefficiente numerico, definito *penalty*, che, per essere accettabile, dovrebbe essere il più basso possibile.

Nel presente studio è stato scelto come fluoroforo il *SYBR Green*, un marcatore colorato che può legarsi a qualsiasi molecola di DNA a doppio filamento, compresi i dimeri di *primers*; per evitare che la quantificazione dell'espressione genica venisse falsata dall'amplificazione del DNA genomico (possibile contaminante dell'estratto) e/o dall'eventuale presenza di dimeri di *primers*, nella scelta degli oligonucleotidi sono stati considerati anche i seguenti aspetti: disegno a cavallo delle giunzioni esone-introne e verifica della complementarietà tra i *primers* (per evitare la sintesi di dimeri) in tutte e 3 le combinazioni possibili (*forward-forward*, *reverse-reverse*, *forward-reverse*) utilizzando l'applicazione *Primer test* del *software Primer Express 2.0*.

Per sfavorire l'amplificazione del DNA genomico da parte della Taq polimerasi, nel tempo fornito per l'appaiamento e la polimerizzazione (60 secondi), sono state prese in considerazione solo le giunzioni corrispondenti ad introni della lunghezza di più di 1 kb ed è stato verificato che le prime 2-3 basi del *primer*, subito dopo la giunzione, non corrispondessero alle prime basi dell'introne. Infine sono stati scelti solo i *primers* in cui la giunzione cadesse in corrispondenza dell'estremità 3' del *primer*, accettando le posizioni tra la metà dell'oligonucleotide e la quartultima base.

I *primers* ottenuti sono stati poi oggetto di verifica, mediante controllo della corrispondenza degli oligonucleotidi stessi, nonché dell'amplicone, con la sequenza scelta utilizzando *Blastn*, disponibile come *link* dal sito del NCBI.

### Real Time PCR

#### **Ciclatore termico**

Lo strumento impiegato è il *Sequence Detection System 7000* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Esso contiene un ciclatore termico adatto per piastre da 96 pozzetti ed è in grado di misurare fluorescenze tra 500 e 660 nm; la sorgente luminosa emette radiazioni elettromagnetiche che vengono poi selezionate da filtri opportuni. La fonte di emissione è una lampada alogena a tungsteno, al contrario di altre tipologie di strumenti che utilizzano un *laser*, la cui capacità di eccitazione alla massima lunghezza d'onda è però superiore, sebbene meno uniforme (Bustin, 2002). La fluorescenza viene eccitata dalla lampada che distribuisce la luce a tutti i 96 campioni e la risultante emissione viene rilevata da uno spettrografo con camera a dispositivo *charge-coupled* (CCD); i dati di emissione di fluorescenza rilevati, per ogni campione, ogni sette secondi, vengono poi inviati ad un computer, elaborati e rappresentati direttamente sottoforma di risultati quantitativi, senza per questo ricorrere a manipolazioni post-PCR.

Per normalizzare la fluorescenza del *reporter* (in questo caso il *SYBR Green*) e correggere le fluttuazioni del segnale di emissione dovute ad errori di pipettamento, è necessario utilizzare, nella miscela di reazione, un fluoroforo di riferimento interno, definito *passive reference*, rappresentato dal *ROX*.

Lo strumento è dotato di un *software* specifico ABI Prism 7000, che consente sia di impostare i parametri di reazione, sia di configurare i campioni nella piastra.

Al termine della reazione, che avviene in due ore, il *software* elabora un grafico che descrive, per ogni reazione, la cinetica di amplificazione, cioè riporta l'intensità della fluorescenza ad ogni ciclo. Inoltre, dopo aver fissato automaticamente o manualmente la soglia (*threshold*) di intensità di emissione, lo strumento fornisce sulla base di questa i valori di Ct per ogni campione amplificato e calcola le curve standard. I dati possono essere esportati in *Microsoft*<sup>®</sup> *Excel* per il calcolo dell'espressione relativa.

## Allestimento della miscela di reazione

### Reattivi

- ❖ Power SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) composta da: enzima *hotstart* AmpliTaq Gold Polymerase, *mix* dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, SYBR Green PCR buffer contenente il fluoroforo SYBR Green I
- ❖ *Primers forward* e *reverse* 7.5 μM
- ❖ Acqua DEPC
- ❖ cDNA

### Procedimento

- Scongelare il cDNA ed i reagenti in ghiaccio (esclusa la Master Mix che va conservata a 4°C)
- Allestire la miscela di reazione (volume finale 25 μL) come segue:

| Reagenti  | Volume (μL) |
|---|-------------|
| SYBR Green PCR Master Mix 2X                        | 12.5        |
| Combinazione <i>primers</i> F e R diluiti in acqua* | 7.5         |
| cDNA  | 5.0         |

\* *Primers* diluiti in acqua a partire da madri 7.5 μM per ottenere le concentrazioni finali dell'ordine del nM, messe a punto per ogni gene (300F-300R o 900F-300R o 300F-900R o 900F-900R).

### Protocollo termico standard

Il protocollo termico prevede le seguenti fasi:

- |  |                     |
|--|---------------------|
| 1) attivazione dell'AmpliTaq Gold Polimerase | 95°C per 10 minuti  |
| 2) denaturazione                             | 95°C per 15 secondi |
| 3) appaiamento e polimerizzazione            | 60°C per 60 secondi |

Le fasi 2 e 3 vengono ripetute per 40 cicli.

Al termine della reazione è stato eseguito il protocollo termico di dissociazione dei prodotti di amplificazione per caratterizzare l'amplicone specifico ed individuare eventuali prodotti aspecifici (per esempio, i dimeri di *primers*); esso prevede un lentissimo e graduale aumento della temperatura (circa 0.02°C/sec ≈ 1°C/min) da 60°C a 95°C. Durante la dissociazione, il *software* registra le variazioni di fluorescenza al variare della temperatura ed i dati così ottenuti vengono utilizzati per la costruzione della curva di *melting*.

### Messa a punto dei saggi

#### Combinazioni dei *primers*

Per tutti i geni in studio sono state messe a punto le concentrazioni dei *primers* F e R che permettessero di ottenere la maggior efficienza di reazione possibile. Per fare questo, sono state preparate delle combinazioni di *primers* (a partire da madri 7.5 μM) per ottenere delle concentrazioni finali nel *mix* di reazione pari a 300 nM o 900 nM. Sono pertanto state testate per ciascun gene le seguenti combinazioni: 300F-300R, 900F-300R, 300F-900R, 900F-900R.

L'amplificazione è stata effettuata in triplicato per ciascuna combinazione utilizzando un *pool* di cDNA (composto da tutte e 3 le razze miscelate in parti uguali) diluito 1:20. È stata scelta la combinazione di *primers* ottimale sulla base dell'analisi delle curve di amplificazione, in rispetto delle seguenti caratteristiche: *plateau* della curva di amplificazione più elevato e Ct inferiore.

### **Costruzione delle curve standard**

Le curve standard sono state costruite per tutti i geni in studio, utilizzando diluizioni seriali, a concentrazione nota, dello stesso *pool* di cDNA utilizzato per la messa a punto della combinazione dei *primers*. Esse sono importanti per valutare l'efficienza dell'amplificazione e servono a correlare linearmente il Ct e la quantità iniziale di cDNA o RNA totale presente nel campione in analisi (Wong e Medrano, 2005).

Le diluizioni seriali sono state allestite secondo un fattore 10, partendo però, per alcuni geni, da uno standard iniziale differente (diluizione 1:3 o 1:5).

Ogni diluizione, per un totale di 5, è stata amplificata in triplicato, per avere una maggiore riproducibilità; inoltre per ogni gene, sono stati allestiti due controlli negativi:

- NTC (*no template control*) non contenente cDNA, al fine di evidenziare eventuali contaminazioni nella *mix*;
- RT- (*no reverse transcription*) in cui non è avvenuta la trascrizione inversa a causa dell'assenza dell'enzima, al fine di evidenziare eventuali amplificazioni del DNA genomico contaminante.

La curva standard è stata costruita riportando in ordinata i valori di Ct (o meglio, la media dei Ct per ciascun triplicato) ed in ascissa il logaritmo in base 10 delle diluizioni: è stato così possibile determinare l'efficienza della reazione considerando la pendenza della retta (*slope*).

Sulla base dei dati ottenuti dalle curve standard, sono state costruite anche le curve di validazione, riportando in ascissa il logaritmo delle diluizioni del campione ed in ordinata la differenza dei valori di Ct di ciascun gene *target* con i rispettivi del gene selezionato come *reference* ( $\Delta Ct$ ). La linea che interpola i punti dovrebbe essere parallela all'asse delle X ed avere una pendenza inferiore a 0.1.

### **Verifica degli ampliconi mediante analisi delle curve di *melting* e PCR *end-point***

Per testare ulteriormente la funzionalità dei *primers* e quindi verificare che la lunghezza dell'amplicone ottenuto corrisponda a quella attesa e che non sia avvenuta l'amplificazione di prodotti aspecifici, sono state eseguite una reazione di PCR *end-point* seguita da elettroforesi su gel di agarosio e l'analisi delle curve di *melting* per ciascun gene considerato.

La reazione di PCR *end-point* è stata allestita utilizzando l'enzima GoTaq® Flexi DNA Polimerasi (Promega Italia, Milano, Italia) e come tampone il 5X Green GoTaq® Flexi Buffer, contenente già due diversi coloranti (blu e giallo) che si separano durante l'elettroforesi: questo *buffer* permette di evitare l'aggiunta del tampone colorante (necessario per monitorare il fronte di migrazione) al momento di caricare i campioni per l'elettroforesi.

La reazione di PCR è stata allestita come segue:

| Reattivi                     | Volume ( $\mu\text{L}$ ) |
|------------------------------|--------------------------|
| 5X Green GoTaq® Flexi Buffer | 8.0                      |
| MgCl <sub>2</sub> 25 mM      | 2.4                      |
| dNTPs 10 mM                  | 0.8                      |
| Primer F 7.5 $\mu\text{M}$   | 2.2                      |
| Primer R 7.5 $\mu\text{M}$   | 2.2                      |
| GoTaq® Flexi DNA Polimerasi  | 0.3                      |
| Acqua                        | 22.1                     |
| Pool cDNA                    | 2.0                      |
| Volume finale                | 40.0                     |

I campioni sono stati incubati nel termociclatore Tpersonal (Biometra, Milano) e sottoposti al seguente protocollo termico:

- |                               |                     |
|-------------------------------|---------------------|
| a) Attivazione dell'enzima    | 95°C per 3 minuti   |
| b) Denaturazione              | 95°C per 30 secondi |
| c) Appaiamento                | 58°C per 45 secondi |
| d) Polimerizzazione           | 72°C per 30 secondi |
| e) Estensione finale          | 72°C per 5 minuti   |
| f) Disattivazione dell'enzima | 4°C per 5 minuti    |
| g) Conservazione              | 18°C                |

Il ciclo comprendente i passaggi b, c, d è stato ripetuto 35 volte.

#### **Scelta del gene *reference***

La comparazione di campioni diversi richiede una normalizzazione, per compensare le differenze quantitative del materiale biologico presente nei campioni. La stabilità dell'espressione di un gene standard è un prerequisito fondamentale per la normalizzazione dei dati di espressione di un gene *target*. Nella quantificazione relativa, la standardizzazione mediante un gene diverso da quello in analisi, la cui espressione si ritiene sia costante, è il metodo più utilizzato.

E' stato dimostrato tuttavia che l'espressione dei geni, considerati di riferimento, può variare per esempio in risposta a manipolazioni sperimentali o in condizioni fisiologiche individuali diverse o in seguito alla somministrazione di sostanze che ne modulano la trascrizione (per esempio, desametazone, ormone della crescita, vitamina D, ecc). Per questo motivo non esiste una strategia di normalizzazione utilizzabile in tutti gli esperimenti, bensì ogni ricercatore deve identificare e validare il metodo più adatto alle proprie condizioni sperimentali.

Nella presente tesi, sono stati scelti tre geni *housekeeping*, candidati a essere utilizzati come geni di riferimento nel saggio di Q RT-PCR (tabella 4.1.2); sono stati testati i loro livelli di espressione, che dovrebbero rimanere pressoché costanti nei gruppi soggetti ad analisi e non risentire del trattamento (questo

secondo aspetto è stato testato negli esperimenti descritti successivamente, in cui gli animali sono stati sottoposti a trattamenti farmacologici).

| <b>Gene reference</b> | <b>Nome</b>                     | <b>ID GenBank</b> |
|-----------------------|---------------------------------|-------------------|
| ACTB                  | $\beta$ -actina                 | NM_173979         |
| B2M                   | $\beta$ 2-microglobulina        | NM_173893         |
| TBP                   | <i>TATA box binding protein</i> | NM_001075742      |

Tabella 4.1.2 : Geni *housekeeping* candidati ad essere selezionati come *reference* per il saggio di Q RT-PCR.

Per valutare la variabilità dei tre geni nei campioni utilizzati, è stato eseguito un esperimento in cui il cDNA di tutti gli animali è stato amplificato con *primers* specifici disegnati, per ciascuno dei tre geni *reference*, in rispetto delle caratteristiche sopra riportate.

Sono stati calcolati, per ogni gene: i valori di  $\Delta$ Ct corrispondenti alla differenza del Ct medio del gruppo di riferimento o di controllo (in questo caso CH) e degli altri gruppi oggetto di analisi o sottoposti a trattamento (in questa sperimentazione, nello specifico, PM e BA); il *range* di  $\Delta$ Ct, dato, per ogni singola tesi sperimentale, dalla sommatoria in valore assoluto dei  $\Delta$ Ct prima calcolati (nell'ambito dello stesso esperimento); il *range* di Ct corrispondente, per ciascun gene, alla differenza tra il Ct massimo e minimo evidenziati tra tutti i soggetti appartenenti allo stesso esperimento.

E' stata inoltre effettuata l'analisi statistica (ANOVA + post test di Tukey) utilizzando il programma GraphPad Prism 4 (San Diego, CA, USA), per evidenziare eventuali differenze statisticamente significative tra i gruppi in studio.

#### **Analisi dei campioni e quantificazione relativa**

L'analisi dei profili di espressione dei geni *target* nei campioni di fegato è stata condotta amplificando il cDNA di tutti i campioni, per ciascun gene *target* ed il relativo gene di riferimento.

Il cDNA dei campioni analizzati, ottenuto mediante retrotrascrizione di 2  $\mu$ g di RNA, è stato diluito con acqua secondo il rapporto 1:20; in ogni pozzetto sono stati quindi caricati 25 ng di cDNA.

Le impostazioni di *default* del *software* ABI Prism 7000 SDS 1.1 ed in particolare del programma, che permette lo studio dei dati ricavati dall'analisi in Q RT-PCR, sono state modificate gene per gene; i dati sono stati analizzati fissando valori di *threshold* e *baseline* idonei ad ottenere dei buoni tracciati di amplificazione.

I valori di quantificazione relativa sono stati quindi calcolati mediante il metodo matematico del  $\Delta\Delta$ Ct secondo la formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  di Livak e Schmittgen (2001), esprimendo alla fine i risultati come *fold change*, cioè come normalizzati sulla media del gruppo scelto come controllo, alla quale è stato dato un valore pari a 1.

**Allestimento delle frazioni subcellulari epatiche microsomiali e citosoliche**(Nebbia *et al.*, 1993)**Reattivi**

- ❖ KCl 1.15% in acqua
- ❖ Tampone fosfato 0.1 M, pH 7.4
- ❖ Tampone di omogeneizzazione (1L) in tampone fosfato (TP):
  - Tris-acetato 0.1 M
  - KCl 0.1 M
  - EDTA 1 mM
  - Idrossitoluene-butolato 18  $\mu$ M
- ❖ Tampone di lavaggio (500 mL) in acqua:
  - Sodio pirofosfato ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) 0.1 M
- ❖ Tampone di stoccaggio (250 mL) in TP:
  - EDTA 0.1 mM
  - Glicerolo 20% (v/v)

**Procedimento****N.B.** Tutti i passaggi vengono effettuati in ghiaccio

- Prelevare da ogni animale un'aliquota di fegato di 15-20 g, perfondere con siringa con la soluzione di KCl 1.15% ed asciugare con carta assorbente. Riporre e conservare in ghiaccio.
- Sminuzzare finemente con forbici, mettere nella camicia del *potter* ed aggiungere tampone di omogeneizzazione, in modo da avere un omogenato al 25% o al 33%.
- Omogenare con *potter*, 4-5 *strokes* completi.
- Filtrare rapidamente su garza e raccogliere l'omogenato nei tubi.
- Bilanciare i tubi e centrifugare a 10.000xg per 20 min a 4°C, in modo da ottenere la frazione post-mitocondriale.
- Recuperare tutto il surnatante e riportare al volume originario con lo stesso tampone di omogeneizzazione. Mescolare per inversione.
- Bilanciare i tubi e centrifugare a 105.000xg per 60 min a 4°C, al fine di ottenere la frazione microsomiale.
- Trasferire il surnatante (CITOSOL) in eppendorf, scartando il "*fluffy-layer*", congelarle in azoto liquido e conservarle a -80°C.
- Lavare i microsomi aggiungendo il tampone di lavaggio; risospendere bene il fondello con bacchetta di vetro, sonicare e riportare ogni tubo al volume originario.
- Bilanciare i tubi e centrifugare a 105.000xg per 45 min a 4°C.
- Eliminare il surnatante, aggiungere il tampone di stoccaggio, risospendere il fondello con bacchetta di vetro e sonicare.
- Ripartire la sospensione microsomiale in eppendorf, congelare in azoto liquido e riporre a -80°C.

**Dosaggio delle proteine citosoliche e microsomiali**(Lowry *et al.*, 1951)

*Principio: la concentrazione proteica viene valutata mediante la formazione di un complesso di colore blu, che si ottiene in seguito alla reazione tra una soluzione alcalina di sali di rame e fenolo (reattivo di Folin-Ciocalteu) ed i residui di tiroxina e triptofano presenti. L'intensità della colorazione è proporzionale alla concentrazione proteica.*

**Reattivi**

- ❖ NaOH 0.5 N
- ❖ Albumina di siero bovino
- ❖ Reattivo di Folin-Ciocalteu diluito 1:2 (v/v) in acqua
- ❖ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% in acqua (p/v)
- ❖ CuSO<sub>4</sub> 1% in acqua (p/v)
- ❖ Sodio-potassio tartrato 2% in acqua (p/v)

**Procedimento**

- Preparazione del reattivo di Lowry: a 98 volumi di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, aggiungere un volume di CuSO<sub>4</sub> ed un volume di sodio-potassio tartrato.
- Preparazione del campione proteico: diluire la sospensione microsomiale o citosolica con NaOH 0.5 N nel rapporto 1:20 (v/v).
- Preparazione dello standard: preparare una soluzione madre di albumina bovina pari a 500 µg/mL in NaOH 0.5 N.
- Allestire concentrazioni di standard proteico da 0 a 150 µg/mL in NaOH 0.5 N, in un volume finale di 500 µL, al fine di ottenere una curva standard.
- Aggiungere 475 µL di NaOH 0.5 N a 25 µL della sospensione microsomiale o citosolica diluita.
- Aggiungere nei campioni e negli standard 2500 µL del reattivo di Lowry, vortexare ed attendere 15 min.
- Aggiungere 250 µL del reattivo di Folin, vortexare ed attendere 30 min.
- Leggere le unità di assorbanza a 720 nm.

**Dosaggio del contenuto di citocromo P450 in microsomi epatici**(Rutten *et al.*, 1987)

*Principio: il contenuto di P450 viene misurato come spettro differenziale originato rispettivamente dalla forma ridotta e dalla forma ridotta e complessata con monossido di carbonio.*

**Reattivi** (concentrazioni finali)

- ❖ Tampone fosfato 0.1 M, pH 7.4 – glicerolo 20% (v/v) a temperatura ambiente
- ❖ Sodio ditionito 4.58 mM in acqua
- ❖ Bombola di CO
- ❖ Microsomi

**Procedimento**

- Scongela i microsomi a 37°C, prelevare 150 µL, portarli a 3 mL con il tampone fosfato-glicerolo in conica di plastica con tappo; vortexare, aggiungere 10 µL di soluzione di sodio-ditionito e vortexare.
- Ripartire in due aliquote da 1.5 mL in cuvette semi-micro di plastica *UV-grade*, tappare ed eseguire la linea di base (500-400 nm) con lo spettrofotometro.
- Memorizzare la linea di base.
- Trasferire il contenuto della cuvetta campione nella provetta e gasare con CO per 30 secondi.
- Riempire nuovamente la cuvetta campione, tappare ed attendere 3 min.
- Ripetere la scansione (500-400 nm) e memorizzarla.
- Dopo aver sottratto elettronicamente la linea di base, calcolare il contenuto di P450.

**Determinazione del glutatione ridotto**

(Elmann, 1959)

*Principio: il glutatione ridotto (GSH) reagisce in ambiente alcalino con i bis-disolfiti, producendo una mole di p-nitrofenolo per ogni mole di tiolo; l'anione prodotto, indice della concentrazione di GSH, presenta una caratteristica assorbanza a 412 nm.*

**Reattivi** (concentrazioni finali)

- ❖ TP 0.1 M, pH 8 – EDTA 5 mM in acqua
- ❖ Acido tricloroacetico (TCA) 5% (v/v) - EDTA 5 mM in acqua
- ❖ 5,5' – ditiobis[acido 2-nitrobenzoico] o reattivo di Ellman, 0.1 mM in metanolo (MeOH)
- ❖ Citosol non diluito
- ❖ Standard GSH: 0.1 mg/mL in TP 0.1 M, pH 8 – EDTA 5 mM

**Procedimento**

- Preparare i campioni ed i bianchi con TP – EDTA, TCA – EDTA.
- Centrifugare a 2000 rpm per 25 min a 4°C.
- Preparare in un nuovo tubo i campioni con il surnatante, TP – EDTA e reattivo di Ellman.
- Attendere 5 min a temperatura ambiente e leggere le unità di assorbanza a 412 nm contro il bianco assoluto.

**Determinazione della NAD(P)H citocromo c riduttasi**

(Thomford e Dziuk, 1986; modificato)

*Principio: la NADPH-citocromo P450 riduttasi e la NADH-citocromo P450 riduttasi sono delle flavoproteine microsomiali, la cui attività si determina valutando l'entità della riduzione del citocromo c, che funge da accettore artificiale di elettroni. Il citocromo c ridotto presenta un caratteristico picco di assorbimento a 550 nm.*

**Reattivi** (concentrazioni finali)

- ❖ Tampone fosfato 0.1 M, pH 7.6
- ❖ NaCN 1.224 mM in acqua
- ❖ NADPH 0.2 mM in TP
- ❖ NADH 0.17 mM in TP
- ❖ Citocromo c: 0.775 mg/mL di TP
- ❖ Microsomi : 0.01 – 0.02 mg di proteina in 25  $\mu$ L (diluire in TP).

**Procedimento**

- Preparare i campioni ed i bianchi.
- Mettere le cuvette nello spettrofotometro a 37°C ed attendere 3 min.
- Aggiungere nella cuvetta campione 100  $\mu$ L di NADPH o NADH.
- Monitorare l'aumento dell'assorbanza a 550 nm per 3 min.

**Attività catalitica CYP-dipendente****Determinazione delle attività di N-demetilazione attraverso la misurazione della formaldeide liberata**

(Werringloer, 1978)

*Principio: durante le reazioni di N-demetilazione CYP-dipendenti, il gruppo metilico liberato viene ossidato a formaldeide; quest'ultima si combina con i costituenti del reattivo di Nash per dare origine ad un composto di colore giallo (3,5 diacetil-1,4 diidrolutidina), che presenta un picco di assorbimento caratteristico a 412 nm, con lettura spettrofotometrica. Ricorrendo alla lettura fluorimetrica, la  $\lambda$  di eccitazione è 410 nm, quella di emissione è 510 nm.*

**Reattivi**

- ❖ Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4
- ❖ Sistema rigenerante NADPH (concentrazioni finali in Tris-HCl):
  - NADP 0.32 mM
  - Glucosio-6-fosfato 6.4 mM
  - Glucosio-6-fosfato deidrogenasi
  - MgCl<sub>2</sub> 5 mM
  - EDTA 0.8 mM
- ❖ Reattivo di Nash (in acqua):
  - Ammonio acetato 15% (p/v)
  - Acido acetico glaciale 0.3% (v/v)
  - Acetil-acetone 0.2% (v/v)
- ❖ Substrati (concentrazioni finali):
  - Aminopirina 5 mM in acqua; incubazione 20 min.
  - Benzfetamina cloridrato 1 mM in acqua; incubazione 15 min.
  - Eritromicina 1 mM in etanolo; incubazione 15 min.
  - Etilmorfina cloridrato 6 mM in acqua; incubazione 15 min.
  - Triacetiloleandomicina (TAO) 0.3 mM in etanolo; incubazione 15 min.
- ❖ TCA 10% in acqua
- ❖ Microsomi : 1 mg di proteina

**Procedimento**

- Preparare i campioni ed i bianchi.
- Preincubare i campioni a 37°C per 1 min. Non incubare i bianchi.
- Incubare a 37°C con agitazione per 20 min.
- Interrompere la reazione nei campioni con TCA 10% ed aggiungere i substrati nei bianchi.
- Attendere 10 min e centrifugare bianchi e campioni a 1.850xg per 10 min a 4°C.
- Prelevare 1 mL di surnatante ed aggiungere 1 mL del reattivo di Nash.
- Incubare per 10 min a 60°C.
- Attendere 10 min a temperatura ambiente e misurare le unità di assorbanza a 412 nm.

### Determinazione della benzo[a]pirene idrossilasi

(Nebert e Gelboin, 1968)

*Principio: l'idrossilazione del benzo[a]pirene determina la formazione di derivati fenolici, tra cui il 3- ed il 9-idrossi-benzo[a]pirene, che in presenza di soluzioni alcaline (NaOH) mostrano una caratteristica fluorescenza, misurabile spettrofluorimetricamente. Trattandosi di metaboliti altamente instabili e di difficile reperibilità in commercio, la fluorescenza ottenuta viene rapportata a quella del solfato di chinina, che presenta caratteristiche di fluorescenza simili a quelle dei metaboliti idrossilati.*

#### Reattivi

- ❖ TP 0.05 M, pH 7.25
- ❖ Esano-acetone 3.25 : 1 (v/v)
- ❖ NaOH 1 N in acqua
- ❖ NADH 0.39 mM in TP
- ❖ NADPH 0.36 mM in TP
- ❖ Benzo[a]pirene 0.08 mM in dimetilsolfossido (DMSO)
- ❖ Microsomi: 0.4 – 1 mg di proteina (diluire con TP)
- ❖ Acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.1 N (v/v) in acqua
- ❖ Chinina solfato 2 mg/mL di acido solforico → soluzione madre da diluire per curva standard per avere concentrazioni di chinina da 0.25 a 20 µg/mL

#### Procedimento

- Preparare i campioni ed i bianchi.
- Denaturare i bianchi in acqua bollente.
- Incubare i campioni a 37°C con agitazione per 10 min.
- Bloccare la reazione con esano – acetone.
- Aggiungere benzo[a]pirene, NADH+NADPH ed esano – acetone nei bianchi.
- Incubare a 37°C per 7 min con agitazione e agitare per altri 3 min.
- Centrifugare a 2.500xg per 15 min a 4°C.
- Prelevare 1 mL della fase organica ed aggiungere 3 mL di NaOH 1 N.
- Estrarre vigorosamente su agitatore di provette per 3 min.
- Prelevare 1 mL della fase acquosa.
- Leggere le unità di fluorescenza ( $\lambda$  eccitazione : 396 nm,  $\lambda$  emissione : 522 nm).

**Determinazione dell'anilina idrossilasi**

(Mazel, 1971)

*Principio: l'idrossilazione P450-dipendente dell'anilina porta alla formazione del 4-aminofenolo, che in presenza di fenolo, forma un complesso di colore blu (fenolo-indofenolo) con picco di assorbimento caratteristico a 630 nm.*

**Reattivi**

- ❖ Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4
- ❖ Sistema rigenerante NADPH (concentrazioni finali in Tris-HCl):
  - NADP 0.32 mM
  - Glucosio-6-fosfato 6.4 mM
  - Glucosio-6-fosfato deidrogenasi
  - MgCl<sub>2</sub> 5 mM
  - EDTA 0.8 mM
- ❖ Anilina idrocloruro 5 mM in Tris-HCl
- ❖ Sodio carbonato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 10% in acqua
- ❖ NaOH 0.2 N in acqua
- ❖ Fenolo 2% in NaOH 0.2 N → soluzione rivelatrice
- ❖ TCA 10% in acqua
- ❖ Microsomi: 1 mg di proteina (diluire con TP)
- ❖ 4-aminofenolo 0.375 mM in acqua → soluzione madre per curva degli standard

**Procedimento**

- Preparare i campioni ed i bianchi.
- Preincubare i campioni a 37°C per 1 min.
- Incubare a 37°C con agitazione per 20 min.
- Interrompere la reazione nei campioni con TCA 10% ed aggiungere i substrati nei bianchi.
- Attendere 10 min e centrifugare bianchi e campioni a 1.850xg per 10 min a 4°C.
- Prelevare 1 mL di surnatante ed aggiungere 0.5 mL di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10% e 1 mL di soluzione rivelatrice.
- Incubare per 30 min a 37°C.
- Misurare le unità di assorbanza a 630 nm.

**Determinazione della *p*-nitrofenolo idrossilasi**

(Reinke e Moyer, 1985, modificato)

*Principio: l'idrossilazione P450-dipendente del p-nitrofenolo determina la formazione di un composto di colore giallo, il 4-nitrocatecolo, che presenta un picco di assorbimento massimo a 546 nm.*

**Reattivi**

- ❖ Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4
- ❖ Sistema rigenerante NADPH (concentrazioni finali in Tris-HCl):
  - NADP 0.32 mM
  - Glucosio-6-fosfato 6.4 mM
  - Glucosio-6-fosfato deidrogenasi
  - MgCl<sub>2</sub> 5 mM
  - EDTA 0.8 mM
- ❖ *p*-nitrofenolo 0.2 mM in Tris-HCl
- ❖ TCA 10% in acqua
- ❖ NaOH 10 N in acqua
- ❖ Microsomi: 1.5 mg di proteina (diluire con TP)

**Procedimento**

- Preparare i campioni ed i bianchi.
- Preincubare i campioni a 37°C per 1 min.
- Incubare a 37°C con agitazione per 15 min.
- Interrompere la reazione nei campioni con TCA 10% ed aggiungere i substrati nei bianchi.
- Attendere 10 min e centrifugare bianchi e campioni a 1.850xg per 7 min a 4°C.
- Prelevare 1 mL di surnatante ed aggiungere 100 µL di NaOH 10 N.
- Attendere 6-7 min a temperatura ambiente, quindi misurare le unità di assorbanza a 546 nm.

## Identificazione del testosterone e dei metaboliti idrossilati mediante HPLC

(Capolongo *et al.*, 2003)

*High performance liquid chromatography (HPLC)*

*E' rappresentata da una tecnica in cromatografia liquida che consente l'identificazione, tramite separazione, degli analiti presenti in una soluzione. La separazione degli analiti si verifica in base alla loro affinità per le due fasi non miscibili utilizzate, ossia una fase mobile liquida costituita da diversi solventi, che fluisce in una fase stazionaria solida costituita da un supporto inerte in una colonna metallica. Ciò determina un'eluizione degli analiti a tempi diversi, segnalata da un rivelatore UV/VIS o fluorimetrico, e la loro separazione ed identificazione.*

**Reattivi** (usati per la determinazione del testosterone e dei metaboliti idrossilati mediante HPLC e per l'allestimento delle rette analitiche)

- ❖ Diclorometano, J.T. Baker Mallinckrodt, Olanda
- ❖ Acetonitrile (ACN), J.T. Baker Mallinckrodt, Olanda
- ❖ MeOH, HPLC grade, J.T. Baker Mallinckrodt, Olanda
- ❖ Acqua milliQ
- ❖ Cortexolone (4-Pregnen-17,21-diol-3,20-dione), 100 µM, Sigma, Italia
- ❖ Testosterone (TST: 4-Androsten-17β-ol-3-one) 10 mM e 1 mM, Steraloid, USA
- ❖ Androstenedione (AND: 4-Androsten-3,17-dione) 1 mM, Steraloid, USA
- ❖ 2β-TST (4-Androsten-2β, 17β-diol-3-one) 1 mM, Steraloid, USA
- ❖ 6α-TST (4-Androsten-6α, 17β-diol-3-one) 1 mM, Steraloid, USA
- ❖ 6β-TST (4-Androsten-6β, 17β-diol-3-one) 1 mM, Steraloid, USA
- ❖ 7α-TST (4-Androsten-7α, 17β-diol-3-one) 1 mM, Steraloid, USA
- ❖ 11α-TST (4-Androsten-11α, 17β-diol-3-one) 1 mM, Steraloid, USA
- ❖ 11β-TST (4-Androsten-11β, 17β-diol-3-one) 1 mM, Steraloid, USA
- ❖ 16α-TST (4-Androsten-16α, 17β-diol-3-one) 1 mM, Steraloid, USA
- ❖ 16β-TST (4-Androsten-16β, 17β-diol-3-one) 1 mM, Steraloid, USA
- ❖ 16-chetotestosterone (4-Androsten-17β-ol-3,16-dione) 2 mM, Sigma, Italia

TST ed i suoi metaboliti sono preparati in MeOH.

Per l'allestimento della retta di taratura (usata per la verifica della linearità della risposta del *detector*) è stata preparata una soluzione *mix* 50 µM contenente tutti gli standard di riferimento; tale soluzione è stata quindi diluita con acqua per ottenere soluzioni a concentrazioni scalari (0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10 e 25 µM).

**Condizioni HPLC****Condizioni strumentali**

Fase A: acqua

Fase B: ACN

Fase C: MeOH

Fase mobile: A:B:C, 80:10:10, v:v:v

Gradiente:

|     |       |          |
|-----|-------|----------|
| 0'  | A:B:C | 80:10:10 |
| 10' | A:B:C | 80:10:10 |
| 30' | A:B:C | 70:20:10 |
| 35' | A:B:C | 70:20:10 |
| 45' | A:B:C | 50:40:10 |
| 50' | A:B:C | 50:40:10 |
| 51' | A:B:C | 10:70:20 |
| 52' | A:B:C | 10:70:20 |
| 53' | A:B:C | 80:10:10 |

**Strumentazione**

Gastorr GT-103

Jasco LG-980 Ternary Gradient Unit

Jasco PU-980 Intelligent HPLC Pump

Jasco AS-950 Intelligent Sampler

Jasco UV-975 Detector

Colonna: XTerra MS C18 5  $\mu$ m 30x150 mm Waters (USA)**Parametri analitici**

Flusso: 0.5 mL/min

Volume di iniezione: 10  $\mu$ L

Tempo di analisi: 60 min

Lunghezza d'onda: 247 nm

**Procedimento**

Per la valutazione della resa di estrazione la matrice (microsomi epatici, 0.2 mg proteina/mL; n = 3 repliche per ciascuna concentrazione) è stata addizionata con soluzione *mix* di TST, 2 $\beta$ -TST, 6 $\alpha$ -TST, 6 $\beta$ -TST, 7 $\alpha$ -TST, 11 $\alpha$ -TST, 11 $\beta$ -TST, 16 $\alpha$ -TST, 16 $\beta$ -TST, AND, 16 chetotestosterone diluita con acqua in modo da ottenere sospensioni microsomiali contenenti standard a concentrazioni comprese tra 0.1 e 25  $\mu$ M. La sospensione microsomiale è stata quindi diluita 1:4 con diclorometano, portata a secco e ripresa con 100  $\mu$ L di soluzione MeOH:acqua 1:5 (v/v).

Le equazioni delle rette analitiche così ottenute sono state utilizzate assieme a quelle di taratura (rette degli standard) per il calcolo della resa percentuale di estrazione.

**Determinazione dell'etossiresorufina-O-deetilasi (EROD) mediante HPLC**(Pegolo *et al.*, 2007)

*Principio: la deetilazione dell'etossiresorufina viene determinata misurando in fluorimetria la quantità di resorufina formata. L'attività dell'enzima deetilante, CYP-dipendente, si desume rapportando la fluorescenza relativa ottenuta, con quella di quantità note di resorufina.*

**Reattivi**

- ❖ MeOH, HPLC grade, J.T. Baker, Mallinckrodt, Olanda
- ❖ Acqua milliQ
- ❖ Etossiresorufina (ETR: Sigma, Italia) 0.8 mM in MeOH → soluzione madre substrato
- ❖ Resorufina (Sigma, Italia) 4 mM in MeOH → soluzione madre metabolita
- ❖ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O (Sigma, Italia) 25 mM
- ❖ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O (Sigma, Italia) 25 mM
- ❖ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O 50 mM
- ❖ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O 50 mM
- ❖ Magnesio Cloruro (MgCl<sub>2</sub>) 0.1 M, RPE, Merck
- ❖ β – NADPH sale sodico (Sigma, Italia) 10 mg/mL
- ❖ TP 25 mM, pH 7.0
- ❖ TP 50 mM, pH 7.4 per incubazione microsomi
- ❖ Soluzioni di lavoro per i recuperi: diluire la soluzione madre di resorufina 4 mM con fase diluente costituita da TP 50 mM pH 7.4 : metanolo (50:50, v/v) per ottenere soluzioni a concentrazioni scalari (160, 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 μM)
- ❖ Soluzioni per la costruzione delle rette analitiche: diluire la soluzione madre di resorufina 4 mM con fase diluente costituita da TP 50 mM pH 7.4 : metanolo (50:50, v/v) per ottenere soluzioni a concentrazioni scalari (4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0313, 0.0156, 0.0078 μM)
- ❖ Sospensione microsomiale 2 mg/mL in TP 50 mM pH 7.4

**Condizioni HPLC****Condizioni strumentali**

Fase mobile:

Fase A: TP 25 mM, pH 7,0

Fase B: MeOH

Fase mobile A:B 58:42, v/v

Separazione in isocratica

**Strumentazione**

Pompa Jasco PU – 980

Degasatore Jasco DG – 1580 -53

Autocampionatore, Jasco AS – 1555

Fluorimetro, Jasco FP - 920

Colonna: LUNA C18, 100 Å, 150 mm X 4,6 mm, 5µ

### Parametri analitici

Flusso: 0.8 ml/min

Volume d'iniezione: 10 µl

Tempo di analisi: 9.20 min

Lunghezza d'onda:

resorufina: EX: 530 nm

EM: 580 nm

### Procedimento

- Preparare la soluzione di ETR 20 µM diluendo 1:40 la soluzione madre di ETR 0.8 mM.
- Incubare i microsomi nelle seguenti condizioni:
  - Concentrazione proteica finale = 0,2 mg/ml
  - Concentrazione MgCl<sub>2</sub> = 0,1 M freddo
  - Concentrazione NADPH = 10 mM
  - Concentrazione ETR = 0,5 µM
  - Volume totale = 400 µl.
- Scongelare in ghiaccio i reagenti da utilizzare e preparare i bianchi (campioni senza NADPH), i bianchi assoluti (campioni senza substrato) ed i campioni, secondo il seguente schema:

| Reagenti                | Bianchi (µL) | Bianchi assoluti (µL) | Campioni (µL) |
|-------------------------|--------------|-----------------------|---------------|
| TP 50 mM pH 7.4         | 340          | 310                   | 300           |
| MgCl <sub>2</sub> 0,1 M | 10           | 10                    | 10            |
| Microsomi (2 mg/ml)     | 40           | 40                    | 40            |
| ETR 20 µM               | 10           | -                     | 10            |

- Preincubare per 1 min a 37 °C in un bagnetto termostato.
- Aggiungere 40 µl di NADPH 10 mg/ml tranne che nei bianchi.
- Incubare per 3 min a 37 °C in agitazione e mettere in ghiaccio.
- Aggiungere 400 µl di MeOH freddo (tenuto a +4°C) e mescolare con vortex per 30 secondi.
- Tenere in ghiaccio per 15 min.
- Centrifugare a 6000xg per 20 min a +4°C.
- Prelevare 200 µL del surnatante con pipetta *pasteur*, inserirli in *vials* e iniettare in HPLC.

Le equazioni delle rette analitiche sono state utilizzate assieme a quelle di taratura (rette degli standard) per il calcolo della resa percentuale di estrazione.

### Calcolo dell'attività di EROD:

nmoli/mg proteina, min = [Concentrazione µM/(3\*0.2)]

**Determinazione della tolbutamide 4-idrossilasi (TBT4-OH) mediante HPLC**(Pegolo *et al.*, 2007)

*Principio: l'idrossilazione della tolbutamide viene determinata misurando la quantità di metil-idrossitolbutamide formate. L'attività dell'enzima idrossilante, CYP-dipendente, si desume rapportando l'assorbanza relativa ottenuta, con quella di quantità note di 4-idrossitolbutamide.*

**Reattivi**

- ❖ MeOH, HPLC grade, J.T. Baker, Mallinckrodt, Olanda
- ❖ ACN, J.T. Baker, Mallinckrodt, Olanda
- ❖ Acqua milliQ
- ❖ Acido acetico glaciale, J.T. Baker, Mallinckrodt, Olanda
- ❖ Acido cloridrico 2 M, J.T. Baker, Mallinckrodt, Olanda
- ❖ Clorpropamide (Sigma, Milano, Italia) 1mM → soluzione madre standard interno
- ❖ Tolbutamide (Sigma, Milano, Italia) 10 mM → soluzione madre substrato
- ❖ 4-idrossitolbutamide (Sigma, Milano, Italia) 1 mM → soluzione madre metabolita
- ❖ Tampone ammonio acetato (Fluka, Milano, Italia) 10 mM pH 4.3
- ❖ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O (Sigma, Milano, Italia) 0,1 M
- ❖ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O (Sigma, Milano, Italia) 0,1 M
- ❖ TP 0.1 M, pH 7.4 per incubazione microsomi
- ❖ TP acidificato: mettere in provetta da 15 ml, 10 ml di TP a pH 7,4 e aggiungere 1 ml di acido cloridrico 2M
- ❖ Magnesio Cloruro (MgCl<sub>2</sub>) 0.1 M, RPE, Merck
- ❖ β-NADPH sale sodico (Sigma, Milano, Italia) 10 mg/mL
- ❖ Soluzione madre *mix* 50 μM di tolbutamide, 4-idrossitolbutamide e clorpropamide da diluire per ottenere soluzioni di lavoro a concentrazioni scalari (5, 3.5, 2, 1.5, 1, 0.5 μM)
- ❖ Soluzioni per la costruzione delle rette analitiche: diluire la soluzione madre di 4-idrossitolbutamide 10 mM con fase diluente costituita da acqua:ACN (50:50, v/v) per ottenere soluzioni a concentrazioni scalari (200, 140, 80, 60, 40, 20, 10 μM)
- ❖ Sospensione microsomiale 12.5 mg/mL in TP 0.1 M pH 7.4

**Condizioni HPLC****Condizioni strumentali**

Fase mobile:

Fase A: tampone ammonio acetato 10 mM, pH 4,3

Fase B: ACN

Fase mobile A:B, 80:20, v/v

**Gradiente**

|     |     |       |
|-----|-----|-------|
| 0'  | A:B | 80:20 |
| 14' | A:B | 80:20 |
| 16' | A:B | 50:50 |
| 23' | A:B | 50:50 |
| 25' | A:B | 80:20 |
| 30' | A:B | 80:20 |

**Strumentazione**

Pompa e degasatore: Jasco PU – 2089 PLUS

Autocampionatore Jasco AS – 2055 PLUS

Rivelatore spettrofotometrico Jasco UV 2070 PLUS

Colonna: LUNA C8, 100 Å, 250 mm X 3 mm, 5u

**Parametri analitici**

Flusso: 0.5 ml/min

Volume d'iniezione: 50 µl

Tempo di analisi: 30 min

Lunghezza d'onda: 230 nm

**Procedimento**

- Preparare la soluzione di tolbutamide 60 mM.
- Incubare i microsomi nelle seguenti condizioni:  
 Concentrazione proteica finale = 1.25 mg/ml  
 Concentrazione MgCl<sub>2</sub> = 0,1 M freddo  
 Concentrazione NADPH = 10 mM  
 Concentrazione tolbutamide = 1.5 mM  
 Volume totale = 400 µl.
- Scongelare in ghiaccio i reagenti da utilizzare e preparare i bianchi (campioni senza NADPH), i bianchi assoluti (campioni senza substrato) ed i campioni, secondo il seguente schema:

| Reagenti                | Bianchi (µL) | Bianchi assoluti (µL) | Campioni (µL) |
|-------------------------|--------------|-----------------------|---------------|
| TP 0.1 M pH 7.4         | 340          | 310                   | 300           |
| MgCl <sub>2</sub> 0,1 M | 10           | 10                    | 10            |
| Microsomi (12.5 mg/ml)  | 40           | 40                    | 40            |
| Tolbutamide 60 mM       | 10           | -                     | 10            |

- Preincubare per 5 min a 37 °C in un bagnetto termostato.
- Aggiungere 40 µl di NADPH 10 mg/ml tranne che nei bianchi.
- Incubare per 30 min a 37°C in agitazione e mettere in ghiaccio.
- Aggiungere 2 mL di ACN freddo (tenuto a +4°C).

- Aggiungere 10  $\mu\text{l}$  di clorpropamide 0.5 mM.
- Mettere nell'agitatore i campioni per 15 min a 640 rpm.
- Prelevare dalle provette 2 ml di solvente estraente (sotto cappa) e trasferirlo in altre provette.
- Portare a secco a 40°C con il sistema di evaporazione a centrifuga (STEPBIO EZ2 PLUS).
- Riprendere i campioni con 400  $\mu\text{l}$  di TP acidificato e vortexare per 3 min.
- Prelevare 90  $\mu\text{l}$  per ogni provetta, trasferirli nelle *vials* ed iniettare in HPLC.

Le equazioni delle rette analitiche sono state utilizzate assieme a quelle di taratura (rette degli standard) per il calcolo della resa percentuale di estrazione.

**Calcolo dell'attività della 4-idrossitolbutamide:**

$\text{nmoli/mg proteina, min} = [\text{Concentrazione } \mu\text{M}/(30*1.25)]$

### Attività catalitica UGT-dipendente

#### Determinazione delle UGT

(Antoine *et al.*, 1988)

*Principio: l'attività delle UGT viene determinata valutando l'entità della liberazione di UDP a seguito del legame tra il substrato e l'acido uridin-difosfo-glucuronico (UDPGA), che avviene durante la reazione di glucuronidazione. L'UDP reagisce quindi con il fosfoenolpiruvato (l'enzima che catalizza tale reazione è la piruvato chinasi), liberando UTP e piruvato; infine la lattato-deidrogenasi trasferisce gli elettroni dal NADH al piruvato, con liberazione di acido lattico e NAD<sup>+</sup>. L'ossidazione del NADH può essere monitorata in continuo, spettrofotometricamente, a 340 nm, ed è indice dell'attività delle UGT.*

#### Reattivi

- ❖ Tampone Tris-HCl 75 mM – MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 7.3 in acqua
- ❖ Fosfoenolpiruvato (PEP) sale di potassio 0.2 mM in Tris
- ❖ NADH 0.2 mM in acqua
- ❖ Piruvato-chinasi (PK) 5 U in Tris
- ❖ Lattato-deidrogenasi (LDH) 2.5 U in Tris
- ❖ UDPGA 1.5 mM in Tris
- ❖ *p*-nitrofenolo 0.3 mM in miscela etanolo : acqua 1:1
- ❖ 1-naftolo 0.3 mM in etanolo
- ❖ Microsomi attivati: 0.15 – 0.2 mg di proteina

#### Procedimento

- Attivare microsomi: miscelare 20 µL di Triton X-100 0.25% in Tris ogni 100 µg di proteine microsomiali. Conservare in ghiaccio ed attendere almeno 45 min per l'attivazione.
- Preparare il mix contenente Tris-HCl, PEP, NADH, PK, LDH, UDPGA e i substrati; miscelare bene.
- Porre le cuvette nello spettrofotometro a 37°C ed attendere 3 min.
- Aggiungere i microsomi, secondo le quantità di proteina indicate, quindi monitorare l'aumento di assorbanza a 340 nm per 3 min.

**Attività catalitica GST-dipendente****Determinazione delle GST con metodo in continuo**(Habig *et al.*, 1974)

*Principio: le glutatione GST catalizzano reazioni di coniugazione tra il GSH e diversi substrati. Tali attività enzimatiche possono essere monitorate spettrofotometricamente, a lunghezze d'onda diverse, a seconda del substrato impiegato.*

**Reattivi**

- ❖ CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzene) 1 mM in DMSO
- ❖ DCNB (3,4-dicloronitrobenzene) 1 mM in DMSO
- ❖ GSH 1 mM per CDNB in TP 0.1 M pH 6.5
- ❖ GSH 5 mM per DCNB in TP 0.1 M pH 7.5
- ❖ TP 0.1 M, pH 6.5 per CDNB
- ❖ TP 0.1 M, pH 7.5 per DCNB
- ❖ Citosol diluito in TP, per una concentrazione proteica pari a:
  - 0.005 – 0.05 mg di proteina per CDNB
  - 0.15 – 2 mg di proteina per DCNB

**Procedimento**

- Preparare i campioni ed i bianchi.
- Miscelare bene, quindi monitorare l'aumento di assorbanza per 3 min alla lunghezza d'onda di 340 nm per CDNB e 345 nm per DCNB.

### Immunolettroforesi

*L'immunolettroforesi si divide in due fasi principali: l'elettroforesi e l'immunoblotting.*

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

*Nella seconda fase, denominata immunoblotting, le membrane di nitrocellulosa vengono sottoposte a due incubazioni consecutive: la prima ha lo scopo di individuare l'antigene di interesse, nel nostro caso una particolare famiglia di CYP, e si realizza tramite l'utilizzo di un anticorpo primario specifico (mono- o policlonale) che si legherà esclusivamente con la banda che contiene l'antigene omologo. La seconda incubazione, invece, serve a rivelare la reazione antigene-anticorpo avvenuta in precedenza e a renderla visibile utilizzando un anti-anticorpo marcato con un enzima che, dopo l'aggiunta del substrato cromogeno, darà luogo alla colorazione della banda di nostro interesse (Poli et al., 2005).*

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

#### **Reattivi**

- ❖ Acrilamide (BioRad, Milano, Italia) 30% - bisacrilamide (AppliChem, Milano, Italia) 0.8% in acqua
- ❖ Tris-HCl (AppliChem, Milano, Italia) 1 M pH 8.8 in acqua
- ❖ Tris-HCl 1 M pH 6.8 in acqua
- ❖ Glicerolo (Invitrogen, Milano, Italia) 80% (v/v) in acqua
- ❖ EDTA (Invitrogen, Milano, Italia) 0.25 M in acqua
- ❖ SDS (AppliChem, Milano, Italia) 20% (p/v) in acqua
- ❖ TEMED, BioRad, Milano, Italia
- ❖  $\beta$ -mercaptoetanolo, BioRad, Milano, Italia
- ❖ Blu di bromofenolo 1% (p/v), Sigma, Milano, Italia
- ❖ Ammonio persolfato (Sigma, Milano, Italia) 10% (p/v) in acqua
- ❖ Gel di separazione (concentrazioni finali in 7.5 mL): acrilamide 10%-bisacrilamide 0.27% (p/v), Tris-HCl 0.25 M pH 8.8, glicerolo 10% (v/v), EDTA 1 mM, SDS 0.2% (p/v), TEMED 0.067% (v/v), ammonio persolfato 0.1% (p/v) in acqua bidistillata
- ❖ Gel di concentrazione (concentrazioni finali in 2.5 mL): acrilamide 4%-bisacrilamide 0.11% (p/v), Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, glicerolo 10% (v/v), EDTA 1 mM, SDS 0.2% (p/v), TEMED 0.12% (v/v), ammonio persolfato 0.06% (p/v) in acqua bidistillata

- ❖ TP 0.1 M, pH 7.4
- ❖ Tampone di stoccaggio per microsomi: glicerolo 20% (v/v) in TP 0.1 M, pH 7.4
- ❖ Tampone di denaturazione (concentrazioni finali in 8 mL): SDS 2% (p/v), Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, glicerolo 10% (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanololo 0.05% (v/v), blu di bromofenolo 0.25% (p/v) in acqua
- ❖ Tampone di migrazione: Tris-HCl 25 mM, glicina (AppliChem, Milano, Italia) 192 mM e SDS 0.1% in acqua
- ❖ Tampone di trasferimento: Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0.01% e MeOH 20% in acqua
- ❖ Colorante Rosso Ponceau: TCA (AppliChem, Milano, Italia) 3% (v/v) e rosso Ponceau (Sigma, Milano, Italia) 0.2% (p/v) in acqua
- ❖ PBS (*Phosphate Buffer Saline*) 1X, pH 7.3: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4.3 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.4 mM in acqua (AppliChem, Milano, Italia)
- ❖ Tampone di saturazione: latte scremato in polvere 3% (p/v) e Tween 20 (AppliChem, Milano, Italia) 0.05% in PBS 1X
- ❖ Tampone di lavaggio 1: PBS 1X
- ❖ Tampone di lavaggio 2: 0.5% TWEEN 20 in PBS 1X
- ❖ Tampone di lavaggio 3: 0.05% TWEEN 20 in PBS 1X
- ❖ Supersignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, Milano, Italia

## Procedimento

### Elettroforesi in gel di acrilamide

- Preparare il gel di separazione sotto cappa e pipettarlo nell'interstizio tra i due vetri che formano il Mini-Protean (Mini-PROTEAN<sup>®</sup> 3 Cell Assembly, BioRad, Milano, Italia); livellarlo con etanolo 70% e farlo polimerizzare a temperatura ambiente per almeno 30 min in presenza di luce.
- A polimerizzazione avvenuta, eliminare l'etanolo rimasto per capovolgimento del Mini Protean; pipettare nell'interstizio tra i due vetri il gel di concentrazione, precedentemente preparato, inserire i pettini ed attendere la polimerizzazione a temperatura ambiente per almeno 15 min.
- Posizionare i vetri con il gel (Gel Cassette) nel dispositivo per l'elettroforesi (Electrode Assembly); inserire a sua volta quest'ultimo nella vaschetta di *plexiglass* che verrà riempita con tampone di migrazione nel comparto centrale.
- Rimuovere i pettini e lavare i pozzetti con tampone di migrazione per rimuovere i residui di gel al loro interno.
- Nel frattempo, scongelare i campioni in ghiaccio e diluirli in tubi tipo Eppendorf con tampone di stoccaggio e poi con tampone di denaturazione in rapporto 1:1, in modo tale da avere una concentrazione proteica ottimale (30  $\mu\text{g}$ /pozzetto) in un volume finale di 10  $\mu\text{L}$ .
- Effettuare la stessa procedura di preparazione per la sospensione microsomiale epatica ottenuta da ratti di controllo (R) ed indotti con diversi substrati noti per la loro capacità di aumentare l'espressione degli enzimi biotrasformativi ( $\beta$ -naftoflavone ( $\beta$ -naf) per CYP1A, fenobarbitale (PB) per CYP2B e CYP2C,

isoniazide per CYP2E, desametasone (DEX) per CYP3A) in modo tale da ottenere delle concentrazioni proteiche di 10 e 5 µg/pozzetto, rispettivamente.

- Denaturare i campioni proteici ponendo i tubi in un termoblocco alla temperatura di 95°C per 5 min e poi 5 min in ghiaccio.
- Caricare i campioni (10 µL) nei pozzetti utilizzando puntali a capillare e riempire la vaschetta in *plexiglass* con il tampone di migrazione.
- Far partire la migrazione applicando un campo elettrico ai due estremi del gel a 100 V per 1h.
- Smontare il dispositivo per l'elettroforesi (Gel Assembly), separare i vetri per liberare il gel.
- Eliminare la porzione del gel con i pozzetti e staccare il gel rimanente aiutandosi con una vaschetta contenente del tampone di migrazione.
- Allestire il “*sandwich*” per il trasferimento: immergere tutti i costituenti necessari (spugnette, carta da filtro, gel e membrana di nitrocellulosa) in tampone di trasferimento, sovrapporli secondo un ordine opportuno e pressarli uno sull'altro utilizzando una bacchetta di vetro per eliminare le bolle d'aria eventualmente presenti.
- Chiudere il *sandwich*, posizionarlo nel modulo con gli elettrodi e successivamente nella vaschetta di *plexiglass* contenente l'unità refrigerante e tampone di transfer.
- Condurre la fase di transfer in agitazione ed a voltaggio costante (100 V per 1h).
- Recuperare la membrana di nitrocellulosa (Protran®, Whatman, Maidston, Kent, UK), porla in una vaschetta contenente il colorante rosso Ponceau e lasciare in agitazione per 5 min. La colorazione reversibile ha lo scopo di permettere un controllo qualitativo dell'elettroforesi e del trasferimento.
- Rifilare la membrana di nitrocellulosa, tagliare l'angolo in alto a sinistra e contrassegnarla opportunamente con un numero dal lato in cui è avvenuto il trasferimento.
- Lavare la membrana in acqua distillata.
- Immergere la membrana in tampone di saturazione e lasciarla incubare per tutta la notte al di sopra di un agitatore.

### **Immunoblotting**

- La mattina seguente, rimuovere l'eccesso di tampone di saturazione dalla membrana di nitrocellulosa con alcuni mL di PBS e Tween 20 0.05%.
- Incubare la membrana con l'anticorpo primario, diversamente diluito a seconda del CYP da ricercare, in una vaschetta di plastica contenente PBS e Tween 20 0.05% al di sopra di un agitatore per 1 e ½ h.
- Sottoporre la membrana a 3 lavaggi consecutivi di 20 min ciascuno, con 30 mL di PBS 1X, PBS 1X e 0.5% Tween 20, PBS e Tween 20 0.05%.
- Incubare la membrana con l'anticorpo secondario, diversamente diluito a seconda del CYP da ricercare e dell'anticorpo primario utilizzato, come prima, in una vaschetta di plastica contenente PBS e Tween 20 0.05% al di sopra di un agitatore per 1 e ½ h.

- Al termine delle incubazioni, sciacquare la membrana in acqua distillata, recarsi in camera oscura e procedere con la rivelazione che prevede l'utilizzo del kit Supersignal® West Pico Chemiluminescent Substrate.
- Preparare la soluzione contenente il substrato cromogeno mescolando le soluzioni A e B nel rapporto 1:1 (sono necessari 0.125 mL di soluzione di lavoro per cm<sup>2</sup> di superficie della membrana).
- Distribuire uniformemente il *mix* sulla superficie della membrana ed aspettare 5 min affinché avvenga la reazione.
- Per l'impressione, porre all'interno della cassetta radiografica la lastra ed i lucidi contenenti la membrana; lasciar impressionare la lastra per 3-5 min (indicativamente).
- Passare alla fase di sviluppo e fissaggio.

Nelle tabelle 4.1.3 e 4.1.4 vengono indicate le specifiche degli anticorpi primari e secondari utilizzati, nonché le diluizioni d'uso, messe a punto contestualmente nel nostro laboratorio.

Tabella 4.1.3: specifiche degli anticorpi primari utilizzati.

| Specifiche anticorpi primari                     |                                  | Produttore  | Diluizione d'uso |
|--|----------------------------------|---|------------------|
| Anti-CYP1A1/2 di coniglio                        | Policlonale ottenuto in capra    | Oxford Biomedical Research, Milano, Italia  | 1:100            |
| Anti-CYP2B1/2 di ratto                           | Policlonale ottenuto in capra    | Daiichi Pure Chemicals Co., Prodotti Gianni, Milano, Italia   | 1:1000           |
| Anti-CYP2C8/9/19 di uomo e anti-CYP2C12 di ratto | Policlonale ottenuto in coniglio | Chemicon International, Prodotti Gianni, Milano, Italia   | 1:1000           |
| Anti-CYP2E1 di uomo e ratto                      | Policlonale ottenuto in pecora   | Chemicon International, Prodotti Gianni, Milano, Italia   | 1:2000           |
| Anti-CYP3A1/2 di ratto                           | Monoclonale                      | Gentilmente donato da H.V. Gelboin, National Institute of Health and Cancer (Bethesda, Maryland, USA) | 1:500            |

Tabella 4.1.4: specifiche degli anticorpi secondari utilizzati.

| Specifiche anticorpi secondari  |                   | Produttore                    | Diluizione d'uso                    |
|---------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| Anti-capra ottenuto in coniglio | Per CYP1A e CYP2B | SIGMA, Milano, Italia         | 1:5000 per CYP1A e 1:4000 per CYP2B |
| Anti-coniglio ottenuto in asino | Per CYP2C         | GE Healthcare, Milano, Italia | 1:2000                              |
| Anti-topo ottenuto in pecora    | Per CYP3A         | GE Healthcare, Milano, Italia | 1:5000                              |
| Anti-pecora ottenuto in asino   | Per CYP2E         | SIGMA, Milano, Italia         | 1:1000                              |

**Densitometria e normalizzazione delle bande**

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

**Analisi dei dati ed analisi statistica**

I dati ottenuti dall'attività catalitica, dall'immuno-elettroforesi e dalla Q RT-PCR sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard (DS). L'analisi statistica è stata eseguita dal programma Graph Pad InStat 2.01 (San Diego, CA, USA), utilizzando il test ANOVA (*one-way Analysis of Variance*). In caso di variazioni significative è stato eseguito il post-test Tukey (*Tukey-Kramer multiple comparisons test*).

E' stata inoltre effettuata l'analisi della correlazione tra i dati ottenuti dall'attività catalitica e dall'espressione genica mediante l'utilizzo del test non parametrico di Spearman. In entrambi i casi, la presenza di valori di  $p < 0.05$  è considerata significativa.

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

## 4.2. RISULTATI

### Valutazione qualitativa e quantitativa dell'RNA estratto

La qualità dell'RNA estratto è stata valutata mediante elettroforesi su gel di agarosio 1%: sono state evidenziate l'assenza di DNA genomico e di effetti di *smear*. Inoltre la qualità di alcuni campioni, scelti casualmente, è stata valutata anche mediante l'utilizzo dello strumento Agilent 2100 Bioanalyser (Waldbrook, Germany), che effettua un'elettroforesi virtuale dei campioni in capillari.

In figura 4.2.1 viene riportata una rappresentazione schematica dell'analisi di alcuni campioni con il Bioanalyser (elettroforesi virtuale in gel di agarosio e relativi spettri).

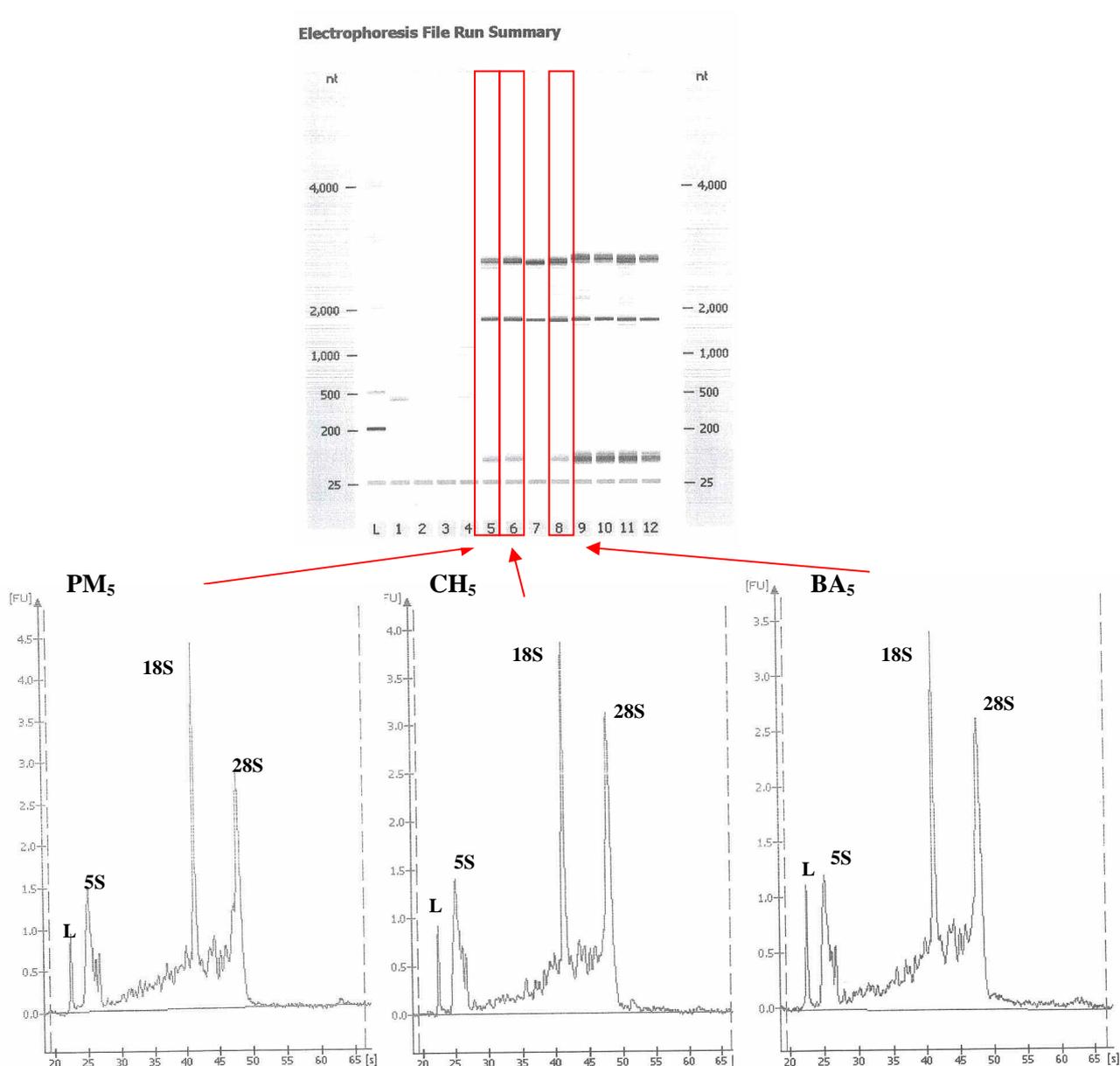


Figura 4.2.1: Rappresentazione schematica di una elettroforesi virtuale mediante Bioanalyser degli estratti di RNA dei campioni CH<sub>5</sub>, PM<sub>5</sub> e BA<sub>5</sub> ed i rispettivi spettri ottenuti, in cui i picchi corrispondono alle subunità ribosomiali 28S, 18S e 5S ed al marcatore di peso molecolare (L).

Si può notare una parziale degradazione dell'RNA totale dalla presenza di picchi aberranti che non corrispondono strettamente alle tre subunità ribosomiali e dal fatto che il picco corrispondente alla subunità 28S presenti un'altezza inferiore rispetto a quella del 18S. Tale risultato comunque rasenta i margini di accettabilità ed i campioni di RNA sono stati pertanto utilizzati nelle analisi successive.

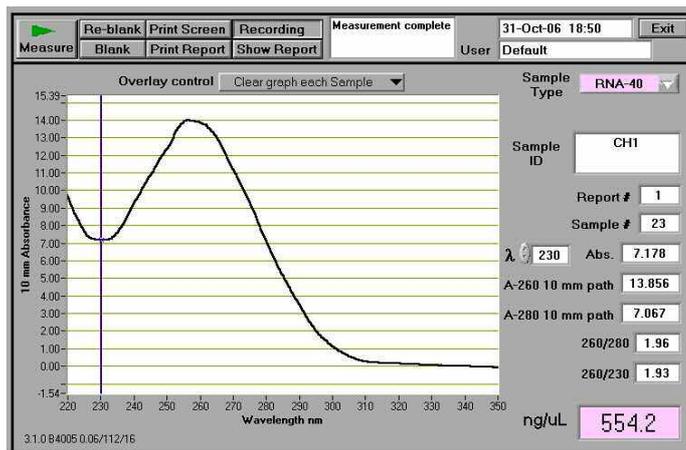
La quantificazione degli RNA estratti e la loro purezza sono state stimate invece, attraverso lettura al NanoDrop; nella tabella seguente (n. 4.2.1) vengono riportati i dati di concentrazione ed i rapporti dell'assorbanza  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$ , indici rispettivamente di contaminazione da proteine e da fenoli, carboidrati, peptidi (valori di purezza superiori a 1.8 sono considerati accettabili e soddisfacenti).

In figura 4.2.2, invece, vengono riportati degli esempi di grafico fornito dallo strumento dopo aver effettuato la scansione e la conseguente quantificazione dei campioni.

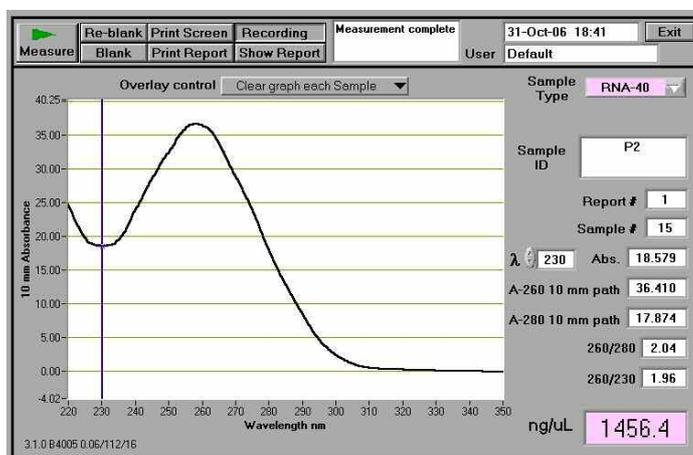
| <b>Gruppo</b>                 | <b>Campione</b>  | <b>Concentrazione<br/>RNA (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>)</b> | <b>Abs<br/>260/280</b> | <b>Abs<br/>260/230</b> |
|-------------------------------|------------------|--|------------------------|------------------------|
| <b>Charolais</b>              | CH <sub>1</sub>  | 0.55   | 1.96                   | 1.93                   |
|                               | CH <sub>2</sub>  | 1.53   | 2.04                   | 1.76                   |
|                               | CH <sub>3</sub>  | 2.05   | 2.01                   | 1.36                   |
|                               | CH <sub>4</sub>  | 0.78   | 1.99                   | 1.83                   |
|                               | CH <sub>5</sub>  | 2.09   | 2.02                   | 1.70                   |
|                               | CH <sub>6</sub>  | 1.99   | 2.02                   | 1.53                   |
|                               | CH <sub>7</sub>  | 1.00   | 2.02                   | 1.68                   |
|                               | CH <sub>8</sub>  | 1.04   | 2.02                   | 1.90                   |
|                               | CH <sub>13</sub> | 1.28   | 2.03                   | 1.97                   |
|                               | CH <sub>14</sub> | 1.41   | 2.02                   | 1.86                   |
| <b>Piemontese</b>             | PM <sub>2</sub>  | 1.46   | 2.04                   | 1.96                   |
|                               | PM <sub>3</sub>  | 1.70   | 2.00                   | 1.16                   |
|                               | PM <sub>4</sub>  | 0.86   | 1.99                   | 1.72                   |
|                               | PM <sub>5</sub>  | 1.89   | 2.02                   | 1.46                   |
|                               | PM <sub>6</sub>  | 0.36   | 1.94                   | 1.55                   |
|                               | PM <sub>7</sub>  | 1.11   | 2.01                   | 1.57                   |
|                               | PM <sub>8</sub>  | 0.57   | 1.95                   | 1.64                   |
|                               | PM <sub>9</sub>  | 0.31   | 1.94                   | 1.72                   |
| <b>Blonde<br/>d'Aquitaine</b> | BA <sub>2</sub>  | 0.89   | 2.01                   | 1.81                   |
|                               | BA <sub>3</sub>  | 0.45   | 1.93                   | 1.79                   |
|                               | BA <sub>4</sub>  | 0.57   | 1.95                   | 1.83                   |
|                               | BA <sub>5</sub>  | 1.26   | 2.02                   | 1.91                   |
|                               | BA <sub>6</sub>  | 0.71   | 1.99                   | 2.09                   |
|                               | BA <sub>7</sub>  | 0.58   | 1.93                   | 2.05                   |
|                               | BA <sub>8</sub>  | 0.58   | 2.01                   | 1.90                   |

Tabella 4.2.1: concentrazione e purezza dei campioni di RNA estratti a partire dai campioni di fegato appartenenti alle tre razze oggetto di studio. Vengono riportati i dati di concentrazione in  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ed i rapporti tra i valori di assorbanza a 260, 280 e 230 nm. Per tutti i campioni, sono stati processati circa 80 mg di tessuto e l'RNA estratto è stato risospeso in 100  $\mu\text{L}$  di acqua.

A



B



C

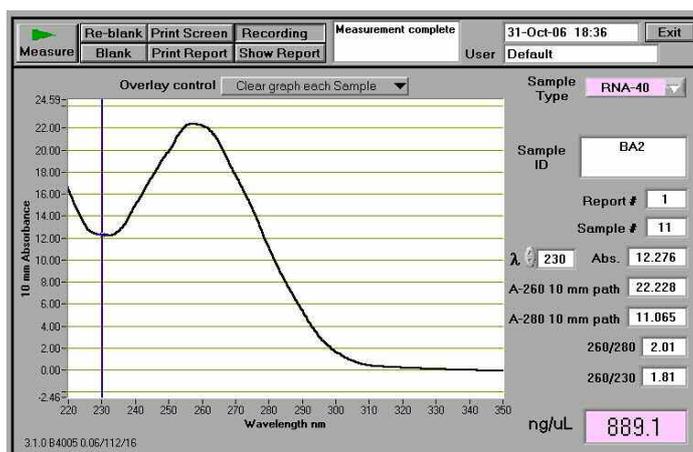


Figura 4.2.2: grafici di assorbanza ottenuti dall'analisi degli estratti CH<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> e BA<sub>2</sub> (A, B, C, rispettivamente) con il NanoDrop; si noti il picco di assorbimento degli acidi nucleici a 260 nm.

**Disegno dei primers**

Per ogni gene da analizzare, è stata effettuata l'analisi bioinformatica, per raccogliere informazioni sul gene di interesse, individuare la sequenza di riferimento e determinarne la struttura esone-introne per la successiva progettazione dei *primers*. Sono state quindi disegnate le coppie di oligonucleotidi, rispettando i criteri di scelta prima descritti. Nella tabella 4.2.2 vengono riportate le sequenze dei *primers* ottenuti, nonché le loro caratteristiche di lunghezza, temperatura di *melting*, % in GC e lunghezza dell'amplicone atteso.

Le sequenze dei *primers* per i geni contrassegnati da un asterisco sono state gentilmente concesse da Cantiello (dati personali). Per tutti i geni individuati come *target*, la verifica della corrispondenza delle sequenze dei *primers* e dell'amplicato con il gene bovino oggetto di studio (mediante *Blastn*), ha dato esito positivo.

| Gene           | Sequenza <i>primers</i> 5' → 3'                               | Lunghezza<br>Primer<br>(bp) | T <sub>m</sub><br>(°C) | %<br>GC  | Lunghezza<br>amplicone<br>(bp) |
|----------------|---|-----------------------------|------------------------|----------|--------------------------------|
| <b>CYP1A1</b>  | F:GACCTGAATCAGAGGTTCTACGTCT<br>R : CCGGATGTGACCCTTCTCAA       | 25<br>20                    | 58<br>59               | 48<br>55 | 81                             |
| <b>CYP1A2</b>  | F : ACCATGACCCGAAGCTGTG<br>R : CAATGGTGGTGCCATCAGAC           | 19<br>20                    | 58<br>58               | 58<br>55 | 78                             |
| <b>CYP2B6*</b> | F : GCGGACCTCATCCCCATT<br>R : GTGCCCTTGGGAAGGATGT             | 18<br>19                    | 58<br>60               | 61<br>58 | 80                             |
| <b>CYP2C8</b>  | F : CCCAGAGGTCATAGCTAAGGC<br>R : CGGTGTCTGCCAAGCTCAT          | 21<br>19                    | 59<br>58               | 57<br>58 | 57                             |
| <b>CYP2C9</b>  | F : TCCCTGGACATGAACAACCC<br>R : TTGTGCTTTTCTGTTCATCTT         | 20<br>23                    | 59<br>59               | 55<br>39 | 71                             |
| <b>CYP2C18</b> | F:ATGTTAAGAACATTGGCAAATCCTT<br>R : GGCCATAGGTGTTGAGAGATTG     | 25<br>23                    | 58<br>59               | 32<br>48 | 51                             |
| <b>CYP2C19</b> | F : TCCCAAGGGCACAACCATA<br>R : CCTTGCCATCGTGCAGG              | 19<br>17                    | 58<br>58               | 53<br>65 | 56                             |
| <b>CYP2E1</b>  | F : ACCCGGAGGTTGAAGAGAAAC<br>R : GCCCAATCACCTGTCAATTT         | 21<br>21                    | 58<br>60               | 52<br>48 | 51                             |
| <b>CYP3A4*</b> | F : GCCAGAGCCCGAGGAGTT<br>R:GCAGGTAGACGTAAGGATTTATGCT         | 18<br>25                    | 60<br>60               | 67<br>44 | 77                             |
| <b>UGT1A1</b>  | F : ACCATCCTACGTGCCCAGG<br>R : TGTTCTTCACCCGCTGCAG            | 19<br>19                    | 59<br>60               | 63<br>58 | 71                             |
| <b>UGT1A6</b>  | F : CAACACGGTCCTCATCGGA<br>R : CATAGGCTTCAAATTCCTGAGACAG      | 19<br>25                    | 59<br>59               | 58<br>44 | 71                             |
| <b>UGT2B17</b> | F : GCAAAGCCCCTACCTAAGGAATTA<br>R : AGTAAACACCACGACTCCATCTTTT | 24<br>25                    | 60<br>58               | 46<br>40 | 72                             |
| <b>GSTA1</b>   | F : TTCCCTCTGCTAAAGGCCCTA<br>R : CTCCTCTGGCTGCCAGG            | 21<br>18                    | 59<br>58               | 52<br>67 | 84                             |
| <b>GSTM1</b>   | F : TCCTTGACATGCACCGCATA<br>R : CAGAGATCTTCTTCAGGCCCTCA       | 20<br>23                    | 60<br>61               | 50<br>52 | 99                             |
| <b>GSTP1</b>   | F : CCTCATTTACCAACTACGAGGC<br>R : AAAGGCTTCAGGTGCTGGG         | 24<br>19                    | 60<br>59               | 50<br>58 | 72                             |

Tabella 4.2.2: *Primers* per il saggio in Q RT-PCR dei geni selezionati come *target*. Per ciascun *primer forward* (F) e *reverse* (R) vengono riportate la sequenza, la lunghezza (bp), la temperatura di *melting* (T<sub>m</sub>) e la % in GC, nonché la lunghezza dell'amplicone atteso (bp).

\* Cantiello (dati personali)

Attraverso l'analisi bioinformatica delle sequenze nucleotidiche appartenenti a razze diverse (Frisona, Holstein, Hereford, incroci con Angus, altri incroci...) disponibili nelle banche dati, è stato inoltre verificato mediante allineamento, che le regioni di cDNA complementari ai *primers* scelti, non presentassero delle differenze nella sequenza: è stata valutata quindi l'assenza di polimorfismi in tali regioni, perlomeno per le razze al momento disponibili, in modo da garantire l'idoneità dei *primers* in tutte e tre le razze oggetto di studio.

### Messa a punto dei saggi in Q RT-PCR

Per verificare la funzionalità delle varie coppie di *primers*, è stata allestita una reazione di Q RT-PCR in quantificazione assoluta, impiegando come template un *pool* di cDNA di fegato delle tre razze. L'analisi è stata effettuata in triplicato per tutti i geni *target*, utilizzando quattro diverse combinazioni di *primers forward* e *reverse*: 300 nM/300 nM, 900 nM/300nM, 300 nM/900 nM e 900 nM/900 nM. L'amplificazione è avvenuta con successo in tutti i geni ed a seguito dell'analisi delle curve, è stata scelta la combinazione che permettesse l'amplificazione più efficiente (vedi tabella 4.2.3).

Per mezzo dell'analisi delle curve di dissociazione, è stata inoltre verificata l'assenza di sintesi di dimeri di *primers*, nonché l'amplificazione di un solo amplicone della temperatura di *melting* attesa.

L'efficienza di amplificazione è stata successivamente valutata allestendo una curva degli standard per ciascun gene, utilizzando le combinazioni di *primers* desunte dalle prime analisi effettuate per la messa a punto. Per ciascun gene sono stati riportati in grafico i valori di Ct in funzione della concentrazione di cDNA espressa come logaritmo in base 10: se la reazione ha una buona efficienza, i Ct nella fase esponenziale sono lineari e quindi la curva che fornisce la miglior interpolazione dei punti è una retta (Rutledge e Côté, 2003). Si ottiene così un grafico "ciclo-soglia vs log<sub>10</sub> del numero di copie del campione", in cui l'intercetta e l'inclinazione della retta corrispondono, rispettivamente, al numero di molecole di template al livello soglia ed all'efficienza (E) della reazione (Peters *et al.*, 2004):

$$E = [10^{(-1/\text{inclinazione})}] - 1$$

L'inclinazione ideale per un'efficienza del 100% dovrebbe essere -3.322, ma sono comunemente considerati accettabili i valori compresi nell'intervallo tra -3.6 e -3.1, che delineano un'efficienza contenuta nella finestra 89.6% < E < 110.2%; se l'efficienza calcolata è maggiore al 100%, significa che sono stati commessi errori di pipettatura o che è presente un inibitore di PCR nello standard (Ginzinger, 2002).

Un altro parametro valutato è il coefficiente di regressione lineare o R<sup>2</sup>: quanto più la curva interpola bene i punti e assomiglia a una retta, tanto più R<sup>2</sup> si avvicina al suo valore ottimale pari a 1.

In tabella 4.2.3 si possono osservare i risultati delle curve standard di tutti i geni inclusi nello studio.

I saggi sono risultati lineari complessivamente per un *range* dinamico compreso tra 7 e 10 cicli.

| Gene    | Combinazione primers (F/R) | Slope | R <sup>2</sup> | Efficienza |
|---------|----------------------------|-------|----------------|------------|
| CYP1A1  | 900/900                    | -3.30 | 0.99           | 100.9      |
| CYP1A2  | 900/900                    | -3.38 | 0.99           | 97.6       |
| CYP2B6* | 300/300                    | -3.29 | 0.99           | 101.3      |
| CYP2C8  | 900/900                    | -3.35 | 0.99           | 98.8       |
| CYP2C9  | 300/900                    | -3.31 | 0.99           | 100.5      |
| CYP2C18 | 900/300                    | -3.27 | 0.99           | 102.2      |
| CYP2C19 | 900/300                    | -3.33 | 0.99           | 99.7       |
| CYP2E1  | 900/300                    | -3.33 | 0.99           | 99.7       |
| CYP3A4  | 300/300                    | -3.31 | 0.99           | 100.5      |
| UGT1A1  | 300/300                    | -3.14 | 0.99           | 108.2      |
| UGT1A6  | 300/300                    | -3.38 | 0.98           | 97.6       |
| UGT2B17 | 900/300                    | -3.44 | 0.99           | 95.3       |
| GSTA1   | 900/900                    | -3.34 | 0.99           | 99.3       |
| GSTM1   | 300/300                    | -3.42 | 0.99           | 96.1       |
| GSTP1   | 900/900                    | -3.43 | 0.99           | 95.7       |

Tabella 4.2.3: Condizioni di messa a punto dei saggi in Q RT-PCR dei geni *target*: combinazione dei *primers* e curve standard. Vengono riportate le concentrazioni dei *primers* F e R risultate essere più performanti (miglior efficienza di amplificazione) ed i parametri delle curve standard (*slope*, cioè il coefficiente angolare della retta e R<sup>2</sup>, cioè l'indice di regressione lineare) con il relativo calcolo dell'efficienza di reazione. \*Cantiello (dati personali)

#### Scelta del gene reference

In tabella 4.2.4 vengono riportati i geni selezionati quali possibili *reference* da utilizzarsi nei saggi di Q RT-PCR, nonché le sequenze e le caratteristiche dei *primers* scelti sulla base dei criteri adottati anche per il disegno dei geni *target*.

| Gene  | Sequenza primers 5' → 3'                                   | Lunghezza Primer (bp) | Tm (°C)  | %GC      | Lunghezza amplicone (bp) |
|-------|--|-----------------------|----------|----------|--------------------------|
| BACT* | F : GTCGACACCGCAACCAGTT<br>R : AAGCCGGCCTTGACAT            | 19<br>17              | 60<br>54 | 58<br>59 | 85                       |
| B2M   | F : TCGTGGCCTTGGTCCTTCT<br>R : AATCTTTGGAGGACGCTGGAT       | 19<br>21              | 59<br>59 | 63<br>55 | 71                       |
| TBP   | F : AGAGCTCCGGGATCGTGC<br>R : GATTCAGTGTGGATAACAATATTTTGCA | 18<br>27              | 60<br>59 | 67<br>33 | 51                       |

Tabella 4.2.4: *Primers* per il saggio in Q RT-PCR dei geni selezionati come *reference*. Per ciascun *primer forward* (F) e *reverse* (R) vengono riportate la sequenza, la lunghezza (bp), la temperatura di *melting* (Tm) e la % in GC, nonché la lunghezza dell'amplicone atteso (bp).

\*Cantiello (dati personali)

L'efficienza dei *primers* sopra elencati, è stata testata in campioni di fegato di bovino, con la medesima procedura di messa a punto adottata per i geni *target* e nella tabella 4.2.5 vengono riportati i corrispettivi dati di efficienza ottenuti dalla costruzione delle curve degli standard.

| Gene | Combinazione primers (F/R) | Slope | R <sup>2</sup> | Efficienza |
|------|----------------------------|-------|----------------|------------|
| BACT | 300/300                    | -3.39 | 0.99           | 95.4       |
| B2M  | 900/900                    | -3.24 | 0.99           | 105.8      |
| TBP  | 900/900                    | -2.64 | 0.99           | 160.4      |

Tabella 4.2.5: Condizioni di messa a punto dei saggi in Q RT-PCR dei geni *reference*: combinazione dei *primers* e curve standard. Vengono riportate le concentrazioni dei *primers* F e R risultate essere più performanti (miglior efficienza di amplificazione) ed i parametri delle curve standard (*slope*, cioè il coefficiente angolare della retta e R<sup>2</sup>, cioè l'indice di regressione lineare) con il relativo calcolo dell'efficienza di reazione.

Nel corso di questo studio (e anche negli altri esperimenti descritti in seguito) si è cercato di valutare quale fosse il miglior gene *housekeeping* da utilizzare, in modo tale da permettere una quantificazione più corretta possibile dell'espressione dei geni *target*. Si è pertanto cercato di capire quale fosse il gene espresso a livelli pressoché costanti nella cellula, la cui espressione non venisse alterata dall'esperimento in sé.

Qui di seguito viene descritto l'approccio generale utilizzato per tutti gli esperimenti trattati in questa tesi.

A seguito della fase di messa a punto, la valutazione è stata ristretta ai geni ACTB e B2M, in quanto il gene TBP era risultato poco espresso nel fegato di bovino e l'amplificazione, effettuata utilizzando due diverse coppie di *primers*, era risultata poco efficiente in entrambi i casi.

Inizialmente è stata effettuata l'analisi statistica (ANOVA + post test di Tukey) utilizzando i Ct medi di ciascun gruppo sperimentale per escludere la presenza di differenze statisticamente significative tra i gruppi appartenenti allo stesso esperimento: è stata infatti confermata l'assenza di effetti legati al trattamento o alla razza sull'espressione dei due geni *housekeeping*.

Successivamente sono stati considerati i *range*  $\Delta$ Ct (sommatoria in valore assoluto dei  $\Delta$ Ct tra il gruppo di riferimento e gli altri appartenenti allo stesso esperimento) ed il *range* Ct (differenza tra il Ct più alto e quello più basso registrati nell'ambito dello stesso esperimento), entrambi indici della variabilità del gene in seguito a variazioni fisiologiche (razza) o trattamento. Tali valori vengono riportati nelle tabelle 4.2.6 e 4.2.7 (ACTB e B2M, rispettivamente).

| Esperimento          | Gruppi           | Ct medio gruppi (ACTB) | DS   | $\Delta$ CT trattati - controlli | <i>range</i> $\Delta$ Ct | <i>range</i> Ct |
|----------------------|------------------|------------------------|------|----------------------------------|--------------------------|-----------------|
| Razze bovine         | CH               | 21.33                  | 1.60 | -                                | 0.17                     | 5.61            |
|                      | PM               | 21.40                  | 0.73 | 0,07                             |                          |                 |
|                      | BA               | 21.43                  | 0.63 | 0,10                             |                          |                 |
| DEX PD vitelloni     | K <sub>PD</sub>  | 21.21                  | 1.83 | -                                | 2.3                      | 5.56            |
|                      | T <sub>PD</sub>  | 22.53                  | 1.62 | 1,32                             |                          |                 |
|                      | B <sub>PD</sub>  | 22.19                  | 1.82 | 0,98                             |                          |                 |
| DEX + E <sub>2</sub> | K <sub>de</sub>  | 19.93                  | 0.83 | -                                | 1.11                     | 4.32            |
|                      | D <sub>de</sub>  | 19.69                  | 0.44 | -0,24                            |                          |                 |
|                      | DE <sub>de</sub> | 20.80                  | 0.58 | 0,87                             |                          |                 |
| DEX TO vitelli       | K <sub>TO</sub>  | 20.72                  | 0.83 | -                                | 0.72                     | 2.17            |
|                      | D <sub>TO</sub>  | 21.13                  | 0.58 | 0,40                             |                          |                 |
|                      | V <sub>TO</sub>  | 21.05                  | 0.83 | 0,32                             |                          |                 |

Tabella 4.2.6: Valori della media dei Ct di ACTB per ogni gruppo sperimentale con relativa deviazione standard (DS). Sono inoltre riportati i  $\Delta$ Ct calcolati tra i gruppi di riferimento (controlli o CH) ed i gruppi di trattamento (o in questo caso razze diverse dalla CH), il *range* dei  $\Delta$ Ct, dato dalla sommatoria in valore assoluto dei  $\Delta$ Ct, ed il *range* Ct dato dalla differenza tra il Ct massimo e minimo registrato in ogni esperimento.

| Esperimento          | Gruppi           | Ct medio gruppi (B2M) | DS   | $\Delta$ CT trattati - controlli | range $\Delta$ Ct | range Ct |
|----------------------|------------------|-----------------------|------|----------------------------------|-------------------|----------|
| Razze bovine         | CH               | 20.49                 | 0.90 | -                                | 0.2               | 2.86     |
|                      | PM               | 20.36                 | 0.85 | -0.13                            |                   |          |
|                      | BA               | 20.42                 | 0.60 | -0.07                            |                   |          |
| DEX PD vitelloni     | K <sub>PD</sub>  | 19.88                 | 1.73 | -                                | 3.12              | 6.46     |
|                      | T <sub>PD</sub>  | 21.31                 | 1.69 | 1.43                             |                   |          |
|                      | B <sub>PD</sub>  | 21.57                 | 1.86 | 1.69                             |                   |          |
| DEX + E <sub>2</sub> | K <sub>de</sub>  | 18.27                 | 1.02 | -                                | 1.58              | 4.12     |
|                      | D <sub>de</sub>  | 18.74                 | 0.51 | 0.47                             |                   |          |
|                      | DE <sub>de</sub> | 19.37                 | 0.99 | 1.11                             |                   |          |
| DEX TO vitelli       | K <sub>TO</sub>  | 19.46                 | 1.29 | -                                | 0.35              | 3.51     |
|                      | D <sub>TO</sub>  | 19.77                 | 0.39 | 0.31                             |                   |          |
|                      | V <sub>TO</sub>  | 19.43                 | 0.45 | -0.04                            |                   |          |

Tabella 4.2.7: Valori della media dei Ct di B2M per ogni gruppo sperimentale con relativa deviazione standard (DS). Sono inoltre riportati  $\Delta$ Ct calcolati tra i gruppi di riferimento (controlli o CH) ed i gruppi di trattamento (o in questo caso razze diverse dalla CH), il *range* dei  $\Delta$ Ct, dato dalla sommatoria in valore assoluto dei  $\Delta$ Ct, ed il *range* Ct dato dalla differenza tra il Ct massimo e minimo registrato in ogni esperimento.

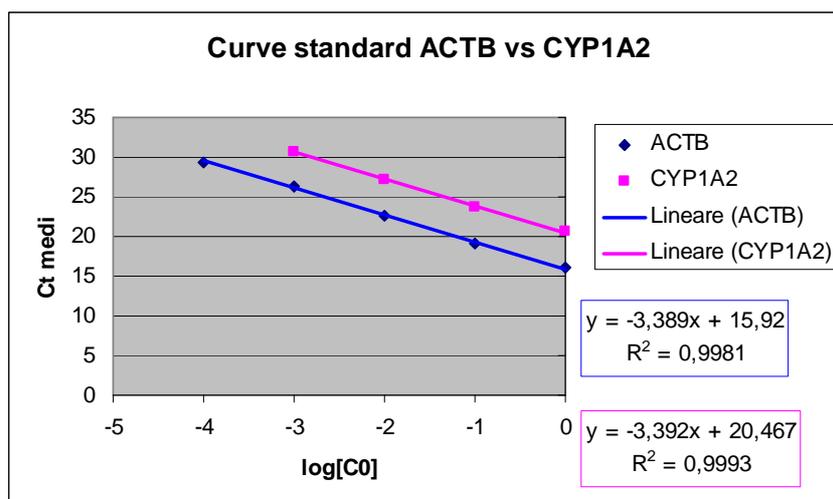
Complessivamente dall'analisi effettuata risulta che i due geni considerati sono sovrapponibili, entrambi validi e quindi ugualmente utilizzabili; è stato però scelto il gene codificante per la ACTB, in quanto considerato attendibile: per questo motivo è molto utilizzato negli studi di espressione genica in letteratura. Si può comunque notare che tra i gruppi esiste una minima variabilità, probabilmente dovuta, oltre a fattori interindividuali, ad errori di pipettatura e lettura da parte del termociclatore.

Per consentire la quantificazione relativa dell'espressione genica mediante il metodo del  $\Delta\Delta$ Ct, è necessario che geni *target* e *reference* presentino simile efficienza di amplificazione; questo requisito può essere verificato attraverso il confronto della curva standard del gene *reference* (ACTB) con quella di ogni gene *target* oggetto di studio.

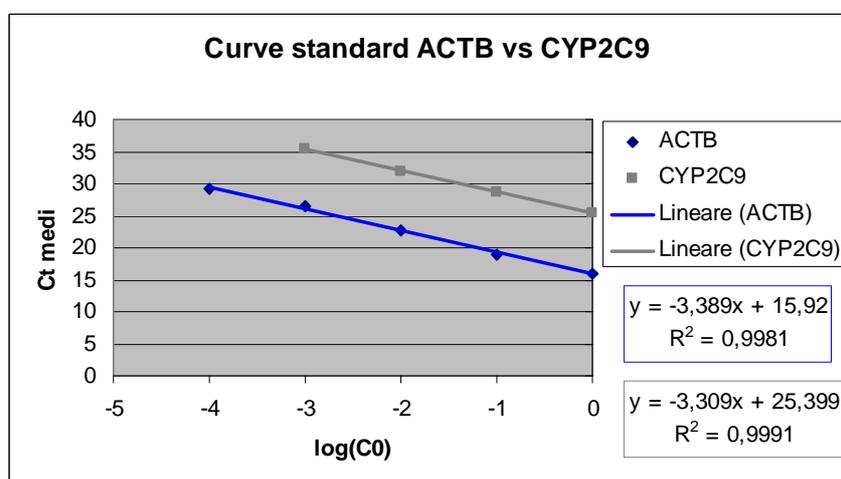
Per confermare appunto che le efficienze tra geni *target* e *reference* fossero comparabili, è stato condotto un esperimento di validazione, costruendo un grafico in cui vengono riportate, in ascissa, il  $\log_{10}$  delle diluizioni seriali ed in ordinata i valori di Ct medi per ogni triplicato: le linee che interpolano i punti del grafico, rispettivamente per i singoli *target* ed il *reference*, dovrebbero essere parallele e quindi presentare simile inclinazione.

In figura 4.2.3 vengono riportati alcuni esempi di validazione per alcuni geni *target*, anche se la medesima analisi è stata effettuata per tutti i geni oggetto di studio.

A



B



C

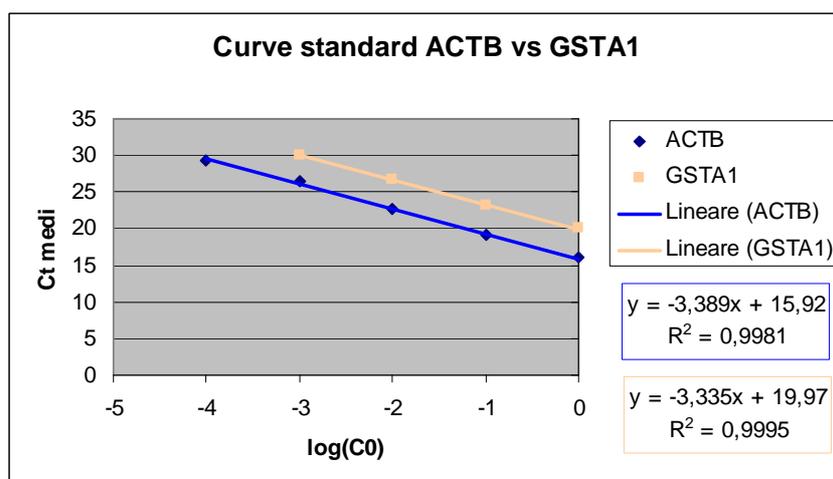


Figura 4.2.3: Grafici delle curve standard dei geni *target* (A) CYP1A2, (B) CYP2C9, (C) GSTA1 confrontate con quella del gene ACTB, selezionato come *reference*. In ordinata sono riportati i valori dei Ct medi per ogni triplicato, mentre in ascissa la concentrazione dello standard di cDNA in scala logaritmica. A lato di ciascun grafico sono riportate le equazioni delle curve, le quali evidenziano che l'inclinazione è simile e pertanto le rette sono pressoché parallele.

**Verifica dei geni target**

Gli amplificati sono stati sottoposti a verifica attraverso l'analisi delle curve di *melting* per ogni singolo campione: è stata così confermata la sintesi di un solo amplicone della temperatura di *melting* attesa.

Inoltre, è stata eseguita una PCR *end-point* utilizzando un *pool* di cDNA per verificare ulteriormente la funzionalità dei *primers*, nello specifico, controllando che l'amplicone ottenuto presentasse la stessa lunghezza di quello atteso (Figura 4.2.4).

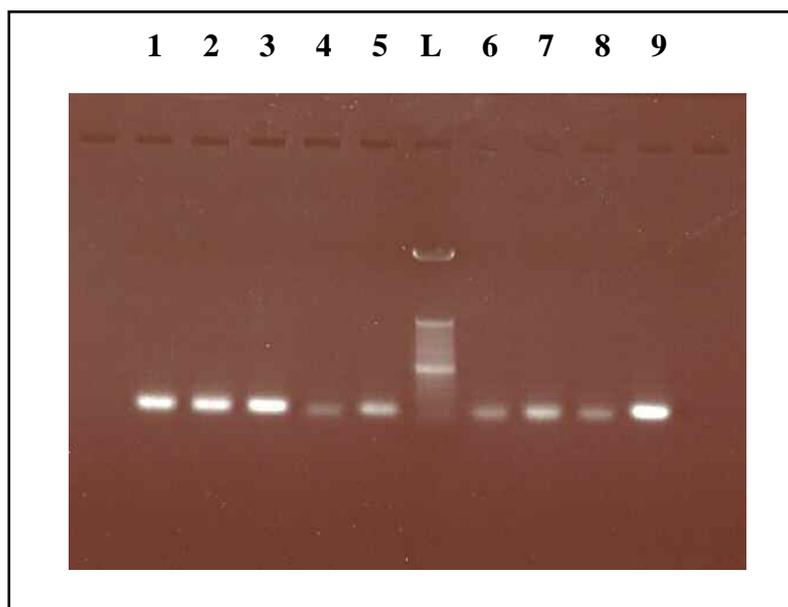
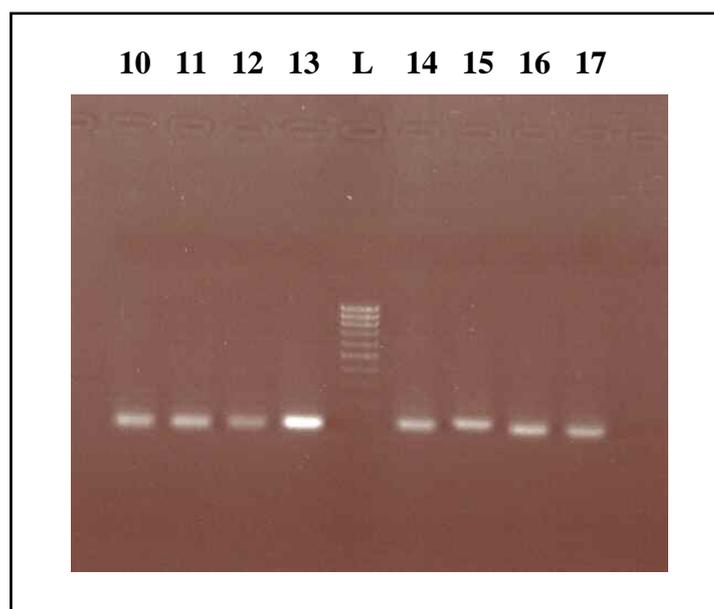
**A****B**

Figura 4.2.4: Elettroforesi su gel di agarosio 1.8% di 10  $\mu$ L di amplificato, nell'ordine, dei geni CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2E1, CYP3A4 (figura A) e UGT1A1, UGT1A6, UGT2B17, BACT, GSTA1, GSTM1, GSTP1, B2M (figura B). L = marcatore di peso molecolare (50 bp nella foto A e 100 bp nella foto B).

I dati relativi all'attività catalitica degli enzimi di fase I e II (esclusi EROD, TBT4-OH e 2 $\beta$ -, 6 $\beta$ -, 16 $\beta$ OH-T) qui di seguito riportati, sono stati oggetto del progetto di ricerca del Post-Dottorato della Dott.ssa Monica Carletti e sono stati inseriti nella pubblicazione Giantin *et al.*, 2008. Vengono citati in questo contesto per rendere possibile l'analisi della correlazione tra l'attività catalitica e l'espressione genica.

**Contenuto di proteina, citocromo P450, glutazione ed attività di NAD(P)H citocromo c riduttasi**

Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra le razze per quanto riguarda il contenuto di proteina microsomiale e citosolica, citocromo P450, glutazione (GSH) ed attività della NADH citocromo c riduttasi, mentre i risultati della NADPH citocromo c riduttasi, hanno evidenziato che la razza CH presentava una più spiccata attività rispetto alla PM ( $p < 0.01$ : tabella 4.2.8).

|                              | Razze bovine                  |                  |                  |
|------------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|
|                              | CH                            | PM               | BA               |
| <b>Proteine microsomiali</b> | 30.06 $\pm$ 1.69              | 31.25 $\pm$ 2.88 | 33.89 $\pm$ 5.07 |
| <b>Proteine citosoliche</b>  | 25.58 $\pm$ 2.25              | 28.15 $\pm$ 2.14 | 27.28 $\pm$ 2.72 |
| <b>Citocromo P450</b>        | 0.63 $\pm$ 0.09               | 0.66 $\pm$ 0.14  | 0.67 $\pm$ 0.06  |
| <b>GSH</b>                   | 3.5 $\pm$ 0.3                 | 3.7 $\pm$ 0.3    | 3.8 $\pm$ 0.4    |
| <b>NADPH-R</b>               | 90.3 $\pm$ 10.7 <sup>aa</sup> | 61.1 $\pm$ 11.0  | 74.4 $\pm$ 15.8  |
| <b>NADH-R</b>                | 939 $\pm$ 224                 | 925 $\pm$ 192    | 978 $\pm$ 191    |

Tabella 4.2.8: Contenuto di proteina microsomiale e citosolica, citocromo P450, GSH e attività di NAD(P)H citocromo c riduttasi<sup>aa</sup> nei vitelloni di razza CH (n = 10), PM (n = 8) e BA (n = 7). I dati sono espressi come media  $\pm$  DS.

<sup>aa</sup>:  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (proteina microsomiale e citosolica); nmoli/mg proteina (contenuto citocromo P450);  $\mu\text{moli}$  GSH/g di fegato (contenuto GSH); nmoli/min/mg proteina (NADPH-R e NADH-R).

<sup>a</sup>Differenze statisticamente significative tra CH e PM (ANOVA + post test di Tukey; aa:  $p < 0.01$ ).

### **Effetti della razza sugli enzimi biotrasformativi epatici**

Gli effetti della razza sugli enzimi biotrasformativi epatici di fase I e II a livello di attività catalitica, proteina e mRNA vengono riportati nelle tabelle 4.2.9, 4.2.10, 4.2.11, 4.2.12 e nell'allegato 1 (dati espressione genica in singolo), rispettivamente, mentre i risultati concernenti la correlazione non parametrica di Spearman tra l'attività catalitica e l'espressione genica sono presentati nella tabella 4.2.13. La figura 4.2.5 invece, riporta delle immagini rappresentative degli immunoblotting effettuati per ciascuna isoforma di CYP considerata.

#### **CYP1A: attività catalitica, proteina e mRNA**

Per la valutazione dell'attività catalitica CYP1A-dipendente sono stati scelti quali substrati modello il benzo[a]pirene e l'etossiresorufina. L'attività enzimatica ed il contenuto di apoproteina CYP1A tuttavia non hanno dimostrato differenze statisticamente significative tra le razze CH, PM e BA, con la sola eccezione della razza BA che ha evidenziato una più spiccata idrossilazione del benzo[a]pirene (BPOH) rispetto alla PM ( $p < 0.05$ ).

Al contrario, sono state evidenziate delle differenze nell'espressione genica delle isoforme CYP1A1 e CYP1A2: a tal proposito, la CH presentava un minor contenuto di CYP1A1 e CYP1A2 rispetto alla PM ( $p < 0.001$  e  $p < 0.05$ , rispettivamente) e alla BA (solo per CYP1A1:  $p < 0.001$ ).

Non è stata evidenziata una correlazione significativa tra le attività catalitiche BPOH e EROD e l'espressione genica di CYP1A1, mentre nella CH entrambe le attività catalitiche sono risultate essere significativamente correlate con l'espressione genica di CYP1A2, essendo i coefficienti di correlazione non parametrici di Spearman ( $r_s$ ) pari a 0.83 e 0.79 per BPOH e EROD, rispettivamente ( $p < 0.05$ ).

#### **CYP2B: attività catalitica, proteina e mRNA**

I bovini di razza CH presentavano la più elevata capacità biotrasformativa considerando quali attività catalitiche CYP2B-dipendenti, la *N*-demetilazione della benzfetamina (BENZDEM:  $p < 0.01$ , vs PM) e l'idrossilazione del TST in posizione 16 $\beta$  (16 $\beta$ OH-T:  $p < 0.01$  vs PM e  $p < 0.01$  vs BA).

Contrariamente a quanto sopra descritto, a livello proteico, era la razza BA a presentare il maggior contenuto di apoproteina e risultava essere addirittura statisticamente significativa rispetto alla CH ( $p < 0.05$ ). Questo risultato viene confermato anche a livello di espressione genica (CYP2B6) ed in entrambi i casi il *trend* corrispondeva a BA>PM>CH. L'analisi della correlazione tra 16 $\beta$ OH-T e l'espressione di CYP2B6 ha evidenziato una correlazione positiva per PM e BA ( $p < 0.05$ ) e negativa per CH ( $r_s = 0.71, 0.79$  e  $-0.38$ , rispettivamente).

Inoltre, è stato registrato un buon coefficiente di correlazione per la PM, se considerata l'attività BENZDEM ( $r_s = 0.74$ ,  $p < 0.05$ ). La figura 4.2.6 riporta il complessivo effetto della razza sul CYP2B a livello di attività catalitica, contenuto di apoproteina e mRNA, nonché l'analisi della correlazione tra 16 $\beta$ OH-T ed il contenuto di CYP2B6.

**CYP2C: attività catalitica, proteina e mRNA**

Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra le razze nell'attività catalitica della TBT4-OH e dell'aminopirina *N*-demetilasi (APDEM) e nel contenuto di apoproteina.

Analogamente, non sono state riscontrate differenze nell'espressione delle isoforme CYP2C8 e CYP2C19 (a discapito dell'alto contenuto di questi trascritti nella razza PM). Al contrario, è stato misurato un minor contenuto dei trascritti CYP2C9 e CYP2C18 nella CH ( $p < 0.01$  vs PM e BA e  $p < 0.001$  vs BA, rispettivamente); inoltre per quest'ultimo, sono state trovate delle differenze significative tra BA e PM con  $p < 0.05$ .

Per quanto riguarda invece l'analisi della correlazione, TBT4-OH è risultata essere correlabile positivamente con l'espressione genica di CYP2C19 nella CH, mentre APDEM con l'espressione di CYP2C8 nella PM però, all'opposto, in senso negativo ( $r_s = 0.82$  e  $-0.82$ , con  $p < 0.05$ , rispettivamente).

**CYP2E: attività catalitica, proteina e mRNA**

L'anilina ed il *p*-nitrofenolo sono stati scelti quali substrati modello per il CYP2E1. La frazione microsomiale epatica ottenuta dalla razza CH ha dimostrato una maggior attività catalitica, se considerata l'idrossilazione dei due substrati citati precedentemente. In particolare, l'attività dell'anilina idrossilasi (Aniline-OH) era di circa 2 e 1.5 volte più elevata rispetto a quella riportata nei microsomi di PM e BA ( $p < 0.001$  e  $p < 0.05$ , rispettivamente). Per quanto riguarda invece la *p*-nitrofenolo idrossilasi (pNP-OH), è stata registrata una più elevata attività nella razza CH rispetto alla BA ( $p < 0.05$ ).

L'immunoblotting è stato effettuato utilizzando un anticorpo policlonale anti-CYP2E1 di uomo e ratto ottenuto in pecora; sono state però osservate delle deboli bande di cross-reazione, che hanno impedito la loro conseguente analisi densitometrica (dati per questo non presentati). Non sono state osservate differenze statisticamente significative nell'espressione genica di CYP2E1, anche se la razza BA ne ha dimostrato un più alto contenuto; il *trend* complessivamente appariva essere BA > CH > PM. Nel complesso, questo risultato era parzialmente confermato dall'analisi della correlazione: infatti nella BA l'attività dell'anilina-OH era correlata negativamente con l'espressione genica del CYP2E1 ( $r_s = -0.94$ ,  $p < 0.05$ ).

**CYP3A: attività catalitica, proteina e mRNA**

Per quanto riguarda l'attività di *N*-demetilazione dei substrati CYP3A-dipendenti etilmorfina, eritromicina e TAO (ETDEM, ERDEM, TAODEM), non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra le razze bovine oggetto di studio. Al contrario il TST, un altro substrato del CYP3A, è stato maggiormente metabolizzato dalla CH: l'idrossilazione del TST in posizione 6 $\beta$  e 2 $\beta$  nella CH infatti, era pari a circa 2 volte quella evidenziata nelle razze PM e BA ( $p < 0.01$ ).

Contrariamente a quanto sopra riportato, a livello proteico, il CYP3A era maggiormente espresso nei vitelloni BA ( $p < 0.05$  vs CH). I risultati della Q RT-PCR inoltre, erano perfettamente in linea con quelli ottenuti dall'immuno-elettroforesi: anche in questo caso la BA appariva come la razza dotata della più alta espressione di CYP3A4 ( $p < 0.05$ , BA vs CH).

Non sono state però evidenziate correlazioni statisticamente significative tra i substrati impiegati ed il profilo di espressione del CYP3A4.

### **UGT: attività catalitica e mRNA**

Nelle condizioni sperimentali adottate in questo lavoro, la CH si è dimostrata essere la razza bovina dotata della più efficiente attività coniugativa nei confronti di  $\alpha$ -naftolo e *p*-nitrofenolo ( $\alpha$ N-UGT e pNP-UGT, rispettivamente), due substrati specifici per la famiglia UGT1. Per quanto riguarda il primo substrato, l'attività catalitica nella CH era circa 1.5 – 2 volte più elevata rispetto alla PM ( $p < 0.05$ ) ed alla BA ( $p < 0.01$ ), rispettivamente.

A livello di mRNA, l'espressione genica di UGT1A6 corrispondeva perfettamente al *trend* dell'attività pNP-UGT: la CH presentava infatti un contenuto di mRNA più elevato rispetto a quello riscontrato nella PM ( $p < 0.01$ ) e nella BA ( $p < 0.01$ : 3 e 8 volte, rispettivamente).

Al contrario, il trascritto UGT1A1 era più espresso nella razza BA ( $p < 0.01$ ) ed il *trend* evidenziato era esattamente l'opposto: BA > PM > CH. In linea con tale risultato, era anche l'espressione del trascritto UGT2B17, l'isoforma di UGT maggiormente coinvolta nella coniugazione degli steroidi.

Non è stata evidenziata alcuna correlazione significativa tra le due isoforme appartenenti alla famiglia UGT1 ed il profilo di espressione di UGT1A1 e UGT1A6.

### **GST: attività catalitica e mRNA**

Per quanto riguarda le reazioni di coniugazione GST-dipendenti, nella figura 4.2.7, vengono riportate le attività delle GST nei confronti di due differenti substrati, denominati CDNB (per attività GST globale) e DCNB (specifica per GST  $\mu$ 1). Il pattern di biotrasformazione del CDNB è risultato inferiore nel gruppo CH ( $p < 0.01$  vs PM e  $p < 0.001$  vs BA), mentre quello del DCNB era dello stesso ordine di grandezza nei vitelloni CH e PM, ma più elevato nei BA ( $p < 0.001$ ).

A livello pre-trascrizionale, analogamente a quanto evidenziato per l'attività catalitica, la CH ha dimostrato un complessivo minor contenuto dei trascritti GSTA1 e GSTP1, raggiungendo la significatività statistica ( $p < 0.05$  vs PM e BA, rispettivamente). Le più importanti differenze nel profilo di espressione genica però sono state notate per GSTM1: i bovini CH hanno dimostrato un'espressione da 3 e 6 volte inferiore, rispetto a quella presente in PM e BA ( $p < 0.05$  e  $p < 0.001$ , rispettivamente: figura 4.2.7).

Inoltre la correlazione tra le due attività catalitiche selezionate e l'espressione di GSTM1 è risultata statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ), per entrambi i substrati, nella razza PM, con dei valori di  $r_s$  pari a 0.82 e 0.89 per CDNB e DCNB, rispettivamente.

| Enzimi<br>Fase I | Attività<br>catalitica | Razze bovine                  |                          |              |
|------------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------|
|                  |                        | CH                            | PM                       | BA           |
| CYP1A            | BPOH*                  | 0.75 ± 0.13                   | 0.59 ± 0.23 <sup>c</sup> | 0.90 ± 0.15  |
|                  | EROD                   | 430.1 ± 59.3                  | 323.5 ± 43.0             | 383.4 ± 94.5 |
| CYP2B            | BENZDEM*               | 2.06 ± 0.39 <sup>aa</sup>     | 1.36 ± 0.28              | 1.77 ± 0.46  |
|                  | 16βOH-T                | 0.32 ± 0.11 <sup>aa,bb</sup>  | 0.19 ± 0.06              | 0.18 ± 0.08  |
| CYP2C            | TBT4-OH                | 0.04 ± 0.02                   | 0.04 ± 0.01              | 0.05 ± 0.02  |
|                  | APDEM*                 | 3.22 ± 0.91                   | 2.96 ± 0.62              | 3.09 ± 0.95  |
| CYP2E            | Aniline-OH*            | 0.56 ± 0.18 <sup>aaa,b</sup>  | 0.26 ± 0.06              | 0.36 ± 0.07  |
|                  | pNP-OH*                | 0.37 ± 0.11 <sup>b</sup>      | 0.35 ± 0.19 <sup>c</sup> | 0.13 ± 0.10  |
| CYP3A            | 6βOH-T                 | 0.88 ± 0.25 <sup>aa,bb</sup>  | 0.53 ± 0.15              | 0.49 ± 0.20  |
|                  | 2βOH-T                 | 0.30 ± 0.10 <sup>aaa,bb</sup> | 0.15 ± 0.05              | 0.17 ± 0.07  |
|                  | ERDEM*                 | 0.56 ± 0.12                   | 0.60 ± 0.28              | 0.52 ± 0.15  |
|                  | ETDEM*                 | 1.66 ± 0.35                   | 1.46 ± 0.31              | 1.38 ± 0.18  |
|                  | TAODEM*                | 0.42 ± 0.11                   | 0.42 ± 0.31              | 0.49 ± 0.14  |

Tabella 4.2.9: Attività catalitiche degli enzimi di fase I\* nei vitelloni CH (n = 10), PM (n = 8) e BA (n = 7).

I dati sono espressi come media ± DS.

\*: µg chinina/min/mg proteina (BPOH); pmoli/min/mg proteina (EROD); nmoli/min/mg proteina (BENZDEM, 16βOH-T, TBT4-OH, APDEM, Aniline-OH, pNP-OH, 6βOH-T, 2βOH-T, ERDEM, ETDEM, TAODEM).

<sup>a,b,c</sup>Differenze statisticamente significative tra CH e PM, CH e BA, PM e BA, rispettivamente (ANOVA + post test di Tukey; b, c:  $p < 0.05$ ; aa, bb:  $p < 0.01$ ; aaa:  $p < 0.001$ ).

\*Risultati Post-Dottorato Dott.ssa Monica Carletti

| Enzimi<br>Fase II | Attività catalitica | Razze bovine                   |                            |              |
|-------------------|---------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------|
|                   |                     | CH                             | PM                         | BA           |
| UGT               | αN-UGT*             | 13.5 ± 5.2 <sup>a</sup>        | 8.5 ± 2.5                  | 9.2 ± 2.4    |
|                   | pNP-UGT*            | 15.1 ± 5.4 <sup>a,bb</sup>     | 9.3 ± 2.5                  | 7.5 ± 2.5    |
| GST               | CDNB*               | 295.5 ± 43.7 <sup>aa,bbb</sup> | 367.4 ± 29.4               | 417.0 ± 56.9 |
|                   | DCNB*               | 0.34 ± 0.06 <sup>bbb</sup>     | 0.33 ± 0.08 <sup>ccc</sup> | 0.56 ± 0.11  |

Tabella 4.2.10: Attività catalitiche degli enzimi di fase II<sup>#</sup> nei vitelloni di razza CH (n = 10), PM (n = 8) e BA (n = 7). I dati sono espressi come media ± DS.

<sup>#</sup>: nmoli/min/mg proteina

<sup>a,b,c</sup>Differenze statisticamente significative tra CH e PM, CH e BA, PM e BA, rispettivamente (ANOVA + post test di Tukey; a:  $p < 0.05$ ; bb:  $p < 0.01$ ; aaa, bbb, ccc:  $p < 0.001$ ).

\*Risultati Post-Dottorato Dott.ssa Monica Carletti

| Apoproteina             | Immunoblotting           |             |             |
|-------------------------|--------------------------|-------------|-------------|
|                         | CH                       | PM          | BA          |
| <b>CYP1A1/2</b>         | 2.92 ± 0.37              | 2.89 ± 0.76 | 2.70 ± 0.47 |
| <b>CYP2B1/2</b>         | 0.96 ± 0.23 <sup>b</sup> | 1.21 ± 0.33 | 1.34 ± 0.33 |
| <b>CYP2C8/9/19-2C12</b> | 0.81 ± 0.17              | 0.87 ± 0.16 | 0.95 ± 0.27 |
| <b>CYP3A1/2</b>         | 0.99 ± 0.43 <sup>b</sup> | 1.16 ± 0.37 | 1.63 ± 0.46 |

Tabella 4.2.11: Effetti della razza sull'espressione dell'apoproteina di alcuni CYP nel fegato di vitelloni CH, PM e BA. I valori della densitometria sono espressi in unità arbitrarie (u.a.) come media ± DS del rapporto tra la densità integrata di ogni gruppo (CH n = 10, PM n = 8, BA n = 7) e quella registrata nel controllo interno (R, microsomi epatici ottenuti da ratti di controllo).

<sup>b,c</sup>Differenze statisticamente significative tra CH e BA, PM e BA, rispettivamente (ANOVA + post test di Tukey; b:  $p < 0.05$ ).

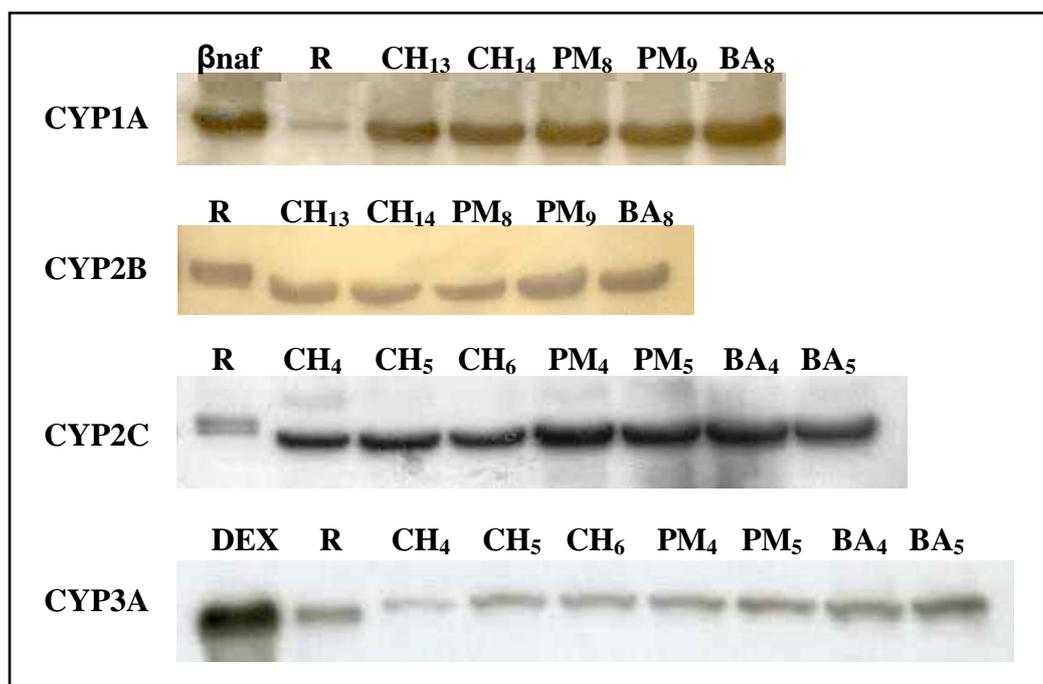


Figura 4.2.5: immagini rappresentative degli immunoblotting eseguiti in singolo su 30 µg di proteina microsomiale epatica appartenenti alle tre diverse razze, utilizzando anticorpi specifici per le isoforme CYP1A, CYP2B, CYP2C e CYP3A.

R = controllo interno, corrispondente a 10 µg di sospensione microsomiale epatica di ratti di controllo, utilizzato per la normalizzazione dei risultati nell'analisi densitometrica; βnaf e DEX = 5 µg di sospensione microsomiale epatica di ratti indotti con β-naftoflavone e desametasone, rispettivamente, utilizzati come controlli positivi.

| Geni           | Fold-change                    |                           |             |
|----------------|--------------------------------|---------------------------|-------------|
|                | CH                             | PM                        | BA          |
| <b>CYP1A1</b>  | 1.00 ± 0.35 <sup>aaa,bbb</sup> | 2.05 ± 0.50               | 2.05 ± 0.40 |
| <b>CYP1A2</b>  | 1.00 ± 0.54 <sup>a</sup>       | 1.73 ± 0.38               | 1.63 ± 0.61 |
| <b>CYP2B6</b>  | 1.00 ± 2.34 <sup>b</sup>       | 3.82 ± 3.28               | 4.77 ± 2.46 |
| <b>CYP2C8</b>  | 1.00 ± 1.89                    | 4.28 ± 3.34               | 2.41 ± 1.92 |
| <b>CYP2C9</b>  | 1.00 ± 0.52 <sup>aa,bb</sup>   | 3.34 ± 1.43               | 3.29 ± 1.35 |
| <b>CYP2C18</b> | 1.00 ± 0.29 <sup>bbb</sup>     | 1.33 ± 0.27 <sup>c</sup>  | 1.93 ± 0.5  |
| <b>CYP2C19</b> | 1.00 ± 0.84                    | 1.56 ± 1.01               | 1.00 ± 0.49 |
| <b>CYP2E1</b>  | 1.00 ± 1.52                    | 0.57 ± 0.70               | 1.47 ± 1.05 |
| <b>CYP3A4</b>  | 1.00 ± 0.37 <sup>b</sup>       | 1.32 ± 0.45               | 1.72 ± 0.46 |
| <b>UGT1A6</b>  | 1.00 ± 0.68 <sup>a,bb</sup>    | 0.36 ± 0.18               | 0.12 ± 0.10 |
| <b>UGT1A1</b>  | 1.00 ± 0.42 <sup>bb</sup>      | 1.02 ± 0.28 <sup>cc</sup> | 1.75 ± 0.37 |
| <b>UGT2B17</b> | 1.00 ± 0.22 <sup>bbb</sup>     | 1.26 ± 0.35 <sup>cc</sup> | 1.75 ± 0.22 |
| <b>GSTA1</b>   | 1.00 ± 0.41 <sup>a</sup>       | 1.75 ± 0.77               | 1.56 ± 0.48 |
| <b>GSTM1</b>   | 1.00 ± 0.60 <sup>a,bbb</sup>   | 3.85 ± 1.65               | 6.64 ± 3.61 |
| <b>GSTP1</b>   | 1.00 ± 0.23 <sup>b</sup>       | 1.13 ± 0.25               | 1.41 ± 0.31 |

Tabella 4.2.12: Quantificazione relativa di alcuni enzimi di fase I e II nel fegato di vitelloni di razza CH (n = 10), PM (n = 8) e BA (n = 7). I dati sono espressi come media ± DS dell'espressione dei singoli geni, rapportata a quella del gruppo CH, scelto arbitrariamente come controllo.

°: unità arbitrarie (U.A.).

<sup>a,b,c</sup>Differenze statisticamente significative tra CH e PM, CH e BA, PM e BA, rispettivamente (ANOVA + post test di Tukey; a, b:  $p < 0.05$ ; aa, bb, cc:  $p < 0.01$ ; aaa, bbb:  $p < 0.001$ ).

| Attività catalitica                | Gene           | $r_s$ § |        |        |
|------------------------------------|----------------|---------|--------|--------|
|                                    |                | CH      | PM     | BA     |
| <b>BPOH</b>                        | <b>CYP1A1</b>  | 0.50    | 0.71   | 0.43   |
|                                    | <b>CYP1A2</b>  | 0.83*   | 0.02   | 0.43   |
| <b>EROD</b>                        | <b>CYP1A1</b>  | 0.36    | 0.46   | 0.03   |
|                                    | <b>CYP1A2</b>  | 0.79*   | 0.21   | -0.25  |
| <b>16βOH-T</b><br><b>BENZDEM</b>   | <b>CYP2B6</b>  | -0.38   | 0.71   | 0.79*  |
|                                    |                | 0.05    | 0.74*  | 0.61   |
| <b>TBT4-OH</b>                     | <b>CYP2C8</b>  | 0.57    | -0.2   | -0.43  |
|                                    | <b>CYP2C9</b>  | 0.18    | -0.07  | -0.36  |
|                                    | <b>CYP2C18</b> | 0.37    | 0.54   | -0.46  |
|                                    | <b>CYP2C19</b> | 0.82*   | 0.25   | 0.20   |
| <b>APDEM</b>                       | <b>CYP2C8</b>  | 0.36    | -0.82* | -0.43  |
|                                    | <b>CYP2C9</b>  | 0.43    | -0.43  | -0.36  |
|                                    | <b>CYP2C18</b> | 0.50    | -0.07  | -0.46  |
|                                    | <b>CYP2C19</b> | 0.71    | 0.09   | 0.20   |
| <b>Aniline-OH</b><br><b>pNP-OH</b> | <b>CYP2E1</b>  | 0.43    | 0.51   | -0.94* |
|                                    |                | 0.29    | 0.14   | -0.54  |
| <b>6βOH-T</b>                      |                | 0.57    | 0.32   | 0.29   |
| <b>2βOH-T</b>                      |                | 0.55    | 0.32   | 0.29   |
| <b>ERDEM</b>                       | <b>CYP3A4</b>  | 0.18    | -0.10  | 0.52   |
| <b>ETDEM</b>                       |                | 0.22    | -0.29  | -0.25  |
| <b>TAODEM</b>                      |                | -0.05   | -0.05  | 0.64   |
| <b>αN-UGT</b><br><b>pNP-UGT</b>    | <b>UGT1A1</b>  | -0.22   | -0.68  | -0.50  |
|                                    |                | -0.17   | -0.43  | -0.39  |
| <b>αN-UGT</b><br><b>pNP-UGT</b>    | <b>UGT1A6</b>  | 0.07    | -0.25  | 0.29   |
|                                    |                | 0.50    | -0.43  | 0.46   |
| <b>CDNB</b>                        | <b>GSTA1</b>   | 0.49    | 0.12   | 0.21   |
| <b>CDNB</b>                        | <b>GSTM1</b>   | -0.35   | 0.82*  | 0.83   |
| <b>DCNB</b>                        |                | 0.17    | 0.89*  | 0.38   |
| <b>CDNB</b>                        | <b>GSTP1</b>   | 0.32    | -0.02  | 0.36   |

Tabella 4.2.13: Risultati della correlazione non parametrica di Spearman tra l'attività catalitica e l'espressione genica nei vitelloni di razza CH (n = 10), PM (n = 8) e BA (n = 7).

§:  $r_s$  corrisponde al coefficiente di correlazione non parametrico di Spearman (range tra -1 e +1; considerato significativo per  $p < 0.05$ ).

\*:  $p < 0.05$

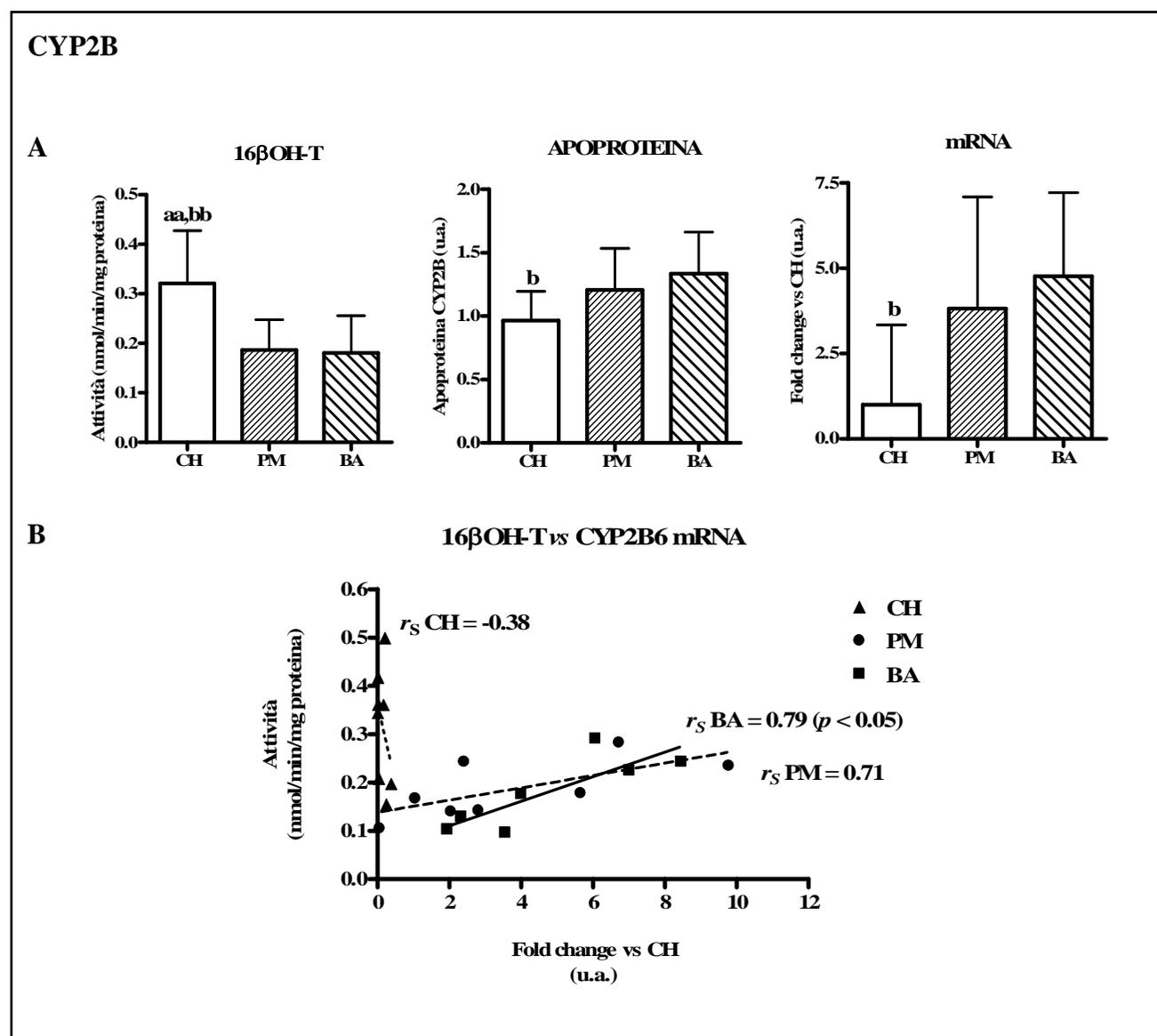


Figura 4.2.6: Espressione di CYP2B (A) a livello di attività catalitica (16 $\beta$ OH-T), proteina e mRNA e (B) correlazione tra attività catalitica ed espressione genica ( $r_s$  = coefficiente di correlazione non parametrico di Spearman, valori compresi tra -1 e +1, significativo per  $p < 0.05$ )

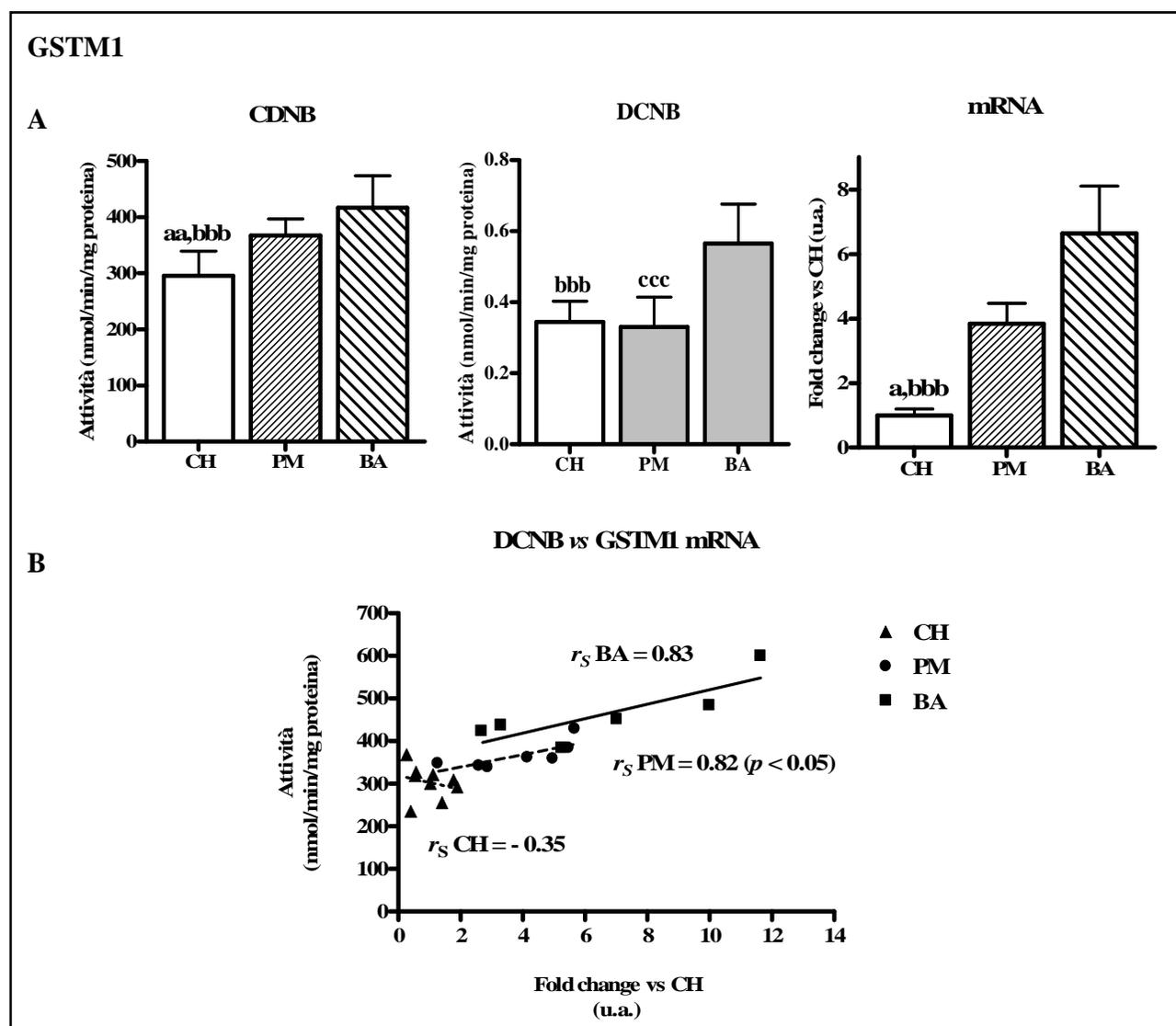


Figura 4.2.7: Espressione di GSTM1 (A) a livello di attività catalitica (CDNB e DCNB) e mRNA e (B) correlazione tra attività catalitica ed espressione genica ( $r_s$  = coefficiente di correlazione non parametrico di Spearman, valori compresi tra -1 e +1, significativo per  $p < 0.05$ )

### 4.3. DISCUSSIONE

Gli studi riguardanti l'espressione degli enzimi biotrasformativi che ad oggi si rinvengono in letteratura nei Ruminanti, sono rivolti, nello specifico, alla valutazione dell'attività catalitica e del contenuto di apoproteina (Nebbia *et al.*, 2003; Machala *et al.*, 2003; Sivapathasundaram *et al.*, 2003b; Szotáková *et al.*, 2004); al contrario, si ritrovano poche pubblicazioni concernenti l'espressione degli enzimi biotrasformativi a livello pre-trascrizionale (Greger *et al.*, 2006; Cantiello *et al.*, 2005). Inoltre è noto che, nell'ambito del "Drug metabolism" (DM), la capacità biotrasformativa complessiva può essere modulata non solo nell'uomo e nelle specie da laboratorio (di solito utilizzate come modello animale di riferimento), ma anche nelle specie di interesse veterinario, oltre che da fattori estrinseci (fenomeni di induzione ed inibizione enzimatica), anche da una serie di fattori costitutivi, quali l'età, il sesso, la razza e condizioni fisio-patologiche come la gravidanza (Nebbia *et al.*, 2004; Dacasto *et al.*, 2005; Gusson *et al.*, 2006). In questo lavoro per la prima volta sono stati valutati gli effetti della razza sugli enzimi biotrasformativi (DMEs) non solo a livello post-traduzionale, ma anche a livello pre-trascrizionale; sono state per questo motivo prese in considerazione tre diverse razze bovine da carne di rilevante interesse nel nostro Paese.

Per quanto concerne la parte più innovativa di questo approccio sperimentale, vale a dire la valutazione dell'espressione genica, è stato messo a punto un *set* di saggi in Q RT-PCR comprendenti i DMEs maggiormente coinvolti nel metabolismo ossidativo e coniugativo nel bovino (CYPs, UGTs e GSTs). Nel complesso, sono stati messi a punto dei saggi caratterizzati da una buona specificità ed efficienza di amplificazione (compresa nel *range* di accettabilità) che, abbinati ad una scelta oculata del gene *housekeeping* (ACTB in questo caso), hanno permesso la quantificazione relativa dei campioni epatici oggetto di analisi. Nello specifico infatti, adottando degli accorgimenti mirati descritti nella sezione Materiali e Metodi, sono stati messi a punto dei saggi che hanno permesso l'amplificazione del solo gene *target*, escludendo quella del potenziale DNA genomico contaminante e la sintesi di dimeri di *primers*, fattori entrambi da escludersi nel caso in cui si lavori con il fluoroforo SybrGreen. Inoltre, l'analisi delle curve di *melting* di ogni singolo campione, nonché l'amplificazione mediante PCR *end-point*, hanno permesso di confermare la sintesi di un solo amplicone della temperatura di *melting* e della lunghezza attese.

La purezza e l'integrità dell'RNA sono cruciali negli studi che propongono di quantificarne l'espressione genica, pertanto queste stesse caratteristiche sono state valutate nei campioni di estratto oggetto di analisi. Dalla lettura al NanoDrop, è stato evidenziato che complessivamente i campioni di RNA erano caratterizzati da una buona purezza (rapporti  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$  superiori a 1.8), mentre dall'elettroforesi in gel di agarosio e dall'analisi randomizzata mediante Bioanalyser, si è riscontrata una parziale ma accettabile degradazione dello stesso. Questo risultato è probabilmente riconducibile alla fase di campionamento, durante la quale le aliquote di fegato sono state raccolte a distanza di circa 30-60 minuti dal sacrificio dell'animale, ma fortunatamente non hanno precluso l'analisi degli estratti.

Per quanto riguarda invece la valutazione semiquantitativa del contenuto di apoproteina in microsomi epatici mediante immunoelettroforesi e densitometria, è stato evidenziato che le concentrazioni di anticorpi

primari e secondari, messe a punto contestualmente nel nostro laboratorio, hanno permesso di identificare una sola banda con uno scarso rumore di fondo (reazioni aspecifiche). Tale risultato è però ristretto a quattro delle cinque isoforme di CYP prese in considerazione (CYP1A, CYP2B, CYP2C e CYP3A); nel caso del CYP2E, pur saggiando diverse concentrazioni di anticorpo primario e secondario, non è stato possibile definire delle condizioni ottimali di lavoro, a causa della scarsa cross-reattività dell'anticorpo primario impiegato nei confronti della proteina bovina. A tale proposito, è necessario qui specificare che gli anticorpi utilizzati nel presente studio non erano bovino-specifici (non ancora disponibili in commercio), bensì prodotti a partire da antigeni umani o appartenenti alle specie da laboratorio (ratto). Sebbene l'elevata identità nella sequenza aminoacidica dei diversi CYP tra le diverse specie consente, in genere, ad un anticorpo di cross-reagire con proteine presenti in altre specie diverse da quelle specie-specifiche, purtroppo non garantisce che le diverse isoforme di CYP possiedano sempre epitopi simili e quindi riconoscibili. Per questo motivo, è necessario prestare particolare attenzione nella valutazione dei dati ottenuti utilizzando anticorpi non specie-specifici.

La stessa cautela deve essere applicata anche nel caso dell'attività catalitica poiché anche in questo caso vengono utilizzati per il bovino substrati modello specifici per determinate isoforme enzimatiche, che però sono stati validati a seguito di studi condotti in uomo o in specie da laboratorio. Per applicare con sicurezza i substrati *marker* conosciuti anche in altre specie sarebbe necessario sottoporli a validazione, ma purtroppo al momento in letteratura si rinvengono pochi studi mirati alla definizione delle costanti della cinetica di reazione ( $K_m$  e  $V_{max}$ ) nella specie bovina (Sivapathasundaram *et al.*, 2001; Pegolo *et al.*, 2007).

I substrati che solitamente vengono impiegati per monitorare l'attività catalitica CYP1A-dipendente in uomo, specie da laboratorio ed anche nel bovino sono il benzo[a]pirene e l'etossiresorufina; è noto che quest'ultima è addirittura metabolizzata maggiormente nel bovino rispetto al ratto (Nebbia *et al.*, 2003; Ioannides, 2006). In quest'ultima specie, l'attività di EROD è maggiormente ascrivibile al CYP1A1, sebbene sia stato ipotizzato un coinvolgimento anche di CYP1A2, anche se in misura meno rilevante rispetto a CYP1A1. I risultati dell'attività catalitica e dell'espressione proteica ottenuti in questo lavoro, appaiono dello stesso ordine di grandezza di quelli precedentemente pubblicati (Nebbia *et al.*, 2003; Szotáková *et al.*, 2004; Sivapathasundaram *et al.*, 2001). La più elevata attività di EROD riscontrata nel bovino però, potrebbe essere imputabile ad una maggiore espressione e conseguente compartecipazione del CYP1A1, un'isoforma nota per la sua localizzazione extra-epatica ed inducibilità a livello epatico (Sivapathasundaram *et al.*, 2001); a tal proposito, in questo lavoro, è stata confermata mediante Q RT-PCR l'espressione genica costitutiva del CYP1A1, sebbene i coefficienti di correlazione tra le attività catalitiche e l'abbondanza relativa di mRNA delle isoforme CYP1A1 e CYP1A2 risultino più elevati per la seconda isoforma. Sono state inoltre riscontrate delle differenze legate alla razza nell'espressione delle isoforme CYP1A1 e CYP1A2, confermando i dati precedentemente pubblicati e relativi a diverse razze murine (Casley *et al.*, 1997).

La *N*-demetilazione della benzfetamina e l'idrossilazione del TST in posizione 16 $\alpha$  rappresentano le attività catalitiche CYP2B-dipendenti solitamente utilizzate in uomo e ratto, rispettivamente (Wang *et al.*, 2006; Ioannides, 2006). Per l'uomo e il bovino è riportato che, contrariamente a quanto visto nel topo, questa

isoforma risulterebbe solo marginalmente coinvolta nell'idrossilazione del TST (Ioannides, 2006; Sivapathasundaram *et al.*, 2001); recentemente, peraltro, è stato evidenziato che microsomi epatici di vitelli a carne bianca sono in grado di produrre, oltre a 6 $\beta$ - e 2 $\beta$ -OH TST, anche quantità rilevabili di 16 $\beta$ -OH TST (Capolongo *et al.*, 2003). A conferma di quanto sopra riportato, è stato anche rinvenuto un incremento pari a 3 volte della produzione di 16 $\beta$ OH TST in microsomi epatici di vitelloni indotti con PB (Cantiello *et al.*, 2006), un induttore specifico del CYP2B10 nel topo consecutivamente all'attivazione del CAR (Peffer *et al.*, 2007). Nel nostro lavoro, è stato evidenziato che le attività catalitiche CYP2B-dipendenti sono chiaramente e significativamente più elevate nella razza CH. L'immuno-elettroforesi invece, effettuata utilizzando un anticorpo policlonale anti-CYP2B1/2 di ratto, come precedentemente riportato in letteratura da Nebbia *et al.* (2003) e Sivapathasundaram *et al.* (2001), ha permesso di ottenere dei risultati significativi che concordano perfettamente con il profilo di espressione del CYP2B6, ma non con le attività catalitiche misurate, anche se è stata riscontrata una buona correlazione tra l'attività 16 $\beta$ OH-T e l'espressione genica del CYP2B6 (specialmente nei vitelloni BA), che confermerebbe i risultati riportati nel topo da Peffer e collaboratori nel 2007.

Considerando invece il CYP2C, sono stati scelti quali substrati *marker* la tolbutamide e l'aminopirina, poiché le attività TBT4-OH e APDEM sono già state misurate nel bovino; nello specifico, la TBT4-OH è ascrivibile nell'uomo all'attività del CYP2C9, mentre APDEM ad un generico coinvolgimento della sottofamiglia CYP2C (Ioannides *et al.*, 2006; Muto *et al.*, 1997; Sakuma *et al.*, 1995). La razza non sembra apparentemente influenzare l'attività catalitica CYP2C-dipendente ed il contenuto di apoproteina, come anche confermato dalla correlazione tra l'attività catalitica e l'espressione proteica (dati non riportati).

Per l'immuno-elettroforesi, è stato scelto un anticorpo policlonale che riconosce come una singola banda diverse isoforme di CYP2C (2C8/9/19 di uomo e 2C12 di ratto); tale anticorpo è stato utilizzato con successo anche nel topo, ma, anche in questo caso, i dati ottenuti dall'immuno-elettroforesi non sono risultati essere ben correlabili con nessuna delle attività CYP2C-dipendenti selezionate dagli autori (Löfgren *et al.*, 2004). Considerando invece l'espressione genica, nel presente lavoro sono state evidenziate delle differenze statisticamente significative tra le razze in tutte le isoforme del CYP2C selezionate, ad eccezione del CYP2C19.

Per quanto riguarda l'analisi della correlazione, la TBT4-OH è risultata essere correlata significativamente con il trascritto CYP2C19, mentre l'APDEM con CYP2C8, contrariamente a quanto riportato in letteratura. A giustificazione di questo risultato però, occorre sottolineare che i substrati modello vengono generalmente classificati in base alla specificità nei confronti di isoforme umane o di ratto e, sfortunatamente, un substrato che viene metabolizzato in modo specifico da una certa isoforma nelle specie di riferimento può andare incontro ad un diverso destino metabolico in altre, con una conseguente variazione nella selettività del CYP (Sztótková *et al.*, 2004). Ad esempio l'aminopirina in alcuni casi è considerata un substrato specifico per il CYP2C, in altri un substrato *marker* generico, perché può essere metabolizzata da diversi CYP, tra cui CYP2D1 (Hanioka *et al.*, 1998), CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2D e CYP3A nel ratto (Hari Kumar and Kuttan, 2006) o CYP2B1 e CYP3A nel topo (Kim *et al.*, 2007); in questo caso, la sua biotrasformazione è

risultata essere significativamente correlabile con il CYP2C8. Per tutti questi motivi, è necessario approfondire le conoscenze sul CYP2C, identificare le sequenze bovine delle diverse isoforme appartenenti a questa sottofamiglia e chiarire il loro coinvolgimento nel metabolismo dei farmaci, attraverso l'utilizzo di vettori di espressione ed ulteriori substrati modello.

Diverse attività CYP2E-dipendenti del ratto sono state misurate anche nel bovino e tra queste si includono pNP-OH e Aniline-OH (Ioannides, 2006). I risultati riportati in questo lavoro sono dello stesso ordine di grandezza di quelli riportati da Nebbia *et al.* (2003), e sono indicativi di differenze nell'attività catalitica tra le razze oggetto di studio. Per quanto riguarda invece l'immuno-elettroforesi, è stata notata una scarsa cross-reattività dell'anticorpo utilizzato, che ha impedito l'analisi densitometrica e, conseguentemente, la correlazione tra attività catalitica ed espressione della proteina CYP2E1; d'altra parte, nelle specie veterinarie sono già stati riportati risultati contrastanti in termini di cross-reattività, numero di bande ottenute e concordanza con le corrispondenti attività catalitiche, a seguito dell'utilizzo di anticorpi anti-CYP2E1 di uomo e ratto (Machala *et al.*, 2003; Nebbia *et al.*; Szotáková *et al.*, 2004; Ioannides, 2006). A livello di mRNA, non sono state evidenziate differenze tra le razze, a causa dell'alta variabilità inter-individuale riscontrata. Degno di nota è il coefficiente di correlazione calcolato tra l'espressione genica e l'Aniline-OH (significativo per BA), che potrebbe indirettamente confermare quest'ultimo come un substrato specifico per il CYP2E anche nel bovino; questa isoforma infatti appartiene ad una delle sottofamiglie maggiormente conservate e le proteine ortologhe corrispondenti spesso dimostrano la stessa specificità di substrato (Ioannides, 2006).

Per quanto riguarda il CYP3A, le attività 6 $\beta$ OH-T e 2 $\beta$ OH-T misurate mediante metodica HPLC evidenziano differenze statisticamente significative tra le razze oggetto di studio, a differenza delle attività catalitiche ERDEM, ETDEM e TAODEM, misurate spettrofluorimetricamente. Questi risultati contrastanti sono parzialmente in disaccordo con quelli riportati da Dacasto *et al.* (2005), in cui invece si evidenziano delle differenze tra i vitelloni PM e Limousine (LIM) per ERDEM, ETDEM e 2 $\beta$ OH-T. Considerando i dati ottenuti per la PM, l'unica razza studiata in entrambi i lavori, si è potuto notare che solo nel caso di ERDEM sia il protocollo impiegato sia i risultati ottenuti fossero molto simili e paragonabili tra i due studi. Nel caso invece di ETDEM, 6 $\beta$ OH-T e 2 $\beta$ OH-T sono state evidenziate delle differenze di tipo metodologico a giustificazione delle discrepanze ottenute: una diversa concentrazione finale di etilmorfina (6 mM in questo lavoro; 1 mM nel precedente); la diversa sensibilità dello strumento impiegato per misurare la formaldeide liberata (lo spettrofluorimetro in questo lavoro e lo spettrofotometro nel precedente); la diversa tecnica impiegata per la quantificazione degli idrossilati del TST (HPLC, più sensibile ed accurato, con costruzione delle curve di calibrazione per 6 $\beta$ - e 2 $\beta$ OH TST in questo lavoro e *thin layer chromatography* con valutazione densitometrica semiquantitativa di *spots* radioattivi senza la preparazione di curve di calibrazione, nel secondo).

A tal proposito, l'analisi della correlazione tra le attività catalitiche e l'espressione genica di CYP3A4 ha evidenziato dei migliori coefficienti di correlazione per le attività in HPLC, indicando indirettamente il TST come un substrato più sensibile e specifico per la valutazione dell'espressione del CYP3A nel bovino.

L'immuno-elettroforesi, che ha previsto l'utilizzo dello stesso anticorpo anti-CYP3A1/2 di ratto citato da Nebbia *et al.* (2003), ha fornito risultati contraddittori se confrontati con quelli dell'attività catalitica (e in accordo con quanto riportato da Dacasto *et al.*, 2005, in cui si evince che la razza PM pur avendo un'attività catalitica superiore rispetto alla LIM presentava invece un contenuto di apoproteina inferiore) ma in linea invece con quelli dell'espressione genica di CYP3A4.

Per gli enzimi di fase II, sono stati scelti i substrati specifici per la famiglia UGT1A utilizzati nell'uomo ( $\alpha$ -naftolo e *p*-nitrofenolo), che sono già stati peraltro impiegati nel bovino (Gusson *et al.*, 2006). Entrambi i substrati vengono maggiormente metabolizzati nella CH rispetto alle altre razze. Questi risultati sono in linea con i livelli di espressione dell'UGT1A6 ma contrastano con quelli ottenuti per UGT1A1. Inoltre, le attività catalitiche ed i profili di espressione genica non risultano correlabili. Curiosamente, l'isoforma UGT2B17, coinvolta nella specie umana nella coniugazione degli steroidi (Xu *et al.*, 2004), è risultata altamente espressa nella BA, così come si evidenzia per UGT1A1. Tali risultati possono essere giustificati dal fatto che molte isoforme di UGT, che in parte includono quelle scelte per questo lavoro e per le quali erano disponibili le sequenze nelle banche dati, dimostrano un'elevata sovrapposizione di specificità di substrati (Nagar and Remmel, 2006). A conferma di quanto sopra descritto, anche nel topo, la specie maggiormente studiata in questo ambito ed utilizzata come specie di riferimento, è stata evidenziata una carenza di specificità di anticorpi e substrati *marker* per le UGT (Kato *et al.*, 2005).

Oggi giorno, nei mammiferi sono conosciute sette classi di GST citosoliche, classificate sulla base dell'identità di sequenza aminoacidica/nucleotidica, struttura genica e proprietà immunoreattive; vengono identificate con le lettere greche alfa, mu, pi greco (GST specifiche) e sigma, teta, zeta e omega (GST comuni). Considerando la loro nota sovrapposizione di specificità per i substrati, CDNB è di solito considerato un substrato generico per tutte le isoforme di GST, mentre DCNB è riconosciuto come substrato specifico per l'isoforma mu in ratto, topo, uomo e coniglio (Gusson *et al.*, 2006). In questo studio, la BA presenta tra le razze selezionate la più efficiente capacità biotrasformativa, in contrasto con i risultati ottenuti invece per i diversi CYP e per le UGT; questo comportamento è stato confermato anche a livello pre-trascrizionale per tutte e tre le isoforme citosoliche esaminate. Inoltre, è stato evidenziato che l'espressione genica di GSTM1 è correlata in modo significativo con l'attività catalitica nei confronti di entrambi i substrati nella PM. Sulla base delle informazioni tuttora disponibili, questo lavoro rappresenta il primo studio in cui sono stati valutati i profili di espressione genica delle GST nel bovino ed i dati ottenuti sono anche indicativi di differenze tra le razze, come è già stato peraltro dimostrato nel ratto (Jang *et al.*, 2001).

Nel complesso, i dati ottenuti in questo lavoro dimostrano che effettivamente la razza è in grado di modulare l'espressione degli enzimi biotrasformativi nel bovino cosiccome nelle specie da laboratorio, già ampiamente studiate (Casley *et al.*, 1997; Löfgren *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2004; Stott *et al.*, 2004); tuttavia, i risultati non univoci raccolti suggeriscono che al momento non è possibile stabilire se tale effetto intervenga a livello pre-trascrizionale o post-traduzionale o addirittura a livello post-trascrizionale (fase che non è stata oggetto del presente lavoro).

Comunque, i risultati qui ottenuti rappresentano un piccolo passo in avanti nell'acquisizione di informazioni sul DM nelle specie di interesse veterinario ed assumono anche una certa importanza, visto che recentemente è stato dimostrato che differenze nell'espressione dei DMEs possono influenzare sia la biodisponibilità, sia l'efficacia terapeutica dei farmaci (Sallovitz *et al.*, 2002); tale aspetto è di notevole rilievo soprattutto nel caso di farmaci somministrati ad animali da reddito, per la potenziale presenza nelle derrate di origine animale di residui pericolosi per la salute del consumatore.

Per molti degli enzimi biotrasformativi considerati, la razza CH ha comparativamente dimostrato di essere la razza che presenta la più bassa espressione a livello genico e proteico, ma, al contrario, la più elevata attività catalitica, a parità di contenuto di proteina microsomiale e citosolica, CYP e GSH.

Una possibile spiegazione per questo comportamento potrebbe essere la maggior efficienza del ciclo catalitico nella suddetta razza, un'ipotesi giustificata dall'alta attività catalitica di NADPH-R riscontrata in questo stesso gruppo; a tal proposito, un simile comportamento è stato infatti evidenziato per il CYP3A nel cavallo (Tydén *et al.*, 2007): questi autori hanno dimostrato che tessuti in cui l'espressione genica e proteica del CYP3A risultavano basse presentavano una spiccata attività catalitica CYP3A-dipendente associata ad una altrettanto elevata attività della NADPH-R e del citocromo b5. Sulla base delle conoscenze ad oggi acquisite, infatti, è noto che la NADPH-R rappresenta una componente indispensabile per il corretto funzionamento del ciclo catalitico del CYP e che alte concentrazioni di quest'ultima favoriscono l'attività catalitica, in quanto fornisce elettroni al CYP stesso (Nakajima *et al.*, 2002; Schenkman and Jansson, 2003; Wu *et al.*, 2005); inoltre, è noto anche che il citocromo b5 può aumentare l'attività catalitica del CYP facilitando il trasferimento di elettroni al ciclo catalitico ed a maggior ragione può velocizzarne il *turnover*, senza necessariamente essere coinvolto nel trasferimento degli elettroni (Nakajima *et al.*, 2002; Schenkman and Jansson, 2003; Yamazaki *et al.*, 1996).

Un'altra possibile spiegazione può essere data dalla presenza di effetti post-traduzionali, come la fosforilazione delle proteine, dimostrata essere in grado di modulare l'attività del CYP, nonché la sua specificità nei confronti di substrati modello (Oesch-Bartlomowicz and Oesch, 2005). Questi autori infatti hanno evidenziato che il CYP2B ed il CYP2E possono essere fosforilati dalla protein chinasi A (PKA) e che questa reazione dipende dalla presenza di residui fosforilabili di serina, localizzati nella sequenza del CYP riconosciuta dalla PKA stessa. La presenza di polimorfismi nella sequenza proteica del CYP può indirettamente influenzare l'attività della PKA: infatti, se nel *wild-type* la sequenza riconosciuta dalla PKA non è disponibile, quest'ultima effettuerà la fosforilazione in un altro sito del CYP o in un'altra molecola che interviene nel ciclo, determinando così o una variazione in termini quantitativi della stessa risposta (maggiore o minore attività rispetto al *wild-type*) o una diversa specificità di substrato.

Inoltre, in letteratura è riportato che i CYP possono essere regolati, oltre che da fattori di trascrizione, anche da effetti post-trascrizionali. Recentemente, Tsuchiya *et al.* (2006) hanno descritto per la prima volta che i microRNA modulano anche l'azione dei DMEs, come per esempio il CYP1B1: alti livelli di espressione della proteina CYP1B1 in tessuti tumorali infatti possono essere dovuti ad un'inibizione

dell'espressione di un particolare microRNA, denominato miR-27b. Tuttavia, al momento attuale non sono ancora stati identificati i geni *target* dei singoli microRNA.

Infine, l'ipotetica presenza di polimorfismi genetici (SNPs) nelle sequenze dei DMEs non dovrebbe essere esclusa *a priori*; recentemente infatti un incremento dell'attività metabolica riscontrata nella razza CH rispetto alla German Holstein è stata attribuita alla presenza di SNPs in alcuni geni funzionali epatici ed intestinali (Schwerin *et al.*, 2006). E' stato anche ampiamente documentato in umana che differenze tra le razze, imputabili alla presenza di polimorfismi genetici, sono la causa di un diverso *pattern* di biotrasformazione nei confronti dello stesso substrato (Ingelman-Sundberg, 2002).

A questo proposito, in futuro nel nostro laboratorio verranno condotti degli studi atti a sequenziare i maggiori DMEs nelle tre razze oggetto di studio, nonché gli enzimi coinvolti nel ciclo catalitico (per esempio NADPH-R) per identificare eventuali polimorfismi genetici, potenziale causa delle discrepanze osservate tra l'attività catalitica e l'espressione genica.



***ESPRESSIONE DEGLI ENZIMI BIOTRASFORMATIVI  
E DI ALCUNI FATTORI DI TRASCRIZIONE  
NEL FEGATO DI BOVINI TRATTATI A SCOPO ILLECITO  
CON DESAMETAZONE E 17B-ESTRADIOLO***



## 5.1. MATERIALI E METODI

### Campioni biologici

I campioni biologici utilizzati in questo esperimento sono stati raccolti nel corso di due diverse prove sperimentali.

La prima sperimentazione, denominata “DEX”, è stata condotta su 24 vitelloni maschi di razza Marchigiana. All’arrivo presso l’Azienda Agricola “Caron” di Brugine (PD), Stabilimento utilizzatore dell’IZS delle Tre Venezie, gli animali avevano un’età di 14-16 mesi e pesavano circa 500 kg. Per tutta la durata della sperimentazione (63 giorni) gli animali sono stati alimentati con *unifeed ad libitum*. Inoltre l’accesso all’acqua di abbeverata era libero ed ogni *box* era provvisto di due bacinelle a pressione.

I vitelloni sono stati pesati, suddivisi in 3 gruppi sperimentali e dopo 9 giorni di accasamento sono stati sottoposti ai seguenti trattamenti:

- Gruppo T<sub>PD</sub> (n = 9): trattati quotidianamente *per os* per 54 giorni con 0.75 mg/capo/giorno di desametazone 21 fosfato sodico (DEX: Desashock<sup>®</sup>, Fort Dodge Animal Health, USA);
- Gruppo B<sub>PD</sub> (n = 6): a questi soggetti sono stati somministrati per 2 volte per via intramuscolare (IM) a distanza di 21 gg, 1.32 g/capo di DEX;
- Gruppo K<sub>PD</sub> (n = 9): controllo (nessun trattamento).

Il Desashock<sup>®</sup> era somministrato *per os* con apposite cialde. In ogni cialda veniva posto dello zucchero comune e poi, con l’uso di una micropipetta Eppendorf<sup>®</sup> (Germania) veniva aggiunto il volume corrispondente a 0.75 mg di DEX. La cialda veniva poi somministrata ad ogni animale mediante sparaboli.

Gli animali sono stati macellati presso il macello Montelliana di Villaverla (VI) 2 giorni dopo la fine del trattamento *per os* e 16 giorni dopo l’ultimo trattamento IM.

La seconda sperimentazione, definita “DEX+E<sub>2</sub>”, invece è stata condotta su 18 vitelloni maschi, nati da incroci tra razze francesi da carne e stabulati presso la stessa azienda agricola per una durata di 6 settimane.

I vitelloni di 15-18 mesi di età e di peso compreso tra 392 e 542 kg, sono stati divisi in 3 gruppi, ciascuno comprendente 6 animali, e poi collocati in *box* multipli (comprendenti ciascuno 3 bovini) provvisti di pavimentazione con lettiera permanente. La suddivisione è avvenuta sulla base del peso iniziale degli animali in modo tale da ottenere la maggior omogeneità possibile tra i diversi gruppi e all’interno di ciascun *box*.

Gli animali sono stati così suddivisi:

- D<sub>de</sub> (n = 6): trattati quotidianamente *per os* per 43 giorni con 0.75 mg/capo/giorno di DEX disciolto in 0.5 L/capo di acqua ed irrorato omogeneamente sulla superficie dell’*unifeed* immediatamente dopo la distribuzione di quest’ultimo;
- DE<sub>de</sub> (n = 6): trattati con DEX *per os* secondo lo stesso dosaggio indicato per il gruppo D<sub>de</sub> e con estradiolo benzoato (E<sub>2</sub>, Estradiolo AMSA<sup>®</sup>) per via IM, alla dose di 20 mg/capo di principio attivo per 3 volte, rispettivamente il 1°, 15° e 30° giorno dall’inizio della sperimentazione;

- $K_{de}$  (n = 6): controllo (nessun trattamento); si è proceduto comunque ad irrorare la superficie dell'*unifeed* con 0.5 L/capo di acqua pura.

La dieta degli animali era costituita da *unifeed* (silomais, farina di mais, polpe di bietola, crusca, soia, melasso e paglia) somministrato in modo razionato (13.6 kg/capo/giorno *tal quale*) e l'accesso all'acqua era libero (due abbeveratoi per *box*).

Gli animali sono stati macellati presso il macello comunale "Longhin" di Piove di Sacco (PD) il giorno dopo la fine del trattamento *per os* e 14 giorni dopo l'ultimo trattamento IM.

In sede di macellazione degli animali di entrambe le sperimentazioni, è stato rimosso il lobo caudato epatico, da cui sono state prelevate in sterilità delle aliquote di circa 100 mg per l'estrazione del mRNA, poste immediatamente in tubi contenenti RNAlater<sup>®</sup> e poi stoccate a -80°C fino all'utilizzo.

#### **Estrazione RNA totale da campioni di fegato**

E' stata utilizzata la medesima procedura riportata a pagina 106.

Le uniche modifiche apportate sono state le seguenti:

- poiché i campioni di fegato erano stati precedentemente stoccati a -80°C in presenza di RNAlater<sup>®</sup>, al momento dell'estrazione dell'RNA, sono stati scongelati in ghiaccio, posti in microtubi Lysing Matrix D raffreddati in ghiaccio e poi subito processati;
- sono stati effettuati due lavaggi successivi in etanolo 70-75% per rimuovere i residui di RNAlater<sup>®</sup>

#### **Valutazione qualitativa e quantitativa dell'estratto:**

##### **Elettroforesi su gel di agarosio all'1% e lettura al NanoDrop**

E' stata utilizzata la medesima procedura riportata a pagina 107.

#### **Trascrizione inversa (RT)**

E' stato seguito lo stesso protocollo riportato a pagina 109.

**Selezione geni target**

Nella Tabella 5.1.1, sono riportati i geni che sulla base della ricerca bibliografica sono risultati coinvolti nel metabolismo ossidativo e coniugativo delle molecole oggetto di analisi, nonché nella regolazione degli stessi enzimi e che pertanto sono state scelti per le successive analisi.

| <b>Gene target</b> | <b>Nome</b>   | <b>ID GenBank</b>  |
|--------------------|---|--------------------|
| CYP1A1             | Citocromo P450 1A1                                    | XM_588298          |
| CYP1A2             | Citocromo P450 1A2                                    | XM_591450          |
| CYP2B6             | Citocromo P450 2B6                                    | NM_001075173       |
| CYP2C9             | Citocromo P450 2C9                                    | XM_612374          |
| CYP2E1             | Citocromo P450 2E1                                    | NM_174530          |
| CYP3A4             | Citocromo P450 3A4                                    | NM_174531          |
| UGT1A1             | UDP glucuronosil-transferasi 1A1                      | DQ115935           |
| UGT2B17            | UDP glucuronosil-transferasi 2B17                     | NM_001075724       |
| GSTA1              | Glutazione-S-transferasi A1                           | NM_001078149       |
| GSTP1              | Glutazione-S-transferasi P1                           | NM_177516          |
| SULT1A1            | Sulfotransferasi 1A1                                  | NM_177521          |
| CAR                | <i>Constitutive androstan receptor</i>                | NM_001079768       |
| PXR                | <i>Pregnan X receptor</i>                             | XM_582516          |
| RXR $\alpha$       | <i>Retinoid X receptor</i> isoforma $\alpha$          | XM_881943          |
| HNF4 $\alpha$      | <i>Hepatocyte nuclear factor 4<math>\alpha</math></i> | NM_001015557       |
| GR                 | Recettore glucocorticoidi                             | ENSBTAT00000025941 |
| ER $\alpha$        | Recettore estrogeni isoforma $\alpha$                 | ENSBTAT00000009422 |

Tabella 5.1.1: Lista dei geni bovini selezionati per il saggio di *Real Time PCR*.

**Scelta dei primers**

Nella progettazione dei *primers* sono state seguite le stesse indicazioni riportate a pagina 111.

**Real Time PCR (Q RT-PCR)**

E' stato seguito lo stesso protocollo riportato a pagina 112. In aggiunta rispetto al precedente esperimento sulle razze bovine, sono stati messi a punto i saggi relativi ai geni CAR, PXR, RXR $\alpha$ , HNF4 $\alpha$ , GR ed ER $\alpha$ .

**Analisi dei dati ed analisi statistica**

I dati ottenuti dalla Q RT-PCR sono espressi come media  $\pm$  DS (Allegato 2).

Inizialmente, i dati di espressione genica ottenuti dalla quantificazione relativa, sono stati oggetto di analisi per l'identificazione degli *outliers* mediante l'utilizzo del test statistico di Grubbs, chiamato anche metodo *extreme studentized deviate*.

Successivamente, l'analisi statistica per evidenziare differenze tra i gruppi di controllo e quelli sottoposti a trattamento, è stata eseguita dal programma Graph Pad InStat 2.01 (San Diego, CA, USA), utilizzando il test statistico ANOVA (*one-way Analysis of Variance*). In caso di variazioni significative è stato eseguito il post-test di Tukey (*Tukey-Kramer multiple comparisons test*). Eventuali differenze tra i gruppi sono state considerate significative solo per valori di  $p < 0.05$ .

## 5.2. RISULTATI

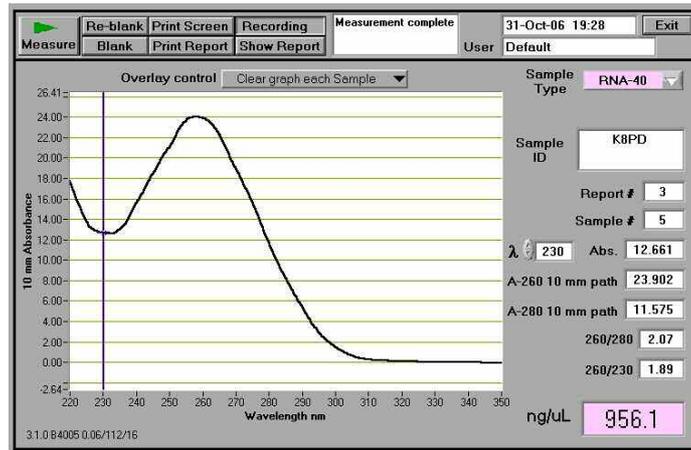
**Valutazione qualitativa e quantitativa dell'estratto**

La qualità dell'RNA estratto è stata valutata per tutti i campioni mediante elettroforesi su gel di agarosio 1%: sono state confermate l'assenza di contaminazione da parte del DNA genomico e l'accettabile integrità dell'estratto. Nella tabella 5.2.1 vengono riportati i dati di concentrazione e di purezza degli estratti di tutti i campioni ed in figura 5.2.1 invece alcuni esempi di spettro di assorbimento ottenuti durante la lettura al NanoDrop.

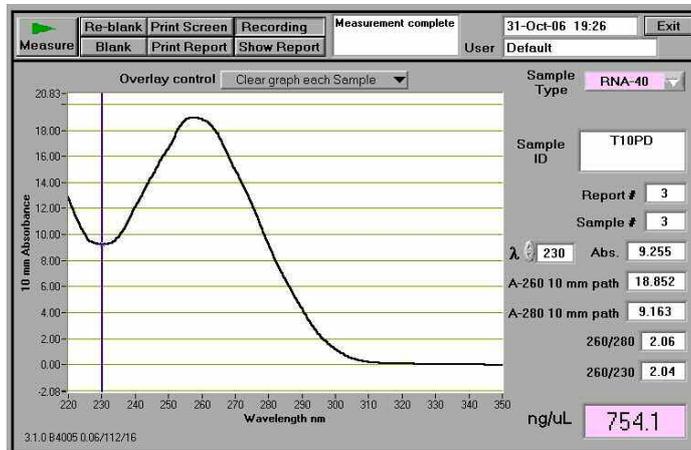
| Esperimento                          | Gruppo           | Campione         | Concentrazione RNA ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) | Abs 260/280 | Abs 260/230 |
|--------------------------------------|------------------|------------------|--|-------------|-------------|
| Trattamento con solo DEX             | K <sub>PD</sub>  | K <sub>1</sub>   | 1.46   | 2.05        | 2.03        |
|                                      |                  | K <sub>2</sub>   | 0.41   | 2.05        | 2.10        |
|                                      |                  | K <sub>3</sub>   | 0.77   | 2.07        | 1.91        |
|                                      |                  | K <sub>4</sub>   | 0.64   | 2.03        | 2.03        |
|                                      |                  | K <sub>5</sub>   | 0.41   | 2.06        | 2.11        |
|                                      |                  | K <sub>6</sub>   | 0.22   | 2.09        | 1.41        |
|                                      |                  | K <sub>7</sub>   | 0.87   | 2.08        | 1.92        |
|                                      |                  | K <sub>8</sub>   | 0.96   | 2.07        | 1.89        |
|                                      |                  | K <sub>9</sub>   | 1.31   | 2.08        | 2.12        |
|                                      | T <sub>PD</sub>  | T <sub>10</sub>  | 0.75   | 2.06        | 2.04        |
|                                      |                  | T <sub>11</sub>  | 1.48   | 2.08        | 1.99        |
|                                      |                  | T <sub>12</sub>  | 0.59   | 2.02        | 2.11        |
|                                      |                  | T <sub>13</sub>  | 0.99   | 2.08        | 2.04        |
|                                      |                  | T <sub>14</sub>  | 1.33   | 2.07        | 2.15        |
|                                      |                  | T <sub>15</sub>  | 0.82   | 2.07        | 2.21        |
|                                      |                  | T <sub>16</sub>  | 1.05   | 2.07        | 2.08        |
|                                      |                  | T <sub>17</sub>  | 1.29   | 2.08        | 2.15        |
|                                      |                  | T <sub>18</sub>  | 0.49   | 2.02        | 2.16        |
|                                      | B <sub>PD</sub>  | B <sub>19</sub>  | 0.30   | 1.93        | 2.02        |
|                                      |                  | B <sub>20</sub>  | 0.60   | 2.03        | 2.12        |
|                                      |                  | B <sub>21</sub>  | 1.59   | 2.08        | 2.16        |
|                                      |                  | B <sub>22</sub>  | 0.71   | 2.07        | 2.18        |
|                                      |                  | B <sub>23</sub>  | 1.11   | 2.07        | 2.12        |
|                                      |                  | B <sub>24</sub>  | 1.55   | 2.08        | 2.12        |
| Trattamento con DEX + E <sub>2</sub> | K <sub>de</sub>  | K <sub>7</sub>   | 0.20   | 2.06        | 1.26        |
|                                      |                  | K <sub>8</sub>   | 0.85   | 2.08        | 2.09        |
|                                      |                  | K <sub>9</sub>   | 0.42   | 2.06        | 1.76        |
|                                      |                  | K <sub>10</sub>  | 2.07   | 2.06        | 2.11        |
|                                      |                  | K <sub>11</sub>  | 0.26   | 1.90        | 1.17        |
|                                      |                  | K <sub>12</sub>  | 4.58   | 2.06        | 1.67        |
|                                      | D <sub>de</sub>  | D <sub>1</sub>   | 0.40   | 2.07        | 2.03        |
|                                      |                  | D <sub>2</sub>   | 0.95   | 2.09        | 2.00        |
|                                      |                  | D <sub>3</sub>   | 0.95   | 2.08        | 2.13        |
|                                      |                  | D <sub>4</sub>   | 0.60   | 2.09        | 2.11        |
|                                      |                  | D <sub>5</sub>   | 0.58   | 2.08        | 2.14        |
|                                      |                  | D <sub>6</sub>   | 0.79   | 2.08        | 2.16        |
|                                      | DE <sub>de</sub> | DE <sub>13</sub> | 0.57   | 2.03        | 2.10        |
|                                      |                  | DE <sub>14</sub> | 0.57   | 2.04        | 2.06        |
|                                      |                  | DE <sub>15</sub> | 0.43   | 1.99        | 1.32        |
|                                      |                  | DE <sub>16</sub> | 0.21   | 2.02        | 1.28        |
|                                      |                  | DE <sub>17</sub> | 0.62   | 2.07        | 2.13        |
|                                      |                  | DE <sub>18</sub> | 0.59   | 2.08        | 2.13        |

Tabella 5.2.1: concentrazione e purezza dei campioni di RNA estratti a partire dai campioni di fegato appartenenti ai vitelloni oggetto di studio nelle due tesi sperimentali. Vengono riportati i dati di concentrazione in  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ed i rapporti tra i valori di assorbanza a 260, 280 e 230 nm. Per tutti i campioni, sono stati processati circa 60-70 mg di tessuto e l'RNA estratto è stato risospeso in 50-100  $\mu\text{L}$  di acqua.

A



B



C

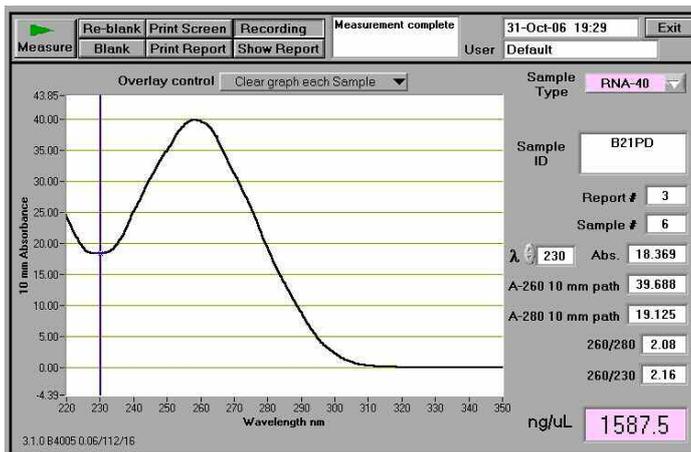
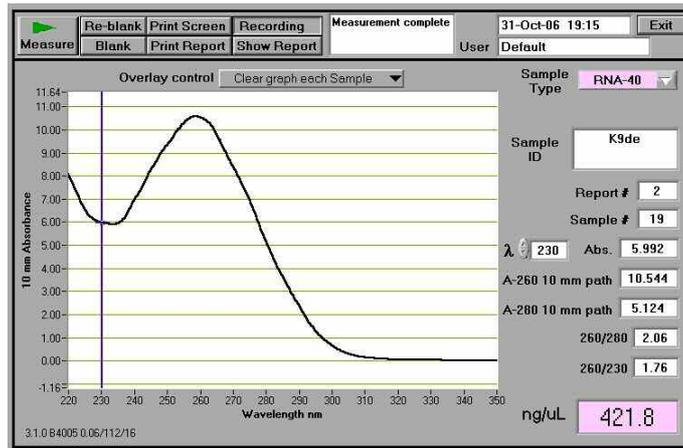
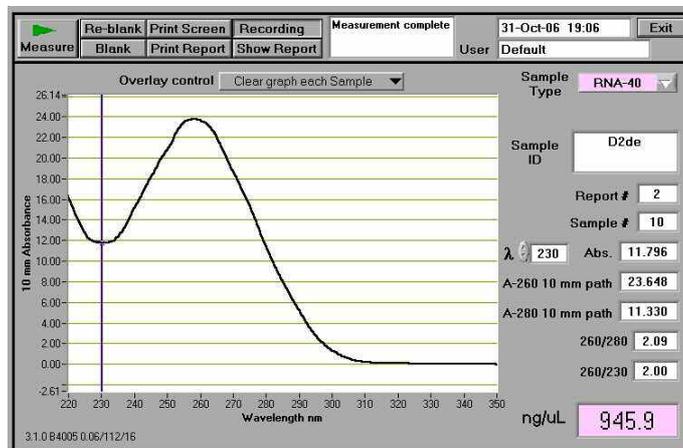


Figura 5.2.1: grafici di assorbanza ottenuti dall'analisi degli estratti K<sub>8</sub>, T<sub>10</sub> e B<sub>21</sub> appartenenti alla prima tesi sperimentale (A, B, C, rispettivamente) con il NanoDrop; si noti il picco di assorbimento degli acidi nucleici a 260 nm.

D



E



F

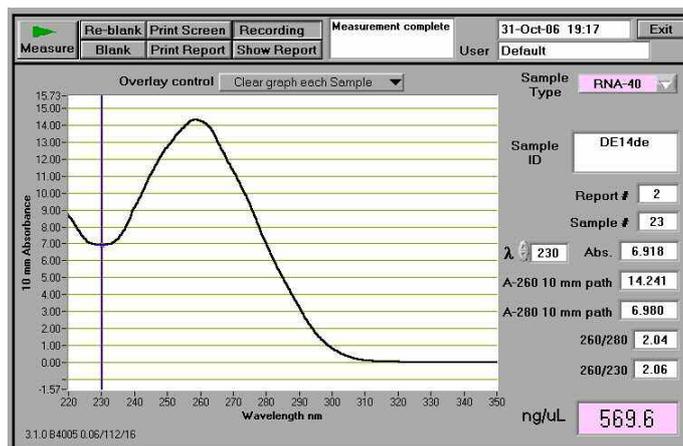


Figura 5.2.1: grafici di assorbanza ottenuti dall'analisi degli estratti K<sub>9</sub>, D<sub>2</sub> e DE<sub>14</sub> appartenenti alla seconda tesi sperimentale (D, E, F, rispettivamente) con il NanoDrop; si noti il picco di assorbimento degli acidi nucleici a 260 nm.

**Disegno dei primers**

Per i geni *target* diversi rispetto al precedente esperimento è stata effettuata l'analisi bioinformatica al fine di raccogliere le informazioni necessarie per il disegno dei *primers*, come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Sono state quindi disegnate coppie di oligonucleotidi, secondo i criteri riportati in precedenza. Nella tabella 5.2.2 vengono riportate le sequenze dei *primers* ottenuti, con le loro specifiche. Le sequenze dei *primers* per i geni contrassegnati da un asterisco sono state gentilmente concesse da Cantiello (dati personali). Per tutti i geni individuati come *target*, la verifica della corrispondenza delle sequenze dei *primers* e dell'amplificato con il gene bovino oggetto di studio (mediante *Blastn*), ha dato esito positivo.

| Gene                           | Sequenza primers 5' → 3'           | Lunghezza Primer (bp) | Tm (°C) | % GC | Lunghezza amplicone (bp) |
|--------------------------------|------------------------------------|-----------------------|---------|------|--------------------------|
| <b>SULT1A1</b>                 | F : CACGGCTCCTCAAGACACACT          | 21                    | 59      | 57   | 84                       |
|                                | R : GGGCGATGTAGATCACCTTG           | 20                    | 60      | 55   |                          |
| <b>CAR*</b>                    | F : GAAGGACATGATCCTATCGACAGA       | 24                    | 60      | 46   | 63                       |
|                                | R : CGTCGCTGGGCCTGTCT              | 17                    | 58      | 71   |                          |
| <b>PXR*</b>                    | F : TGAAGGCCTACATCGAGTTCAAC        | 23                    | 60      | 48   | 68                       |
|                                | R : GGCCATGATCTTCAGGAACAA          | 21                    | 60      | 48   |                          |
| <b>RXR<math>\alpha</math>*</b> | F : GCCTCAATGGTGTCTCAAAG           | 21                    | 60      | 52   | 120                      |
|                                | R : AGCTGTACACCCCGTAGTGCTT         | 22                    | 60      | 52   |                          |
| <b>HNF4<math>\alpha</math></b> | F : CGACAACGAGTACGCCTGC            | 19                    | 59      | 63   | 58                       |
|                                | R : CCCCTTGGCATCTGGGTC             | 18                    | 60      | 67   |                          |
| <b>GR</b>                      | F : AGCAGTGGAAGGACAGCACAA          | 21                    | 59      | 52   | 71                       |
|                                | R : TTCTTCGAATTTTATCAATGATACAATCAT | 30                    | 59      | 23   |                          |
| <b>ER<math>\alpha</math></b>   | F : CGGCTACGCAAGTGCTATGA           | 20                    | 59      | 55   | 51                       |
|                                | R : TTCCGTATTCCGCCTTCA             | 20                    | 59      | 45   |                          |

Tabella 5.2.2: *Primers* per il saggio in Q RT-PCR dei geni *target*. Per ciascun *primer forward* (F) e *reverse* (R) vengono riportate la sequenza, la lunghezza (bp), la temperatura di *melting* (Tm) e la % in GC, nonché la lunghezza dell'amplicone atteso (bp).

\*Cantiello (dati personali)

**Messa a punto dei saggi in Q RT-PCR**

Per verificare la funzionalità delle varie coppie di *primers* indicate sopra e per determinarne la concentrazione ottimale d'uso, è stata effettuata la messa a punto impiegando come template un *pool* di cDNA di fegato di bovino, come riportato nell'esperimento precedente.

L'amplificazione è avvenuta con successo in tutti i geni e, mediante l'analisi delle curve di dissociazione, è stata verificata l'assenza di sintesi di dimeri di *primers*, nonché l'amplificazione di un solo amplicone della temperatura di *melting* attesa.

E' stata quindi valutata l'efficienza di amplificazione allestendo curve degli standard per ciascun gene, utilizzando cinque diverse diluizioni seriali (rapporto 1:10) dello stesso *pool* di cDNA.

In tabella 5.2.3 sono riportati i risultati delle curve standard dei geni inclusi nello studio e messi a punto per questo esperimento; la linearità viene mantenuta in un *range* dinamico compreso complessivamente tra 7 e 10 cicli (più basso per GR).

| Gene                           | Combinazione primers (F/R) | Slope | R <sup>2</sup> | Efficienza |
|--------------------------------|----------------------------|-------|----------------|------------|
| <b>SULT1A1</b>                 | 900/300                    | -3.27 | 0.99           | 102.2      |
| <b>CAR*</b>                    | 300/300                    | -3.18 | 0.99           | 106.3      |
| <b>PXR*</b>                    | 300/300                    | -3.10 | 0.99           | 110.2      |
| <b>RXR<math>\alpha</math>*</b> | 300/300                    | -3.14 | 0.99           | 108.2      |
| <b>HNF4<math>\alpha</math></b> | 900/300                    | -3.29 | 0.99           | 101.3      |
| <b>GR</b>                      | 900/900                    | -3.53 | 0.99           | 92.0       |
| <b>ER<math>\alpha</math></b>   | 900/300                    | -3.30 | 0.99           | 100.9      |

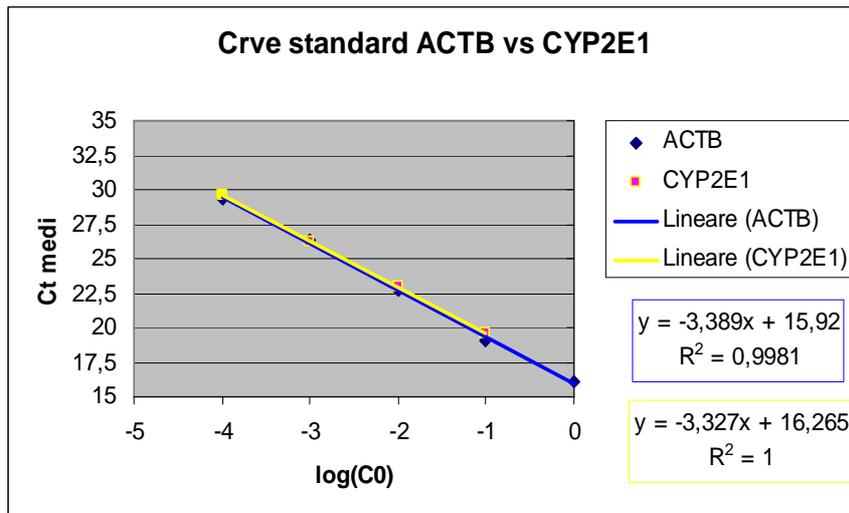
Tabella 5.2.3: Condizioni di messa a punto dei saggi in Q RT-PCR dei geni *target*: combinazione dei *primers* e curve standard. Vengono riportate le concentrazioni dei *primers* F e R risultate essere le più performanti (miglior efficienza di amplificazione) ed i parametri delle curve standard (*slope*, cioè il coefficiente angolare della retta e R<sup>2</sup>, cioè l'indice di regressione lineare) con il relativo calcolo dell'efficienza di reazione.

\*Cantiello (dati personali)

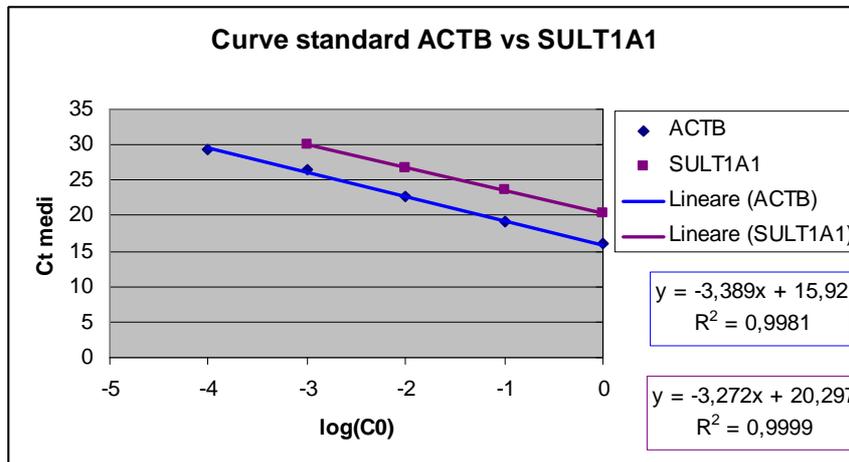
**Scelta gene reference**

In accordo a quanto riportato nell'esperimento precedente in questo stesso paragrafo, è stato utilizzato quale *gene reference* la beta-actina (ACTB). Qui di seguito (figura 5.2.2) vengono riportati degli esempi di curve di validazione in cui nello stesso grafico vengono presentate per alcuni geni le curve degli standard rispettivamente del gene *target* e del gene *housekeeping* utilizzato come riferimento. Si può notare, anche in questo caso, che le curve sono pressoché parallele.

A



B



C

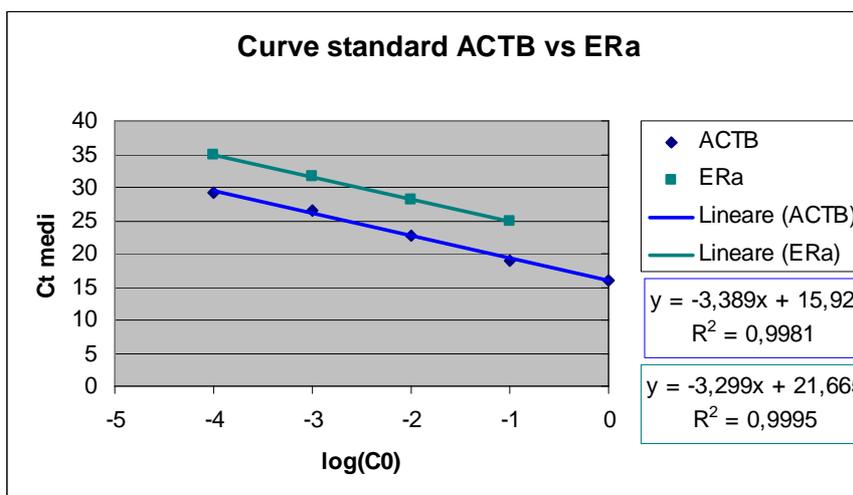


Figura 5.2.2: Grafici delle curve standard dei geni *target* (A) CYP2E1, (B) SULT1A1, (C) ER $\alpha$  confrontate con quella del gene ACTB, selezionato come *reference*. In ordinata sono riportati i valori dei Ct medi per ogni triplicato, mentre in ascissa la concentrazione dello standard di cDNA in scala logaritmica. A lato di ciascun grafico sono riportate le equazioni delle curve, le quali evidenziano che l'inclinazione è simile e pertanto le rette sono pressoché parallele.

**Effetti del trattamento con DEX**

La quantificazione relativa dei campioni è stata eseguita applicando il metodo ipotizzato da Livak e Schmittgen: i dati che si ottengono vengono espressi in unità arbitrarie come *fold-change* rispetto al controllo, per cui è stato assunto un valore medio pari a 1. Nella tabella 5.2.3 vengono riportati i dati medi di quantificazione relativa di ciascun gruppo appartenente alla prima tesi sperimentale (trattamento con DEX, *per os* e IM). I dati dei campioni di fegato in singolo invece vengono riportati nell'allegato 2.

| Gene                           | <i>Fold-change</i> (U.A.)<br>media $\pm$ SEM |                                |                   |
|--------------------------------|--|--------------------------------|-------------------|
|                                | K <sub>PD</sub>                              | T <sub>PD</sub>                | B <sub>PD</sub>   |
| <b>CYP1A1</b>                  | 1.000 $\pm$ 0.117                            | 0.978 $\pm$ 0.146              | 0.898 $\pm$ 0.016 |
| <b>CYP1A2</b>                  | 1.000 $\pm$ 0.074                            | 1.020 $\pm$ 0.097              | 0.868 $\pm$ 0.126 |
| <b>CYP2B6</b>                  | 1.000 $\pm$ 0.356 <sup>a,b</sup>             | 0.172 $\pm$ 0.082              | 0.117 $\pm$ 0.049 |
| <b>CYP2C9</b>                  | 1.000 $\pm$ 0.089                            | 1.163 $\pm$ 0.192              | 1.306 $\pm$ 0.665 |
| <b>CYP2E1</b>                  | 1.000 $\pm$ 0.191 <sup>aaa,b</sup>           | 0.031 $\pm$ 0.009              | 0.356 $\pm$ 0.158 |
| <b>CYP3A4</b>                  | 1.000 $\pm$ 0.136                            | 0.818 $\pm$ 0.116              | 0.771 $\pm$ 0.090 |
| <b>UGT2B17</b>                 | 1.000 $\pm$ 0.062                            | 1.057 $\pm$ 0.129              | 1.079 $\pm$ 0.086 |
| <b>GSTA1</b>                   | 1.000 $\pm$ 0.105 <sup>bb</sup>              | 1.650 $\pm$ 0.248              | 2.449 $\pm$ 0.675 |
| <b>SULT1A1</b>                 | 1.000 $\pm$ 0.112 <sup>a</sup>               | 1.550 $\pm$ 0.156              | 1.145 $\pm$ 0.230 |
| <b>CAR</b>                     | 1.000 $\pm$ 0.092 <sup>a</sup>               | 1.442 $\pm$ 0.205 <sup>c</sup> | 0.943 $\pm$ 0.135 |
| <b>PXR</b>                     | 1.000 $\pm$ 0.159                            | 1.016 $\pm$ 0.111              | 0.765 $\pm$ 0.076 |
| <b>RXR<math>\alpha</math></b>  | 1.000 $\pm$ 0.069 <sup>a</sup>               | 1.369 $\pm$ 0.143 <sup>c</sup> | 0.878 $\pm$ 0.094 |
| <b>HNF4<math>\alpha</math></b> | 1.000 $\pm$ 0.059                            | 0.891 $\pm$ 0.120              | 0.905 $\pm$ 0.201 |
| <b>GR</b>                      | 1.000 $\pm$ 0.113                            | 1.024 $\pm$ 0.055              | 0.871 $\pm$ 0.056 |

Tabella 5.2.3: Risultati Q RT-PCR esperimento “DEX” espressi come *fold-change* in unità arbitrarie (U.A.) rispetto al gruppo di controllo. Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey

a = K<sub>PD</sub> vs T<sub>PD</sub>; a: p<0.05, aaa: p<0.001

b = K<sub>PD</sub> vs B<sub>PD</sub>; b: p<0.05, bb: p<0.01

c = T<sub>PD</sub> vs B<sub>PD</sub>; c: p<0.05

Come si può evincere dalla tabella prima riportata, tra gli enzimi di fase I presi in considerazione (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2E1 e CYP3A4), solo le isoforme CYP2B6 e CYP2E1 sono state influenzate dal trattamento con DEX. Infatti, mentre il CYP2C9 ed il CYP3A4 mostrano variazioni (*trend* all'induzione ed all'inibizione, rispettivamente) che non raggiungono la significatività il CYP2B6, la cui espressione a livello epatico è caratterizzata da un'elevata variabilità interindividuale, è risultato significativamente inibito dal trattamento con DEX, tanto nel gruppo trattato per via orale, quanto in quello trattato per via IM ( $p < 0.05$  rispetto al gruppo di controllo). Anche per il CYP2E1 è stata riscontrata un'inibizione, ma l'effetto ottenuto somministrando la molecola per via orale è stato più rilevante rispetto a quello evidenziato per via IM ( $p < 0.001$  e  $p < 0.05$ , rispettivamente). Nelle figure 5.2.3 e 5.2.4 vengono riportati i grafici che dimostrano i risultati sopra citati.

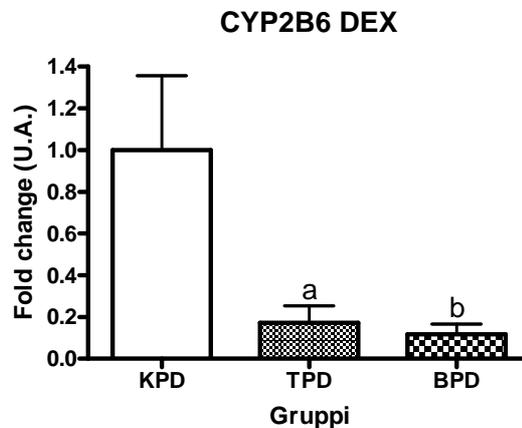


Figura 5.2.3: Espressione del CYP2B6 rispetto al gruppo di controllo (K<sub>PD</sub>; media = 1) nel fegato di vitelloni trattati con DEX somministrato *per os* (T<sub>PD</sub>) o per via intramuscolare (B<sub>PD</sub>). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM  
Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey; a = K<sub>PD</sub> vs T<sub>PD</sub>, a:  $p < 0.05$ ; b = K<sub>PD</sub> vs B<sub>PD</sub>, b:  $p < 0.05$

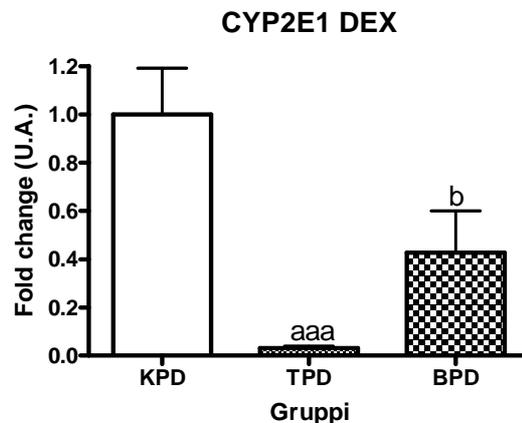


Figura 5.2.4: Espressione del CYP2E1 rispetto al gruppo di controllo (K<sub>PD</sub>; media = 1) nel fegato di vitelloni trattati con DEX somministrato *per os* (T<sub>PD</sub>) o per via intramuscolare (B<sub>PD</sub>). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM  
Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey; a = K<sub>PD</sub> vs T<sub>PD</sub>, aaa:  $p < 0.001$ ; b = K<sub>PD</sub> vs B<sub>PD</sub>, b:  $p < 0.05$

Per quanto riguarda invece gli enzimi di fase II considerati (UGT2B17, GSTA1 e SULT1A1), in particolare gli enzimi coniugativi GSTA1 e SULT1A1 sono stati indotti dal trattamento con DEX, mentre l'enzima UGT2B17 non è stato modulato dal trattamento. Per quanto riguarda la GSTA1, è stato evidenziato un progressivo aumento dell'espressione di questo enzima secondo l'ordine  $K_{PD} > T_{PD} > B_{PD}$ , ma la significatività rispetto al controllo è stata raggiunta solo nel gruppo  $B_{PD}$  ( $p < 0.01$ ).

La SULT1A1 invece, è risultata indotta significativamente solo nel gruppo trattato per via orale ( $p < 0.05$ ).

Nelle figure 5.2.5 e 5.2.6 vengono riportati i grafici relativi.

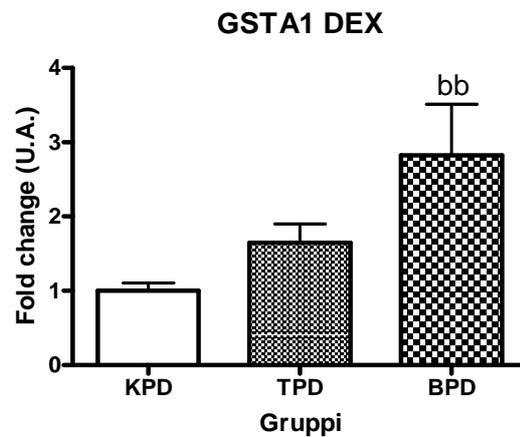


Figura 5.2.5: Espressione di GSTA1 rispetto al gruppo di controllo ( $K_{PD}$ ; media = 1) nel fegato di vitelloni trattati con DEX somministrato *per os* ( $T_{PD}$ ) o per via intramuscolare ( $B_{PD}$ ). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM  
Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey; b =  $K_{PD}$  vs  $B_{PD}$ , bb:  $p < 0.01$

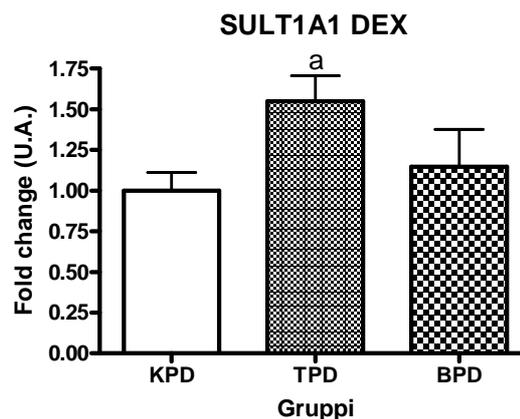


Figura 5.2.6: Espressione di SULT1A1 rispetto al gruppo di controllo ( $K_{PD}$ ; media = 1) nel fegato di vitelloni trattati con DEX somministrato *per os* ( $T_{PD}$ ) o per via intramuscolare ( $B_{PD}$ ). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM  
Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey; a =  $K_{PD}$  vs  $T_{PD}$ , a:  $p < 0.05$

Infine, tra i recettori nucleari selezionati per il loro coinvolgimento nella regolazione dell'espressione degli enzimi di fase I e II, solo i geni CAR ed RXR $\alpha$  sono stati influenzati dal trattamento ed hanno palesato il medesimo comportamento: sono stati indotti in maniera significativa dal trattamento con DEX somministrato *per os* ( $p < 0.05$  K<sub>PD</sub> vs T<sub>PD</sub> e B<sub>PD</sub> vs T<sub>PD</sub>, rispettivamente). I risultati corrispondenti sono riportati nelle figure 5.2.7 e 5.2.8.

Gli altri recettori considerati, PXR, HNF4 $\alpha$  e GR invece non hanno subito delle variazioni di rilievo.

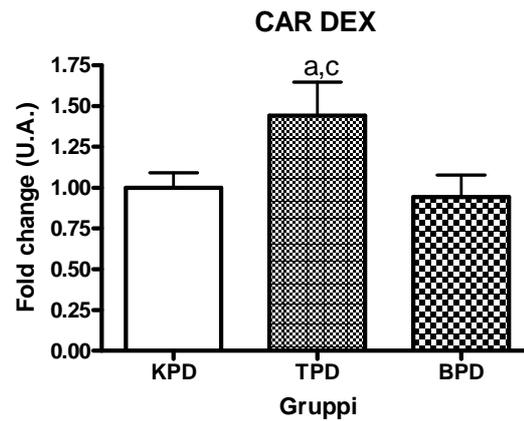


Figura 5.2.7: Espressione di CAR rispetto al gruppo di controllo (K<sub>PD</sub>; media = 1) nel fegato di vitelloni trattati con DEX somministrato *per os* (T<sub>PD</sub>) o per via intramuscolare (B<sub>PD</sub>). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM  
Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey; a = K<sub>PD</sub> vs T<sub>PD</sub>, a:  $p < 0.05$ ; c = T<sub>PD</sub> vs B<sub>PD</sub>, c:  $p < 0.05$

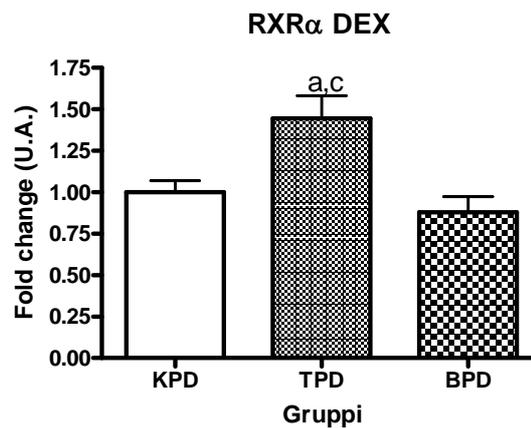


Figura 5.2.8: Espressione di RXR $\alpha$  rispetto al gruppo di controllo (K<sub>PD</sub>; media = 1) nel fegato di vitelloni trattati con DEX somministrato *per os* (T<sub>PD</sub>) o per via intramuscolare (B<sub>PD</sub>). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM  
Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey; a = K<sub>PD</sub> vs T<sub>PD</sub>, a:  $p < 0.05$ ; c = T<sub>PD</sub> vs B<sub>PD</sub>, c:  $p < 0.05$

**Effetti del trattamento con l'associazione DEX ed E<sub>2</sub>**

I dati qui di seguito riportati (tabella 5.2.3) sono relativi ad una tesi sperimentale che differisce in parte dalla precedente. Infatti, in questa sperimentazione si è voluto riproporre il trattamento con DEX secondo lo stesso dosaggio impiegato *per os*, ma è stato aggiunto il trattamento con l'associazione DEX *per os* (stesso dosaggio) ed E<sub>2</sub> (somministrato per via IM ogni 15 gg). Vengono di seguito riportati i dati medi relativi alla quantificazione relativa dei campioni di fegato, espressi come *fold-change* rispetto al gruppo di controllo (valore medio pari a 1). I dati di espressione dei singoli vitelloni invece vengono riportati nell'allegato 2.

| Gene                           | <i>Fold-change</i> (U.A.)      |                             |                  |
|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|------------------|
|                                | media ± SEM                    |                             |                  |
|                                | K <sub>de</sub>                | D <sub>de</sub>             | DE <sub>de</sub> |
| <b>CYP1A1</b>                  | 1.000 ± 0.095                  | 0.872 ± 0.063 <sup>c</sup>  | 1.263 ± 0.117    |
| <b>CYP1A2</b>                  | 1.000 ± 0.136                  | 0.630 ± 0.033 <sup>c</sup>  | 1.066 ± 0.109    |
| <b>CYP2B6</b>                  | 1.000 ± 0.194 <sup>aaa,b</sup> | 0.027 ± 0.004               | 0.605 ± 0.333    |
| <b>CYP2C9</b>                  | 1.000 ± 0.133                  | 1.382 ± 0.083               | 1.195 ± 0.233    |
| <b>CYP2E1</b>                  | 1.000 ± 0.286 <sup>a,b</sup>   | 0.102 ± 0.050               | 0.345 ± 0.172    |
| <b>CYP3A4</b>                  | 1.000 ± 0.121 <sup>bb</sup>    | 1.486 ± 0.104               | 1.652 ± 0.170    |
| <b>UGT1A1</b>                  | 1.000 ± 0.109                  | 1.080 ± 0.062               | 1.021 ± 0.153    |
| <b>UGT2B17</b>                 | 1.000 ± 0.075                  | 1.012 ± 0.073               | 0.922 ± 0.096    |
| <b>GSTA1</b>                   | 1.000 ± 0.130 <sup>b</sup>     | 1.468 ± 0.123               | 1.975 ± 0.342    |
| <b>GSTP1</b>                   | 1.000 ± 0.155                  | 0.972 ± 0.155               | 1.270 ± 0.215    |
| <b>SULT1A1</b>                 | 1.000 ± 0.060 <sup>b</sup>     | 1.285 ± 0.065               | 1.456 ± 0.147    |
| <b>CAR</b>                     | 1.000 ± 0.140                  | 0.824 ± 0.073 <sup>c</sup>  | 1.264 ± 0.148    |
| <b>PXR</b>                     | 1.000 ± 0.101                  | 1.113 ± 0.102               | 1.264 ± 0.182    |
| <b>RXR<math>\alpha</math></b>  | 1.000 ± 0.150 <sup>b</sup>     | 1.410 ± 0.091               | 1.514 ± 0.102    |
| <b>HNF4<math>\alpha</math></b> | 1.000 ± 0.130                  | 1.149 ± 0.101               | 1.180 ± 0.153    |
| <b>GR</b>                      | 1.000 ± 0.059                  | 0.840 ± 0.047 <sup>c</sup>  | 1.197 ± 0.120    |
| <b>ER<math>\alpha</math></b>   | 1.000 ± 0.103 <sup>b</sup>     | 0.873 ± 0.150 <sup>cc</sup> | 1.659 ± 0.161    |

Tabella 5.2.3: Risultati Q RT-PCR esperimento "DEX+E<sub>2</sub>" espressi come *fold-change* in unità arbitrarie (U.A.) rispetto al gruppo di controllo. Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey

a = K<sub>de</sub> vs D<sub>de</sub>; a: p<0.05, aaa: p<0.001

b = K<sub>de</sub> vs DE<sub>de</sub>; b: p<0.05, bb: p<0.01

c = D<sub>de</sub> vs DE<sub>de</sub>; c: p<0.05, cc: p<0.01

Come si può notare dalle figure 5.2.9, 5.2.10, 5.2.11, 5.2.12 e 5.2.13, tutti gli enzimi di fase I sono stati influenzati dal trattamento, ad esclusione del CYP2C9, che ha mostrato delle variazioni non statisticamente significative.

In particolare, il CYP2B6 ed il CYP2E1, a conferma dei dati ottenuti nel primo esperimento, risultano inibiti dal trattamento con solo DEX ( $p<0.001$  e  $p<0.05$ , K<sub>de</sub> vs D<sub>de</sub>, per CYP2B6 e CYP2E1, rispettivamente);

risentono però anche del trattamento con l'associazione, anche se l'effetto di "down-regulation" è meno evidente ( $p < 0.05$ ,  $K_{de}$  vs  $D_{de}$  in entrambi i casi).

Nelle due isoforme appartenenti alla stessa sottofamiglia CYP1A (CYP1A1 e CYP1A2) il gruppo  $DE_{de}$  presenta un'abbondanza relativa superiore rispetto a quella del gruppo  $D_{de}$  ( $p < 0.05$ ,  $D_{de}$  vs  $DE_{de}$ ); la variazione tuttavia non è significativa nei confronti del gruppo di controllo.

Il CYP3A4 invece, l'isoforma maggiormente coinvolta nel metabolismo ossidativo degli steroidi, viene indotta passando dal gruppo di controllo al gruppo  $D_{de}$  e  $DE_{de}$  ( $K_{de} > D_{de} > DE_{de}$ ), raggiungendo però il livello minimo di significatività solo nel gruppo trattato con le due molecole ( $p < 0.01$ ,  $K_{de}$  vs  $DE_{de}$ ). Questo risultato contraddice quanto evidenziato nel primo esperimento: a parità infatti di trattamento *per os* nel primo caso si è riscontrata un'inibizione e nel secondo un'induzione, anche se non statisticamente significative.

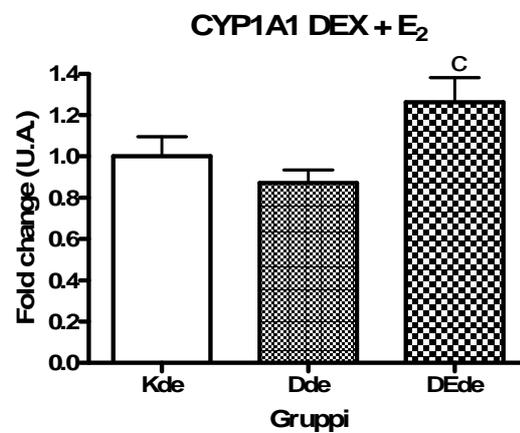


Figura 5.2.9: Espressione del CYP1A1 rispetto al gruppo di controllo ( $K_{de}$ ; media = 1) nel fegato di vitelloni trattati con DEX da solo ( $D_{de}$ ) o in associazione a  $E_2$  ( $DE_{de}$ ). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM

Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey; c =  $D_{de}$  vs  $DE_{de}$ , c:  $p < 0.05$

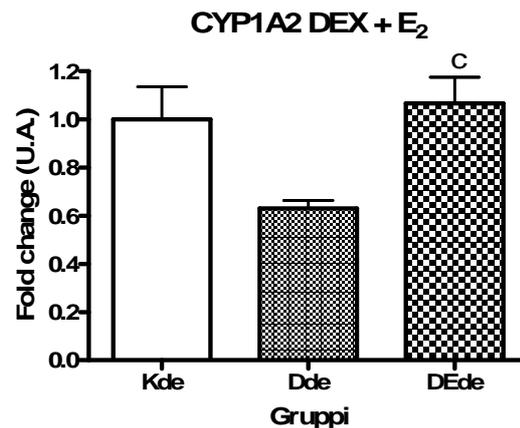


Figura 5.2.10: Espressione del CYP1A2 rispetto al gruppo di controllo ( $K_{de}$ ; media = 1) nel fegato di vitelloni trattati con DEX da solo ( $D_{de}$ ) o in associazione a  $E_2$  ( $DE_{de}$ ). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM

Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey; c =  $D_{de}$  vs  $DE_{de}$ , c:  $p < 0.05$

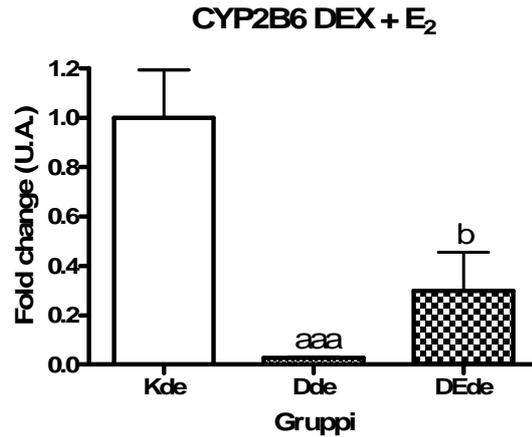


Figura 5.2.11: Espressione del CYP2B6 rispetto al gruppo di controllo (K<sub>de</sub>; media = 1) nel fegato di vitelloni trattati con DEX da solo (D<sub>de</sub>) o in associazione a E<sub>2</sub> (DE<sub>de</sub>). Dati espressi come valore medio ± SEM  
 Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey; a = K<sub>de</sub> vs D<sub>de</sub>, aaa: p<0.001; b = K<sub>de</sub> vs DE<sub>de</sub>, b: p<0.05

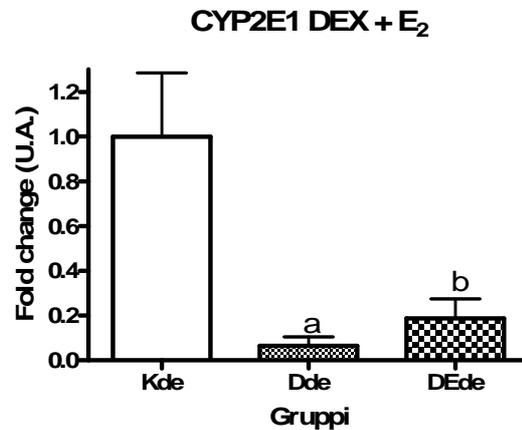


Figura 5.2.12: Espressione del CYP2E1 rispetto al gruppo di controllo (K<sub>de</sub>; media = 1) nel fegato di vitelloni trattati con DEX da solo (D<sub>de</sub>) o in associazione a E<sub>2</sub> (DE<sub>de</sub>). Dati espressi come valore medio ± SEM  
 Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey; a = K<sub>de</sub> vs D<sub>de</sub>, a: p<0.05; b = K<sub>de</sub> vs DE<sub>de</sub>, b: p<0.05

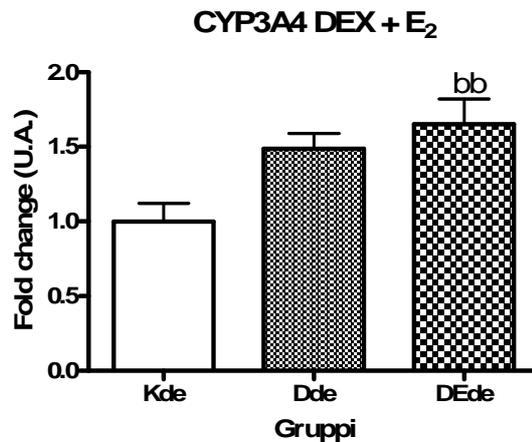


Figura 5.2.13: Espressione del CYP3A4 rispetto al gruppo di controllo (K<sub>de</sub>; media = 1) nel fegato di vitelloni trattati con DEX da solo (D<sub>de</sub>) o in associazione a E<sub>2</sub> (DE<sub>de</sub>). Dati espressi come valore medio ± SEM  
 Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey; b = K<sub>de</sub> vs DE<sub>de</sub>, bb: p<0.01

Per quanto riguarda gli enzimi di fase II sono stati valutati, oltre ai geni UGT2B17, GSTA1 e SULTA1, anche i trascritti UGT1A1 e GSTP1, essendo questi coinvolti nella coniugazione degli estrogeni nell'uomo. Come già evidenziato nel primo esperimento, l'espressione di UGT2B17 non viene alterata dal trattamento farmacologico; lo stesso risultato è stato ottenuto anche per UGT1A1 e GSTP1, sebbene il secondo trascritto evidenzi una blanda induzione nel gruppo DE<sub>de</sub>.

La GSTA1 nel gruppo sottoposto a trattamento con DEX *per os* viene indotta di un fattore pari a 1.5 volte, come nell'esperimento precedente; l'induzione però risulta statisticamente significativa solo nel gruppo DE<sub>de</sub> ( $p < 0.05$ , K<sub>de</sub> vs DE<sub>de</sub>), dove mostra un contenuto di trascritto pari a 2 volte quello del gruppo di controllo. Anche SUL1A1 si comporta allo stesso modo: si evidenzia un *trend* all'induzione, statisticamente significativo solo nel gruppo DE<sub>de</sub> rispetto a K<sub>de</sub> ( $p < 0.05$ , K<sub>de</sub> vs DE<sub>de</sub>). Questi risultati vengono presentati nelle figure 5.2.14 e 5.2.15.

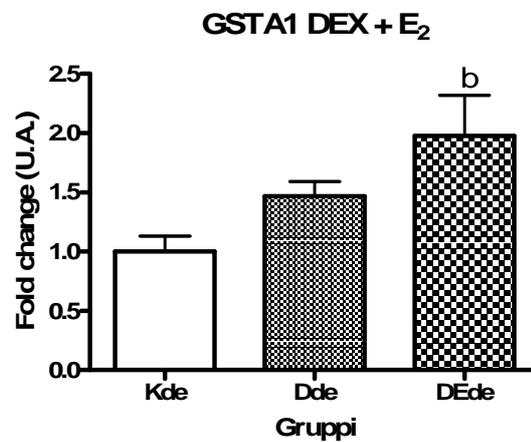


Figura 5.2.14: Espressione di GSTA1 rispetto al gruppo di controllo (K<sub>de</sub>; media = 1) nel fegato di vitelloni trattati con DEX da solo (D<sub>de</sub>) o in associazione a E<sub>2</sub> (DE<sub>de</sub>). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM  
Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey; b = K<sub>de</sub> vs DE<sub>de</sub>, b:  $p < 0.05$

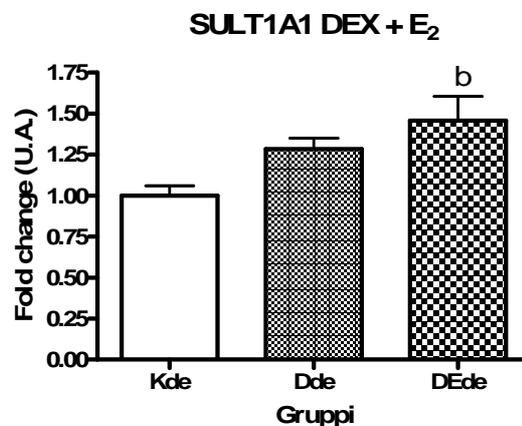


Figura 5.2.15: Espressione di SULT1A1 rispetto al gruppo di controllo (K<sub>de</sub>; media = 1) nel fegato di vitelloni trattati con DEX da solo (D<sub>de</sub>) o in associazione a E<sub>2</sub> (DE<sub>de</sub>). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM  
Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey; b = K<sub>de</sub> vs DE<sub>de</sub>, b:  $p < 0.05$

Per quanto riguarda invece i fattori di trascrizione PXR e HNF4 $\alpha$  non sono stati influenzati dal trattamento. In analogia invece con il primo esperimento, CAR e RXR $\alpha$  sono stati modulati dall'associazione. Questi due trascritti infatti risultano indotti nel gruppo DE<sub>de</sub>; però, mentre l'espressione di CAR è statisticamente significativa rispetto a D<sub>de</sub>, quella di RXR $\alpha$  lo è rispetto al controllo ( $p < 0.05$  in entrambi i casi: vedi le figure 5.2.16 e 5.2.17).

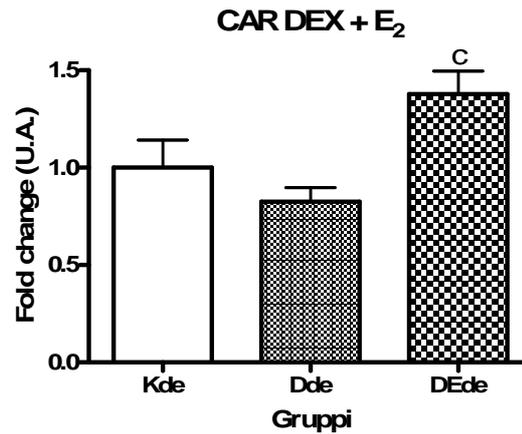


Figura 5.2.16: Espressione di CAR rispetto al gruppo di controllo (K<sub>de</sub>; media = 1) nel fegato di vitelloni trattati con DEX da solo (D<sub>de</sub>) o in associazione a E<sub>2</sub> (DE<sub>de</sub>). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM  
Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey; c = D<sub>de</sub> vs DE<sub>de</sub>, c:  $p < 0.05$

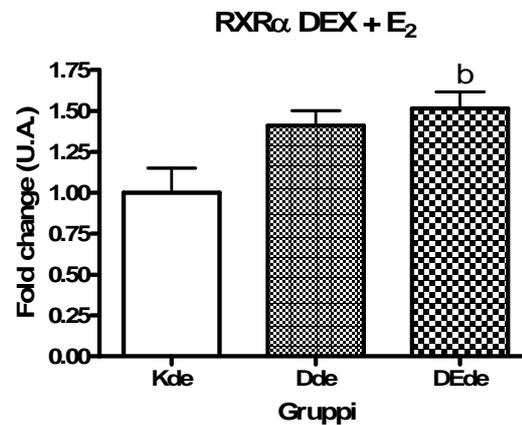


Figura 5.2.17: Espressione di RXR $\alpha$  rispetto al gruppo di controllo (K<sub>de</sub>; media = 1) nel fegato di vitelloni trattati con DEX da solo (D<sub>de</sub>) o in associazione a E<sub>2</sub> (DE<sub>de</sub>). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM  
Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey; b = K<sub>de</sub> vs DE<sub>de</sub>, b:  $p < 0.05$

Infine, anche il recettore per i glucocorticoidi (GR) ed il recettore per gli estrogeni ( $ER\alpha$ ) vengono indotti dalla somministrazione dell'associazione dei due composti.

Inaspettatamente GR non viene modulato dalla somministrazione del solo glucocorticoide di sintesi, mentre lo è nel gruppo  $DE_{de}$  ( $p < 0.05$ ,  $D_{de}$  vs  $DE_{de}$ : vedi figura 5.2.18).

Circa  $ER\alpha$  invece, come ci si aspettava, si è osservata una maggiore espressione nel gruppo  $DE_{de}$  ( $p < 0.05$   $K_{de}$  vs  $DE_{de}$ ,  $p < 0.01$   $D_{de}$  vs  $DE_{de}$ : vedi figura 5.2.19).

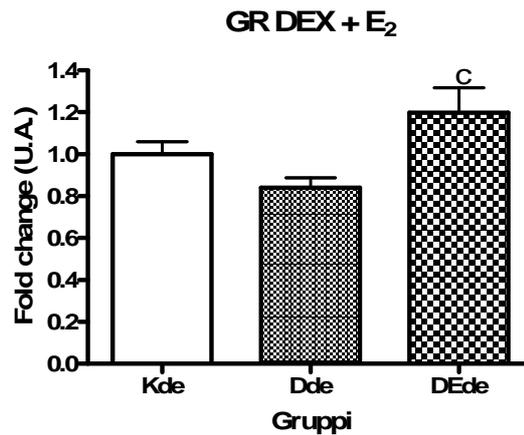


Figura 5.2.18: Espressione di GR rispetto al gruppo di controllo ( $K_{de}$ ; media = 1) nel fegato di vitelloni trattati con DEX da solo ( $D_{de}$ ) o in associazione a  $E_2$  ( $DE_{de}$ ). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM  
Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey; c =  $D_{de}$  vs  $DE_{de}$ , c:  $p < 0.05$

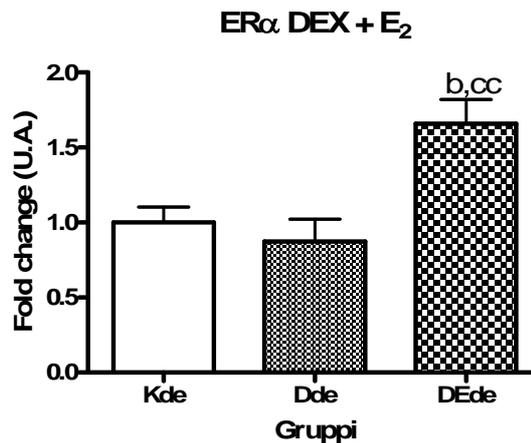


Figura 5.2.19: Espressione di  $ER\alpha$  rispetto al gruppo di controllo ( $K_{de}$ ; media = 1) nel fegato di vitelloni trattati con DEX da solo ( $D_{de}$ ) o in associazione a  $E_2$  ( $DE_{de}$ ). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM  
Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey; b =  $K_{de}$  vs  $D_{de}$ , b:  $p < 0.05$ ; c =  $D_{de}$  vs  $DE_{de}$ , cc:  $p < 0.01$

### 5.3. DISCUSSIONE

Nel settore dell'allevamento del bovino da carne è comune l'impiego, a scopo illecito, di sostanze atte al miglioramento delle prestazioni produttive degli animali. Queste sostanze, eterogenee per caratteristiche chimiche e meccanismo di azione, vengono utilizzate allo scopo di incrementare il peso dell'animale riducendo gli indici di conversione e stimolare l'anabolismo proteico e la lipolisi rispettando così le attuali richieste di mercato di carne magra. Fra le classi di molecole maggiormente impiegate si annoverano steroidi sessuali, beta-agonisti e soprattutto, corticosteroidi (Nebbia *et al.*, 2005). Benché in Italia viga il divieto di impiego di tali sostanze come promotori della crescita (PdC: D.L.vo 336 del 4 agosto 1999), e benché dati ufficiali relativi ai controlli analitici effettuati nel nostro Paese indichino positività inferiori allo 0.5% per i più noti PdC, le informazioni raccolte in campo, indagini istologiche eseguite su organi bersaglio e le analisi effettuate su preparazioni sequestrate in allevamento lasciano presupporre che i trattamenti illeciti, rappresentino tuttora un grosso problema (Nebbia, 2005).

I controlli analitici adottati a livello comunitario purtroppo possono risultare inutili nel caso di impiego di nuove molecole di sintesi (attive anche a dosi inferiori rispetto a quelle di analoghi composti naturali) o di somministrazione di *cocktails* di PdC in cui l'effetto voluto si ottiene con concentrazioni inferiori a quelle utilizzate con PdC somministrati singolarmente (Gardini *et al.*, 2006). Per questi motivi, si rende necessaria la messa a punto, la validazione e l'impiego di nuovi metodi di *screening* più sensibili e specifici, da affiancarsi a quelli già previsti per legge (Nebbia, 2005). Tra questi si possono annoverare quei biomarcatori molecolari, ottenibili ricorrendo all'utilizzo di tecniche quali la metabolomica, la proteomica e la genomica. L'alterazione dell'espressione genica, riconducibile alla somministrazione di sostanze esogene, rappresenta un parametro sensibile e specifico, particolarmente importante in quanto può essere utilizzato anche a scopi predittivi (Waring e Halbert, 2002).

Nel presente lavoro pertanto è stata applicata la metodica della Q RT-PCR in campioni di mRNA di fegato appartenenti a bovini da carne trattati a scopo illecito secondo protocolli desunti dal campo. I potenziali geni candidati sono stati scelti sulla base di una ricerca bibliografica atta all'individuazione degli enzimi coinvolti nel metabolismo biotrasformativo dei composti selezionati per i trattamenti, nonché dei fattori di trascrizione ad essi correlati.

Sono stati pertanto messi a punto i saggi specifici, per un totale di 17 trascritti, comprendenti 6 enzimi di fase I, 5 enzimi di fase II e 6 fattori di trascrizione; sono stati poi messi a punto e validati 3 geni da utilizzare come *housekeeping* (ACTB, B2M e TBP). In generale, i saggi in Q RT-PCR che hanno visto il SYBR Green I quale fluoroforo, sono risultati specifici (assenza di amplificati aspecifici e di dimeri di *primers*) ed efficienti (efficienza di amplificazione compresa nel *range* di accettabilità). Grazie inoltre alla valutazione critica del gene da utilizzarsi come *reference*, è stato possibile quantificare l'espressione genica relativa nei campioni di fegato oggetto di analisi. È importante qui sottolineare che le efficienze di amplificazione ottenute sono risultate buone pur avendo a disposizione dei campioni di RNA concentrati, caratterizzati da buoni indici di purezza (rapporti  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$  superiori a 1.8) ma parzialmente degradati. Questo

fatto, che non ha influenzato negativamente le analisi successive, è probabilmente imputabile alla fase di campionamento al macello, durante la quale le aliquote di fegato sono state raccolte a distanza di circa 30 minuti dal sacrificio dell'animale.

Per quanto riguarda il trattamento con DEX, che trova largo impiego in medicina veterinaria in virtù dell'elevata attività antinfiammatoria ed immunosoppressiva nonché per il basso rapporto costo/efficacia terapeutica, sono stati seguiti due differenti protocolli: un primo caratterizzato da basse dosi di principio attivo somministrato *per os* quotidianamente per 54 giorni (0.75 mg/capo/giorno) in cialde con l'aiuto di uno sparaboli ed un secondo in cui la somministrazione di 1.32 g/capo è stata effettuata per via IM per 2 volte a distanza di 21 gg. I geni responsivi a questo tipo di trattamenti sono risultati essere, in particolare, il CYP2B6 ed il CYP2E1 tra gli enzimi di fase I considerati, la GSTA1 e la SULT1A1 tra gli enzimi di fase II ed infine i recettori CAR ed RXR $\alpha$ .

Il CYP2B6, isoforma inducibile da parte del trattamento con DEX in fettine di fegato di ratto (Cui *et al.*, 2005), in questo caso è stata inibita considerevolmente a livello genico, indipendentemente dalla via di somministrazione scelta e anche a discapito dell'elevata variabilità interindividuale riscontrata. Al momento attuale non è ancora stato riscontrato in letteratura un comportamento simile e non se ne conosce ancora la ragione; tra l'altro, questa evidenza sperimentale non è giustificata a livello molecolare dall'effetto opposto evidenziato sui recettori nucleari CAR e RXR $\alpha$  coinvolti nella regolazione della sua stessa espressione. Infatti, questi due recettori nucleari risultano indotti, anche se unicamente nel caso del trattamento *per os*: a giustificazione di questo risultato, è stato dimostrato che l'espressione di tali recettori in epatociti umani subisce un incremento a seguito di incubazione con DEX, per il noto meccanismo di *cross-talk* tra i recettori orfani PXR, CAR e RXR $\alpha$  (Pascussi *et al.*, 2000a e 2000b).

Un altro gene responsivo all'azione del DEX (marcata inibizione) è il CYP2E1. Contrariamente a quanto si rinviene classicamente in letteratura, e cioè che il CYP2E1 in uomo viene modulato da molecole quali etanolo ed isoniazide (Sinclair *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1993), un simile effetto inibitorio a carico del CYP2E1 a seguito di esposizione a DEX è stato riscontrato recentemente nel ratto (Caron *et al.*, 2005).

L'espressione del CYP3A4 invece, l'isoforma maggiormente coinvolta nel metabolismo degli xenobiotici e nota per la sua inducibilità in fegato di uomo, topo e ratto a seguito del trattamento con DEX, non ha subito variazioni di rilievo, anzi, contrariamente a quanto ci si poteva aspettare ha evidenziato una parziale inibizione negli animali sottoposti a trattamento. In letteratura infatti classicamente viene riportato che il DEX è in grado di indurre l'espressione del CYP3A4 in epatociti umani in coltura primaria mediante l'attivazione dei recettori GR, CAR, PXR ed RXR $\alpha$ , ma secondo un processo bifasico: a basse concentrazioni ( $10^{-7}$  M) il CYP3A4 viene indotto indipendentemente dallo xenobiotico grazie all'attivazione GR-mediata di PXR; a concentrazioni maggiori ( $10^{-5}$  M), invece, il DEX lega e attiva il PXR, che a sua volta induce il CYP3A4 per la presenza di alte concentrazioni del ligando specifico (Pascussi *et al.*, 2003). Il DEX pertanto interviene in maniera duplice nella regolazione dell'espressione del CYP3A: controllando l'espressione del PXR, in condizioni fisiologiche, tramite il GR ed attivando il PXR in condizioni di stress o di somministrazione esogena di farmaco (Pascussi *et al.*, 2003; El Sankary *et al.*, 2002). In questo caso però,

non solo PXR e GR non sono stati modulati dal trattamento, ma nemmeno il CYP3A4, che al contrario ha evidenziato un *trend* all'inibizione, più rilevante nei vitelloni trattati per via intramuscolare. Questo risultato viene ulteriormente confermato anche dai dati dell'attività catalitica CYP3A-dipendente (6 $\beta$ - e 2 $\beta$ -testosterone idrossilasi) ottenuti contestualmente nel nostro laboratorio (Capolongo, dati personali). Uno stesso effetto inibitorio a carico dell'espressione genica e proteica del CYP3A, nonché dell'attività catalitica 3A-dipendente, è stato evidenziato anche in vitelli a carne bianca trattati a scopo illecito secondo un protocollo terapeutico a base di DEX simile (Cantiello *et al.*, 2008b; vedi ultimo esperimento di questa Tesi di Dottorato). Inoltre, in un altro studio, Zhang e collaboratori (2006) hanno evidenziato che dosi cliniche di DEX, pari a 2.5 – 7.5 mg/capo/giorno somministrate a cani per 5 giorni consecutivi determinano un'inibizione significativa dell'attività catalitica CYP3A-dipendente. Pertanto, questo effetto riscontrato in bovino e cane a seguito del trattamento con DEX può essere imputato: a) alle basse dosi impiegate; b) ad un diverso meccanismo d'azione di questa molecola nelle due specie considerate. E' noto infatti che, per esempio, nel coniglio il DEX non rappresenta un efficace induttore del CYP3A, bensì è la rifampicina ad avere un effetto induttorio sull'espressione di questa stessa isoforma; inoltre è stato dimostrato che in epatociti di bovino l'induzione di questa stessa isoforma a seguito di incubazioni con DEX non è dose-dipendente (Van't Klooster *et al.*, 1993; Kuilman *et al.*, 1998).

Tra gli altri enzimi di fase I considerati, il CYP1A1 ed il CYP1A2 non sono stati modulati dal trattamento, a conferma del fatto che i glucocorticoidi sembrano interferire minimamente sull'espressione basale del CYP1A (Prough *et al.*, 1996), mentre il CYP2C9 ha subito un incremento nell'espressione genica, non raggiungendo però la significatività: questo risultato è potenzialmente ascrivibile al concetto che tale citocromo può essere modulato da attivatori comuni del PXR, grazie alla presenza di una regione PXREM localizzata nella regione promotrice di questo stesso gene (Pascussi *et al.*, 2003).

Infine, tra gli enzimi di fase II selezionati per il loro coinvolgimento nella coniugazione degli steroidi (You, 2004), la GSTA1 e la SULT1A1 sono risultate indotte nei gruppi B<sub>PD</sub> e T<sub>PD</sub>, rispettivamente. A giustificazione di questo risultato, in letteratura viene riportato come nel ratto i sopraccitati geni vengano indotti dal trattamento con glucocorticoidi (LeCluyse *et al.*, 2000; Duanmu *et al.*, 2001), a differenza invece dell'uomo in cui la SULT1A1 non viene in alcun modo modulata dalla stessa molecola (Duanmu *et al.*, 2002).

Nel secondo esperimento è stato riproposto lo stesso trattamento con il solo DEX allo stesso dosaggio del primo esperimento, scegliendo però unicamente la via di somministrazione orale: il principio attivo tuttavia non è stato fornito agli animali in cialde con sparaboli, bensì mescolato all'alimento (sistema ipoteticamente più semplice e comodo da utilizzare in campo da parte degli allevatori che impiegano PdC); inoltre ad un secondo gruppo sperimentale in combinazione al DEX è stato somministrato per via IM ogni 15 gg, 20 mg/capo di estradiolo benzoato.

Similmente a quanto evidenziato nel primo esperimento, il CYP2C9, la GSTA1 e la SULT1A1 sono risultati indotti dal trattamento con il solo DEX ma non in modo significativo, mentre gli ultimi due geni hanno raggiunto il limite della significatività nel caso del trattamento con l'associazione dei due composti. Questi

due enzimi di fase II infatti sono entrambi coinvolti nella coniugazione dei corticosteroidi e degli steroidi sessuali (You, 2004) e possono pertanto essere modulati dai loro stessi substrati.

Non sono state evidenziate, invece, differenze statisticamente significative nell'espressione degli altri enzimi di fase II considerati (UGT1A1, UGT2B17 e GSTP1), enzimi scelti *ad hoc* per il loro coinvolgimento nella coniugazione degli steroidi in generale, ma nello specifico prevalentemente degli estrogeni (Guillemette *et al.*, 2004; You, 2004; Dawling *et al.*, 2004).

Gli enzimi invece responsivi al trattamento indipendentemente dalla via di somministrazione e dall'impiego dell'associazione o meno con l'estradiolo benzoato, sono il CYP2B6 ed il CYP2E1, i quali risultano marcatamente inibiti rispetto agli animali di controllo. Ad oggi però non si rinvencono in letteratura evidenze sperimentali che possano confermare tali risultati e per questo motivo devono essere ulteriormente soggetti ad approfondimento. Solo recentemente, Zamaratskaia e collabori (2007) hanno dimostrato un effetto inibitorio dell'estradiolo sull'attività catalitica CYP2E1-dipendente in microsomi di suino maschio, mentre Kent *et al.* (2002) hanno osservato un effetto inibitorio post-traduzionale del 17 $\alpha$ -etinilestradiolo (un distruttore endocrino) sul CYP2B1 e CYP2B6 per il legame covalente di un suo intermedio reattivo con gli aminoacidi dell'apoproteina specifica.

Il CYP3A4, a differenza dell'esperimento precedente, in cui appariva inibito anche se non in modo significativo nei gruppi T<sub>PD</sub> e B<sub>PD</sub>, in questa seconda prova sperimentale viene modulato in senso positivo dal trattamento con il solo DEX, confermando quanto riportato in letteratura per l'uomo (McCune, 2000) ma raggiungendo la significatività soltanto nel gruppo DE<sub>de</sub>. È noto che il CYP3A è in grado di metabolizzare un ampio *range* di xenobiotici, nonché substrati endogeni, tra i quali gli ormoni steroidei; nell'uomo rappresenta forse il più importante enzima epatico coinvolto nel metabolismo dei farmaci (30% dei CYP epatici) e partecipa al metabolismo di più del 50% degli xenobiotici esistenti (You, 2004). Probabilmente questo risultato rappresenta un classico esempio di *feedback* positivo, cioè di induzione mediata dallo stesso substrato, nota per il citocromo P450. I risultati ottenuti mediante Q RT-PCR concordano perfettamente con i dati ottenuti sia dall'attività catalitica CYP3A-dipendente (6 $\beta$ - e 2 $\beta$ -testosterone idrossilasi ed etilmorfina *N*-demetilasi) sia dall'espressione della proteina mediante immunoelettroforesi (Pegolo *et al.*, dati personali; Giantin *et al.*, dati personali). Altri autori al contrario, hanno evidenziato che il 17 $\alpha$ -etinilestradiolo ed altri estrogeni nell'uomo sono in grado di inibire l'espressione del CYP3A4 e la sua attività catalitica di idrossilazione del testosterone in posizione 6 $\beta$  (Lin *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2004).

Altri enzimi appartenenti alla superfamiglia del CYP sono stati modulati dall'associazione dei due composti, ed in particolare il CYP1A1 e il CYP1A2. Queste due isoforme infatti non hanno risentito del trattamento con il solo DEX ma sono state indotte invece dalla combinazione con E<sub>2</sub>, un noto substrato endogeno di queste stesse isoforme (Badawi *et al.*, 2000). Diversi studi hanno infatti dimostrato che la somministrazione di E<sub>2</sub> può determinare l'induzione delle isoforme appartenenti alla famiglia CYP1: in particolare, in linee cellulari stabilizzate di tumore mammario umano (MCF-7), E<sub>2</sub> aumenta l'espressione pre-trascrizionale di CYP1A1 e di CYP1B1, nonché la quantità di apoproteina del CYP1A2 nel criceto (Tsuchiya *et al.*, 2005).

Tra i recettori nucleari è stato evidenziato un aumento significativo dell'espressione di CAR e RXR $\alpha$  non nel gruppo trattato solo con DEX, come nell'esperimento precedente, ma nel gruppo DE<sub>de</sub>: a tal proposito, Kawamoto e collaboratori (2000) hanno dimostrato infatti che in colture primarie di epatociti di topo il recettore CAR può essere attivato dal 17 $\beta$ -estradiolo, ed in più Kiyosawa *et al.* (2007) hanno evidenziato che in ratti immaturi ovariectomizzati, composti con attività estrogeno-simile, attivatori di ER, sono in grado di modulare l'espressione genica per mezzo dell'attivazione di CAR e PXR.

Infine, sono stati modulati dal trattamento con l'associazione dei due composti anche GR ed ER $\alpha$ , i due recettori steroidei coinvolti nel meccanismo d'azione e nella regolazione di queste stesse molecole; sorprendentemente, però, il GR non è stato influenzato dal trattamento con il solo corticosteroide, bensì dalla combinazione con lo steroide sessuale. Un recente studio riporta che i recettori GR ed ER, importanti per il loro ruolo in condizioni fisiopatologiche, possono interagire in un meccanismo di *cross-talk*, anche se al momento attuale il meccanismo molecolare alla base di questo processo non è ancora ben chiaro: gli autori infatti hanno evidenziato che il 17 $\beta$ -estradiolo può avere proprietà antinfiammatorie paragonabili a quelle dei glucocorticoidi e che antagonisti specifici per ER $\alpha$  sono in grado di attenuare gli effetti antinfiammatori del DEX in ratti ovariectomizzati (Cuzzocrea *et al.*, 2007).

In generale, i PdC quali DEX ed E<sub>2</sub> sembrano essere in grado di modulare l'espressione genica di alcuni enzimi biotrasformativi, nonché di alcuni fattori di trascrizione. In particolare sembrano rispondere meglio al trattamento con le due molecole i geni CYP2B6, CYP2E1, GSTA1, SULT1A1, CAR ed RXR $\alpha$ , mentre CYP1A1/2, CYP3A4 e ER $\alpha$  rispondono limitatamente all'uso di estradiolo benzoato. I geni che però in assoluto risultano i più promettenti sono il CYP2B6 ed il CYP2E1, in quanto vengono modulati dal trattamento indipendentemente dalla via di somministrazione e dalla molecola impiegata.

La definizione e l'utilizzo di una sorta di *PCR-Array* di 17 geni del metabolismo epatico in esperimenti pilota sui trattamenti illeciti ha permesso di individuare dei potenziali e promettenti geni candidati, da utilizzare quali biomarcatori indiretti di trattamento illecito.

Naturalmente questo lavoro rappresenta un primo approccio verso la definizione di biomarcatori molecolari di trattamento: dovranno infatti essere considerati, secondo un approccio mirato, altri geni deputati al metabolismo in modo tale da allargare il *set* di geni di questo *PCR-Array* del metabolismo oppure, secondo un approccio più generalistico, si dovrà ricorrere all'utilizzo di un *microarray* completo del genoma bovino che dovrà essere valutato su questi stessi campioni positivi e di controllo per evidenziare, tra le migliaia di sequenze presenti sulla piattaforma *microarray*, altri geni eventualmente responsivi al trattamento. Quest'ultimo approccio tuttavia prevede comunque una validazione dei risultati in Q RT-PCR.

In futuro, l'individuazione dei potenziali biomarcatori molecolari permetterà di sintetizzare, mediante l'utilizzo delle loro sequenze in vettori eterologhi, le proteine ricombinanti corrispondenti da impiegare per la successiva produzione di anticorpi specifici, da utilizzare in test di *screening* (i.e. kit ELISA). Tuttavia, prima di poter essere applicati in campo dovranno necessariamente essere validati e successivamente testati su campioni in cieco (animali sospetti di trattamento) per poterne comprendere l'affidabilità.

***EFFETTO DEL TRATTAMENTO  
CON PRECURSORI DEGLI STEROIDI (ADD E DHEA)  
SULL'ESPRESSIONE DEGLI ENZIMI  
FARMACO-METABOLIZZANTI IN VITELLONI DA CARNE ED IN  
EPATOCITI IN CULTURA PRIMARIA***



## 6.1. MATERIALI E METODI

### Campioni biologici esperimento *in vivo*

La sperimentazione è stata condotta su 17 bovini da carne di razza Valdostana, di circa 14-16 mesi di età e del peso vivo di circa 400 kg, stabulati presso l'Azienda Agricola "Caron" di Brugine (PD), Stabilimento Utilizzatore dell'Università di Padova.

Gli animali, appena acquistati, sono stati pesati presso l'Azienda, suddivisi in 6 *box* e stabulati quindi a gruppi di 3 sulla base del peso medio. Ciascun *box* era dotato di lettiera morbida in paglia su pavimento in cemento, cambiata una volta alla settimana, e di 1-2 abbeveratoi a pressione. Gli animali sono stati alimentati *ad libitum* con *unifeed*.

Le sostanze utilizzate per questa prova sperimentale sono state le seguenti: androstadienedione (ADD: 1,4-androstadiene-3,17-dione, Steraloids, Newport, USA) e deidroepiandrosterone (DHEA, Steraloids, Newport, USA).

I vitelloni sono stati pertanto sottoposti ai seguenti trattamenti:

- Gruppo A (n = 6): 50 mg/capo *per os* di ADD una volta a settimana per 5 settimane;
- Gruppo D (n = 5\*): 50 mg/capo *per os* di DHEA una volta a settimana per 5 settimane;
- Gruppo K (n = 6): nessun trattamento, gruppo di controllo.

Il farmaco è stato somministrato in capsule con sparaboli direttamente in cavità orale. Le capsule sono state preparate anticipatamente, prima dell'inizio del trattamento, e conservate in frigo a 4°C.

La scelta dei principi attivi, delle dosi e delle modalità di trattamento farmacologico è stata effettuata in base alle indicazioni ricevute dall'Istituto Superiore di Sanità, all'esperienza ed ai risultati ottenuti in altre sperimentazioni analoghe ed alle indicazioni di colleghi dell'Università di Padova e dell'IZS delle Venezie.

Gli animali sono stati sacrificati il giorno successivo la fine del trattamento presso il macello comunale "Longhin" di Piove di Sacco (PD); tutte le fasi di macellazione e di prelievo delle matrici biologiche sono state seguite e coordinate dal veterinario competente dell'ASL n.14.

In sede di macellazione, è stato rimosso il lobo caudato epatico, da cui sono state prelevate in sterilità delle aliquote di circa 100 mg per l'estrazione del mRNA, poste immediatamente in tubi contenenti RNAlater® e poi stoccate a -80°C fino all'utilizzo.

\* A causa di una sintomatologia respiratoria persistente, un animale del gruppo D è stato macellato a parte una settimana prima degli altri, perciò risultano solo 5 anziché 6 animali.

**Coltura primaria di epatociti di bovino****Animali**

Sono state utilizzate due vitelle di 1-2 anni di età e del peso di circa 400 kg che in sede di macellazione sono risultate essere sane e non sottoposte a precedenti trattamenti farmacologici. Subito dopo la fase di iugulamento e dissanguamento, è stato rimosso il lobo caudato epatico (o parte di esso) del peso di circa 100-150 g.

**Reattivi** (forniti da Sigma, Milano, Italia, escluso il glucosio)

- ❖ Glucosio, AppliChem, Milano, Italia
- ❖ Soluzione di Trypan blue 0.4%
- ❖ Collagene tipo I (da coda di ratto)
- ❖ Gelatina 2% sterile
- ❖ Collagenasi tipo IV
- ❖ NaHCO<sub>3</sub> 8.4%
- ❖ Insulina 1 mM
- ❖ Glutamina 200 mM
- ❖ Gentamicina solfato 50 mg/mL
- ❖ Idrocortisone emisuccinato 1 mM
- ❖ Tampone Eurocollins, pH 7.4 contenente: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 42 mM, KCl 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 1 mM, glucosio 0.2 M, EGTA 1 mM
- ❖ Tampone I e II, pH 7.4 contenenti: NaCl 142 mM, KCl 0.5 mM, Hepes 9.2 mM, EGTA 0.5 mM (da aggiungersi solo nel tampone I prima della filtrazione)
- ❖ Tampone III, pH 7.2 contenente: Hepes 9.2 mM, NaCl 66.7 mM, KCl 6.7 mM, CaCl<sub>2</sub> 4.74 mM
- ❖ Tampone IV, pH 7.65 contenente: Hepes 9.3 mM, albumina di siero bovino 2.5%, KCl 5.4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.44 mM, NaCl 0.14 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.34 mM, glucosio 5.5 mM
- ❖ Terreno Hanks, pH 7.4 contenente: KCl 5.4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.44 mM, NaCl 0.4 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.34 mM, MgSO<sub>4</sub>
- ❖ Williams' medium E 1X completo, pH 7.4 (WE) contenente: siero fetale bovino (FCS) non deplementato al 10%, NaHCO<sub>3</sub> 26.6 μM, glutamina 1.67 mM, gentamicina solfato 50 μg/mL, idrocortisone emisuccinato 1 μM
- ❖ Tampone fosfato 0.1 M, pH 7.4

Tutte le soluzioni di *stoc* sono state filtrate con filtri a 0.22 μm (Schleicher&Schuell, Vetrotecnica, Padova, Italia).

I singoli tamponi e il WE, prima di essere portati a pH, sono stati ossigenati per 10 min con carbogeno (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) e quindi sterilizzati con filtri da 0.22 μm (Millipore Steritop, Milano, Italia).

I tamponi ed i media sono stati conservati a 4°C (esclusi gentamicina e FCS che vanno conservati a -20°C) e, prima di essere utilizzati, portati a 37-38°C (con la sola esclusione dell'Eurocollins).

**Preparazione delle piastre di Petri**

- Preparare una soluzione di collagene 1 mg/mL, aggiungendo 24  $\mu$ L di HCl 4N ogni 5 mL di soluzione (per aumentarne la solubilità) e sterilizzarla con filtri da 0.22  $\mu$ m.
- Stendere con uno *scraper* 200  $\mu$ L di collagene in ciascuna piastra da 9 mL (Greiner bio-one, Frickenhausen, Germania).
- Riporre con cura le piastre nei loro sacchetti e conservarle capovolte, al buio, a temperatura ambiente.
- La mattina della coltura, idratare le piastre con 4 mL di Hanks completo; dopo 20 min aspirare il terreno e aggiungere 4 mL di WE non completo.
- Al momento dell'inseminamento aspirare il terreno e procedere.

**Protocollo di perfusione**

Tutti i materiali utilizzati devono essere sterilizzati prima dell'uso.

- Appena prelevato il lobo, perfondere con circa 300-400 mL di tampone Eurocollins a 4°C utilizzando una siringa sterile da 60 mL ed un tubo con un puntale P1000 ad un'estremità.
- Per favorire la diffusione del tampone massaggiare delicatamente il tessuto.
- Una volta perfuso, immergere il fegato in un becker da 1 L contenente lo stesso tampone, coprire con alluminio, conservare in ghiaccio e trasportare in laboratorio.

- Prima dell'arrivo del fegato in laboratorio, disinfettare il circuito di perfusione con alcool diluito e acqua sterile, quindi riempire il sistema con il tampone I.
- Porre il fegato nell'imbuto tipo Buchner (Vetrotecnica, Padova, Italia) sul supporto e, sotto, un becker da 400 mL.
- Con l'ausilio di una pompa peristaltica (Minipulse 3, Gilson, Milano, Italia) perfondere il lobo per 10 min circa al flusso di 10 mL/min con 1 L di tampone I, ossigenato con carbogeno e riscaldato a 37-38°C (bagno termostato GTR2000 Iix, ISCO, Vetrotecnica, Padova, Italia).

E' importante controllare visivamente la qualità della perfusione, calcolare i tempi di perfusione dei vari tamponi, tenere gli aghi il più a fondo possibile nel vaso epatico, controllare con una cartina tornasole (Sigma, Milano, Italia) il pH di ogni tampone (se necessario correggerlo con NaOH 4N e HCl 4N).

- Perfondere con tampone II (0.5 L) con un flusso di 100 mL/min per circa 8 min.
- Prendere la collagenasi precedentemente pesata e, sotto cappa, aggiungerla ai 200 mL di tampone III, agitando manualmente il flacone per mescolare. L'attività della collagenasi deve essere  $\geq 65.000$  UI.
- Lasciare il refrigerante vuoto e, nella siringa sottostante, 50 mL di tampone II, quindi versare con una siringa da 60 mL sterile dal foro del "troppo-pieno" i 200 mL di tampone III con la collagenasi, precedentemente riscaldati a 37°C.
- Perfondere con ricircolo il fegato con tampone III addizionato della collagenasi per circa 20 min con flusso 100 mL/min.
- Terminata la perfusione porre il fegato in una ciotola di vetro.

- Sotto cappa ed in massima sterilità, tagliare con forbici la glissoniana e sminuzzare il parenchima epatico, togliendo i pezzi più grossi e poco perfusi.
- Aggiungere circa 50 mL di tampone IV riscaldato a 37°C.
- Versare la parte liquida ed i frammenti meno voluminosi nella beuta da 500 mL a collo largo, facendo altri 3-4 risciacqui col tampone IV, fino a raggiungere un volume di 200-250 mL.
- Aggiungere 50 mL del tampone III addizionato di collagenasi usato precedentemente.
- Mettere la beuta, chiusa con un tappo contenente una pipetta da 2 mL, nel bagno termostato a 37°C, collegare il tubo del carbogeno all'estremità della pipetta ed incubare per 10 min, agitando moderatamente ogni 1-2 min.
- Tornare sotto cappa e filtrare con un filtro di nylon con diametro di 120 µm (Vetrotecnica, Padova, Italia) fissato su un imbuto Buchner, aiutandosi con uno *scraper* e versando il filtrato in un becker da 600 mL.
- Aliquotare in tubi sterili da centrifuga da 50 mL (centrifuga Sorvall super T21, rotore SL 50-T, diametro 22.2 cm) a 100xg per 5 min a 20°C senza freno.
- Aspirare il surnatante e aggiungere WE senza FCS in funzione del peso del *pellet* (3.85 – 3.38 mg/mL).
- Risospendere il *pellet* e centrifugare nuovamente.
- Ripetere i lavaggi per 3 volte.
- Riunire i *pellets* in un becker da 1 L e mescolare con un'ancoretta sterile su di un agitatore magnetico.

**CIRCUITO  
DI PERFUSIONE**

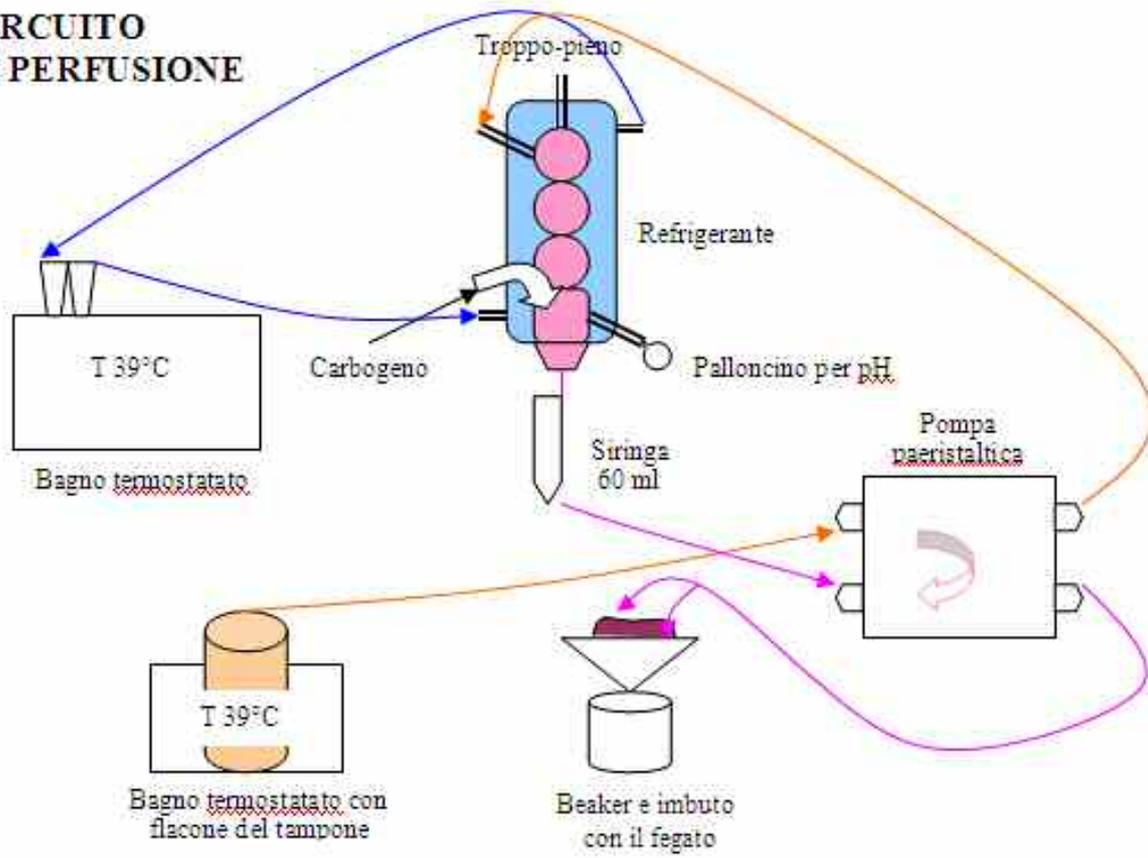


Figura 6.1.1: rappresentazione schematica del circuito di perfusione utilizzato.

**Conta delle cellule e piastramento**

- Eseguire la conta delle cellule vive su 100 µL di sospensione, uniti a 20 µL di Trypan blue 0.4% (se necessario, se le cellule da contare sono troppo concentrate, diluire 1:10 la sospensione con Trypan, prendendone 50 µL e aggiungendoli a 450 µL di WE), usando una camera di Bürker: il Trypan blue è un colorante che viene escluso dalle cellule vive.

$$Y \text{ cellule/mL} = \frac{\text{numero cellule in 3 quadrati} \times 10^4}{3}$$

$$Y \text{ cellule/mL} \times \text{fattore diluizione} = Z \text{ cellule/mL}$$

$$Z \text{ cellule/mL} \times \text{mL di sospensione disponibili} = W \text{ cellule totali}$$

$$W \text{ cellule} : 9 \times 10^6 \text{ cellule/piastra} = K \text{ piastre utilizzabili}$$

$$K \text{ piastre} \times 9 \text{ mL/piastra} = Q \text{ mL di sospensione (da diluire)}$$

- Diluire a  $10^6$  cellule/mL con terreno WE completo (con FCS).
- Piastrare  $9 \times 10^6$  cellule/mL (9 mL/piastra), mantenendo la sospensione in agitazione.
- Incubare (incubatore Infrabator® F.lli Galli, Vetrotecnica, Padova, Italia) le piastre a 37°C in atmosfera controllata (CO<sub>2</sub> al 5%).
- Cambiare terreno dopo 3 ore, usando WE completo senza aggiunta di FCS.
- Cambiare terreno ogni 24 ore fino all'arresto della coltura.
- Prima della sostituzione del medium, suddividere le piastre in lotti, prelevare 100 µL di terreno da ogni piastra e metterli in tubi tipo Eppendorf da 0.5 mL, contrassegnate dal numero del lotto e dal tempo trascorso tra il prelievo e l'inizio della coltura; conservare le provette a 4°C: tali aliquote serviranno per il test del rilascio della lattato deidrogenasi (LDH).

**Trattamenti**

- Preparare sotto cappa le soluzioni madre (100X):
  - ❖ Soluzione ADD 10 mM (p.m. 284.4): 28.44 mg in 10 mL di MeOH
  - ❖ Soluzione DHEA 10 mM (p.m. 288.43): 8.653 mg in 3 mL di MeOH
  - ❖ Soluzione di controllo: solo MeOH.

Tutte queste soluzioni madre vanno conservate a -20°C.

- Contrassegnare le piastre con ADD o DHEA a gruppi di 3 (per il metabolismo) o di 2 (per la genomica e metabolomica) indicando il tempo di incubazione (1.5, 3, 6, 24 ore).
- Preparare estemporaneamente le soluzioni composte dalle soluzioni madre diluite all'1% in WE completo, tenendo conto che ne servono 9 mL/piastra.

Le soluzioni finali pertanto corrispondono a: ADD 100 µM, DHEA 100 µM, MeOH 1%

- Cambiare il terreno utilizzando quello addizionato con le soluzioni qui sopra riportate.
- Incubare secondo una cinetica per 1.5, 3, 6 e 24 ore.

**Arresto della coltura****Piastre per la genomica:**

Per la genomica sono stati processati i monostrati relativi alle incubazioni a 1.5, 3 e 6 ore (2 replicati biologici/tempo/trattamento/coltura), secondo il seguente protocollo:

- Prelevare il rimanente terreno e suddividerlo in aliquote per le analisi dei metaboliti in spettrometria di massa (non oggetto di questa tesi).
- Aggiungere 4 mL/piastra di tampone fosfato 0.1 M pH 7.4.
- Usando uno *scraper* per colture cellulari staccare bene il monostrato.
- Prelevare 4 mL/piastra cercando di lavare bene il fondo della piastra e prelevare ogni frustoletto; splittare il contenuto di ciascuna piastra in due microtubi da 2 mL ben identificati.
- Centrifugare a 1500xg per 5 min a temperatura ambiente: si ottiene così il *pellet* con gli epatociti.
- Aspirare il surnatante con pompa a vuoto.
- Aggiungere in ciascun tubo un quantitativo di RNAlater<sup>®</sup> (200 µL) sufficiente a coprire il *pellet*.
- Conservare a -20°C fino all'uso.

**Piastre per valutazione della citotossicità e del “Drug metabolism” (DM):**

Per la valutazione della citotossicità e del DM (quest'ultimo non oggetto del presente lavoro) sono stati processati i monostrati relativi alle incubazioni per 24 ore (*end point*: 3 replicati biologici/tempo/trattamento/coltura), secondo il seguente protocollo:

- Prelevare 150 µL di terreno da ciascuna piastra per il test di rilascio della LDH a 24h.
- Prelevare il rimanente terreno e suddividerlo in aliquote per le analisi dei metaboliti in spettrometria di massa (non oggetto di questa tesi).
- Aggiungere 4 mL/piastra di tampone fosfato 0.1 M pH 7.4.
- Usando uno *scraper* per colture cellulari staccare bene il monostrato.
- Prelevare 4 mL/piastra cercando di lavare bene il fondo della piastra e prelevare ogni frustoletto; metterli in un tubo Falcon da 50 mL, unendo i contenuti di 3 piastre, segnando i lotti per distinguerli.
- Centrifugare a 250xg per 3 min a temperatura ambiente.
- Eliminare il surnatante.
- Aggiungere altri 2 mL/tubo di tampone fosfato 0.1 M.
- Conservare a -80°C fino alla preparazione delle frazioni subcellulari epatiche.

**Preparazione di frazioni subcellulari epatiche (microsomi e citosol)**

- Estrarre le provette con le sospensioni cellulari conservate a -80°C e scongelarle in ghiaccio.
- Sonicare al 70% la sospensione cellulare per 4 volte consecutive (20 secondi per ogni *step*) utilizzando il sonicatore, la cui sonda deve essere disinfettata con alcool e acqua bidistillata.
- Potterare manualmente con camicia di vetro da 15 mL per 5-6 volte.
- Versare la sospensione in un tubo da centrifuga e bilanciare, aggiungendo tampone fosfato 0.1 M, pH 7.4.
- Centrifugare a 13.000 rpm per 20 min (centrifuga Beckman, rotore 70ti) per eliminare nuclei ed altri frustoli cellulari di grandi dimensioni.
- Prelevare il surnatante e porlo in un altro tubo, quindi bilanciare nuovamente i tubi.
- Centrifugare a 39.000 rpm (centrifuga Beckman, rotore 70ti) per 60 min.
- Prelevare 150 µL/tubo di citosol per il test di rilascio della LDH e porli in un tubo tipo Eppendorf.
- Aliquotare 500 µL/tubo di citosol in due criotubi distinti.
- Risospendere il *pellet* con i microsomi con 500 µL di tampone di conservazione (composto da glicerolo al 20% in tampone fosfato 0.1 M pH 7.4), cercando di staccarlo bene con l'ausilio di una siringa da 1 mL.
- Aliquotare la sospensione microsomiale in criotubi da 2 mL.
- Conservare i criotubi a -80°C fino al momento delle analisi.

**Test di citotossicità di rilascio della LDH nel terreno di coltura**

*L' LDH è un enzima citosolico che rappresenta un ottimo marker dell'integrità delle membrane cellulari. La sua attività viene stimata misurando la scomparsa del NADH, conseguente alla trasformazione dell'acido piruvico in acido lattico, a 340 nm.*

**Reattivi**

- ❖ Tampone potassio fosfato 50 mM pH 7.3 (Sigma, Milano, Italia)
- ❖ NADH 4.5 mM (Sigma, Milano, Italia)
- ❖ Piruvato sodico 6 mM (Sigma, Milano, Italia)

**Procedimento**

- Porre in una cuvetta da 1.5 mL, 1350 µL di tampone potassio fosfato, 50 µL di soluzione di NADH, 50 µL di soluzione di piruvato sodico ed agitare per inversione.
- Aggiungere 50 µL di surnatante o di citosol e agitare.
- Monitorare il decremento di assorbanza a 340 nm per 5 min (10 cicli da 30 secondi), leggendo contro aria a 25°C (temperatura ambiente).
- Calcolare la percentuale di citotossicità, ovvero:

$$\% \text{ rilascio LDH} = \frac{\Delta \text{ abs/min del surnatante}}{\Delta \text{ abs/min del citosol} + \Delta \text{ abs/min del surnatante}} \times 100$$

Dove:  $\Delta \text{ abs} = (\text{abs } 5' - \text{abs } 0') / 5$

**Estrazione RNA totale da campioni di fegato**

E' stata utilizzata la medesima procedura riportata a pagina 106.

**Estrazione RNA da cellule****Reattivi**

- ❖ TRIzol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen, Milano, Italia): fenolo acido-guanidina tiocianato
- ❖ Cloroformio, J.T. Baker, Mallinckrodt, Olanda
- ❖ Isopropanolo, J.T. Baker, Mallinckrodt, Olanda
- ❖ Etanolo assoluto, J.T. Baker, Mallinckrodt, Olanda
- ❖ Etanolo (Applichem, Milano, Italia) 70-75%
- ❖ Acqua DEPC, AppliChem, Milano, Italia
- ❖ Acetato di Sodio (Sigma, Milano, Italia) 3 M, pH 5.2

**Procedimento**

- Scongellare i campioni in ghiaccio.
- Centrifugare a 5.000xg per 5 min a 4°C.
- Aspirare RNAlater<sup>®</sup> con pompa a vuoto.
- Sotto cappa, aggiungere in ciascun tubo 1 mL di TRIzol<sup>®</sup> freddo ed incubare per 5 min.
- Risospendere il *pellet* ed omogeneizzarlo per aspirazioni successive con la pipetta; eventualmente vortexare se il *pellet* non si disgrega a sufficienza.
- Incubare 5 min in ghiaccio.
- Aggiungere 200 µL di cloroformio e agitare vigorosamente per inversione almeno 15 secondi. Incubare 5 min a temperatura ambiente.
- Centrifugare a 4°C per 15 min a 12.000xg.
- Trasferire la fase acquosa che presenta l'RNA in un nuovo microtubo da 1.5 mL: di solito tale fase corrisponde al 60% del volume di TRIzol<sup>®</sup> utilizzato.
- Aggiungere un ugual volume di isopropanolo, agitare per inversione ed incubare per 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugare a 4°C per 15 min a 12.000xg.
- Eliminare il surnatante utilizzando una pompa a vuoto.
- Riprendere il *pellet* in 1 mL di etanolo al 70-75% e vortexare fintanto che il *pellet* non si stacca dal fondo.
- Centrifugare a 4°C per 5 min a 7.500xg.
- Eliminare il surnatante utilizzando una pompa a vuoto e lasciar asciugare il *pellet* all'aria.
- Dissolvere il *pellet* in 250 µL di acqua DEPC ed attendere fino a completo scioglimento in ghiaccio e vortexare.

- Aggiungere 2 volumi di etanolo assoluto (500  $\mu\text{L}$ ) e 1/10 di volume di Acetato di sodio 3M, pH 5.2 e mescolare.
- Lasciar precipitare per 30 min a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Centrifugare a  $4^{\circ}\text{C}$  per 15 min a 12.000xg.
- Eliminare il surnatante con pompa a vuoto.
- Far seccare il *pellet* all'aria, al di sotto di una cappa aspirante.
- Dissolvere l'RNA in acqua DEPC utilizzando un volume da minimo 30 a massimo 100  $\mu\text{L}$  (è necessario avere una concentrazione di RNA tra 500 ng/  $\mu\text{L}$  e 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ).
- Preparare aliquote per elettroforesi in gel di agarosio, lettura al NanoDrop e retrotrascrizione.
- Conservare il campione a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Valutazione qualitativa e quantitativa dell'estratto:**

**Elettroforesi su gel di agarosio all'1% e lettura al NanoDrop**

E' stata utilizzata la medesima procedura riportata a pagina 107.

**Trascrizione inversa (RT)**

E' stata utilizzata la medesima procedura riportata a pagina 109.

Per i campioni dell'esperimento *in vivo* sono state preparate delle diluizioni di RNA pari a 200 ng/ $\mu\text{L}$  e sono stati retrotrascritti 2  $\mu\text{g}$  di RNA per campione, come negli esperimenti precedenti.

Per i campioni di epatociti invece, vista la più bassa resa di estrazione, è stato necessario preparare delle diluizioni di RNA pari a 140 ng/ $\mu\text{L}$  al fine di retrotrascrivere 1.4  $\mu\text{g}$  di RNA per ciascuna piastra.

**Selezione geni target**

Nella Tabella 6.1.1, sono riportati i geni selezionati, scelti per le successive analisi.

| <b>Gene target</b> | <b>Nome</b>   | <b>ID GenBank</b> |
|--------------------|---|-------------------|
| CYP1A1             | Citocromo P450 1A1  | XM_588298         |
| CYP1A2             | Citocromo P450 1A2  | XM_591450         |
| CYP2B6             | Citocromo P450 2B6  | NM_001075173      |
| CYP2C9             | Citocromo P450 2C9  | XM_612374         |
| CYP2E1             | Citocromo P450 2E1  | NM_174530         |
| CYP3A4             | Citocromo P450 3A4  | NM_174531         |
| CYP4A11            | Citocromo P450 4A11   | NM_001077908      |
| UGT2B17            | UDP glucuronosil-transferasi 2B17                                     | NM_001075724      |
| GSTA1              | Glutazione-S-transferasi A1   | NM_001078149      |
| DHEA-ST            | DHEA-Solfotransferasi   | XM_613003         |
| 17 $\beta$ HSDII   | 17 $\beta$ -idrossisteroide-deidrogenasi tipo II                      | NM_001075726      |
| CAR                | <i>Constitutive androstan receptor</i>                                | NM_001079768      |
| PXR                | <i>Pregnan X receptor</i>   | XM_582516         |
| RXR $\alpha$       | <i>Retinoid X receptor</i> isoforma $\alpha$                          | XM_881943         |
| HNF4 $\alpha$      | <i>Hepatocyte nuclear factor 4<math>\alpha</math></i>                 | NM_001015557      |
| PPAR $\alpha$      | <i>Peroxisome-proliferator activated receptor <math>\alpha</math></i> | NM_001034036      |

Tabella 6.1.1: Lista dei geni bovini selezionati per il saggio di *Real Time* PCR.

**Scelta dei primers**

Sono state seguite le stesse indicazioni riportate a pagina 111.

**Real Time PCR (Q RT-PCR)**

E' stato seguito lo stesso protocollo riportato a pagina 112. Sono stati messi a punto, in aggiunta rispetto al precedente esperimento, i saggi relativi ai geni: CYP4A11, DHEA-ST, 17 $\beta$ HSDII e PPAR $\alpha$ .

Il cDNA dei campioni dell'esperimento *in vivo*, ottenuto mediante retrotrascrizione di 2  $\mu$ g di RNA, è stato diluito con acqua secondo il rapporto 1:100, mentre il cDNA degli epatociti, ottenuto dalla retrotrascrizione di 1.4  $\mu$ g di RNA, è stato diluito secondo il rapporto 1:70 in acqua; in questo modo è stato mantenuto il rapporto massa-volume tra i due esperimenti ed in ogni pozzetto sono stati caricati 5 ng di cDNA.

L'utilizzo di uno standard di riferimento, aggiunto ai campioni in analisi, risulta importante per verificare l'eventuale presenza di inibitori di PCR o retrotrascrizione che tendono a ridurre l'efficienza del metodo. Come calibratore, per gli epatociti (matrice più sensibile e delicata), è stato utilizzato un campione di fegato di un bovino di controllo, esterno all'esperimento: lo stesso campione è stato amplificato nella stessa piastra per i geni *target* ed il rispettivo *reference*.

**Analisi dei dati ed analisi statistica**

I dati ottenuti dalla Q RT-PCR sono espressi come media  $\pm$  DS (Allegato 3).

Per gli epatociti, i dati vengono espressi come media delle due colture (n = 4 piastre per CTRL e ADD, n = 2 piastre per DHEA). Vista la variabilità inter-coltura riscontrata, probabilmente dovuta alla tecnica di isolamento degli epatociti, è stato necessario utilizzare dei fattori di correzione diversi per ciascun gene, per poter trattare globalmente i dati dell'esperimento *in vitro*.

I dati di espressione genica ottenuti dalla quantificazione relativa, sono stati oggetto di analisi per l'identificazione degli *outliers* mediante l'utilizzo del test statistico di Grubbs, chiamato anche metodo *extreme studentized deviate*.

Successivamente l'analisi statistica per evidenziare differenze tra i gruppi di controllo e quelli sottoposti a trattamento, è stata eseguita dal programma Graph Pad InStat 2.01 (San Diego, CA, USA), utilizzando il test ANOVA (*one-way Analysis of Variance*). In caso di variazioni significative è stato eseguito il post-test Tukey (*Tukey-Kramer multiple comparisons test*). Eventuali differenze tra i gruppi vengono considerate significative solo per valori di  $p < 0.05$ .

## 6.2. RISULTATI

### Indici di vitalità cellulare

Per la valutazione della vitalità cellulare nelle colture primarie di epatociti, si fa principalmente riferimento alla morfologia cellulare ed al test di rilascio della LDH.

Per quanto concerne l'aspetto morfologico, dopo 4 ore di coltura le cellule non mostravano granulazioni e risultavano ben adese allo strato di collagene deposto. Dopo 24 ore, le cellule risultavano ancora adese, mentre a 48 ore di distanza dall'inizio del trattamento (48 ore di distanza dal piastramento), le piastre della seconda coltura hanno cominciato a manifestare il sintomo tipico di sofferenza, cioè la presenza di granuli rifrangenti, il distacco parziale del monostrato e la presenza di piccoli detriti cellulari attaccati alla piastra o dispersi nel terreno di coltura.

Questi risultati sono stati anche confermati dai valori ottenuti dal test di rilascio della LDH a 24 ore di trattamento secondo il protocollo di Bergmeyer *et al.* (1963). Questo test permette di valutare indirettamente la vitalità cellulare misurando l'attività di tale enzima nel medium di coltura e nel citosol degli epatociti. L'attività enzimatica viene valutata spettrofotometricamente, misurando la diminuzione del valore di assorbanza a 340 nm (lunghezza d'onda di assorbimento caratteristica del cofattore NADH) in un intervallo di 5 minuti; tale diminuzione consegue all'ossidazione del NADH a NAD<sup>+</sup>, operata proprio dall'enzima. I risultati ( $\Delta\text{abs}/\text{min}$  nel terreno) vengono espressi come % di rilascio di LDH. Questo test permette di rilevare il danno alla membrana cellulare e, pur richiedendo tempi di esecuzione lunghi, è da preferirsi perché più accurato dei test di esclusione dei coloranti (i.e. trypan blue). I valori ottenuti nelle due colture sono riportati nella tabella 6.2.1 e nella figura 6.2.1.

|                      | Campione    | Trattamento            | $\Delta\text{abs}/\text{min}$<br>terreno | $\Delta\text{abs}/\text{min}$<br>citosol | LDH totale | Citotossicità<br>(%) |
|----------------------|-------------|------------------------|--|--|------------|----------------------|
| <b>I</b><br>coltura  | <b>A1</b>   | ADD 100 $\mu\text{M}$  | -0,00556                                 | -0,02667                                 | -0,03222   | 17,24                |
|                      | <b>A2</b>   | ADD 100 $\mu\text{M}$  | -0,00533                                 | -0,03667                                 | -0,04200   | 12,70                |
|                      | <b>DH1</b>  | DHEA 100 $\mu\text{M}$ | -0,00556                                 | -0,02778                                 | -0,03333   | 16,67                |
|                      | <b>DH2</b>  | DHEA 100 $\mu\text{M}$ | -0,00600                                 | -0,05333                                 | -0,05933   | 10,11                |
|                      | <b>IC1</b>  | contr MeOH 1%          | -0,00578                                 | -0,02556                                 | -0,03133   | 18,44                |
|                      | <b>IC2</b>  | contr MeOH 1%          | -0,00533                                 | -0,02889                                 | -0,03422   | 15,58                |
|                      | <b>K3</b>   | contr MeOH 1%          | -0,00511                                 | -0,02000                                 | -0,02511   | 20,35                |
|                      | <b>K4</b>   | contr MeOH 1%          | -0,00675                                 | -0,03222                                 | -0,03897   | 17,32                |
| <b>II</b><br>coltura | <b>A3</b>   | ADD 100 $\mu\text{M}$  | -0,00356                                 | -0,01044                                 | -0,01400   | 25,40                |
|                      | <b>A4</b>   | ADD 100 $\mu\text{M}$  | -0,00222                                 | -0,00778                                 | -0,01000   | 22,22                |
|                      | <b>DH3</b>  | DHEA 100 $\mu\text{M}$ | -0,00311                                 | -0,00711                                 | -0,01022   | 30,43                |
|                      | <b>DH4</b>  | DHEA 100 $\mu\text{M}$ | -0,00356                                 | -0,00733                                 | -0,01089   | 32,65                |
|                      | <b>IIC1</b> | contr MeOH 1%          | -0,00267                                 | -0,01178                                 | -0,01444   | 18,46                |
|                      | <b>IIC2</b> | contr MeOH 1%          | -0,00289                                 | -0,00889                                 | -0,01178   | 24,53                |
|                      | <b>K5</b>   | contr MeOH 1%          | -0,00311                                 | -0,00556                                 | -0,00867   | 35,90                |
|                      | <b>K6</b>   | contr MeOH 1%          | -0,00778                                 | -0,00644                                 | -0,01422   | 54,69                |

Tabella 6.2.1: Calcolo della % di citotossicità delle piastre delle due colture a 24 ore dall'inizio del trattamento. Vengono riportate le variazioni di abs/min di terreno e citosol, la LDH totale e la % di rilascio della LDH.

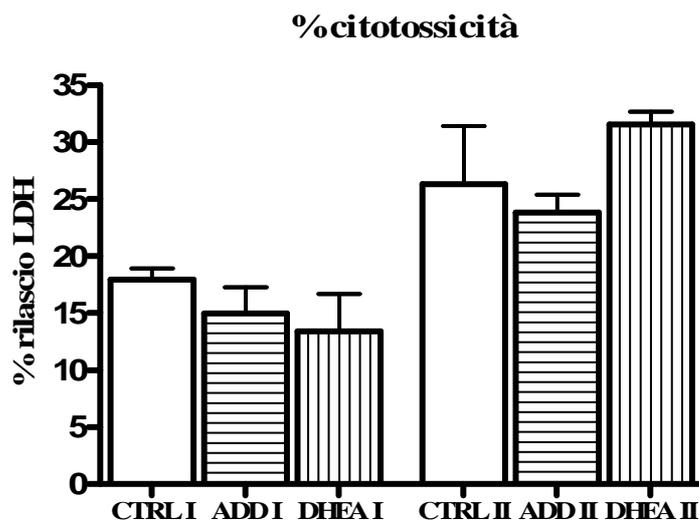


Figura 6.2.1: Grafico della % di rilascio della LDH nei diversi lotti di piastre di entrambe le colture a 24 ore dall'inizio del trattamento. CTRL = piastre di controllo; ADD = piastre incubate con ADD 100  $\mu$ M; DHEA = piastre incubate con DHEA 100  $\mu$ M; I e II = prima e seconda coltura, rispettivamente.

Nel nostro esperimento in media gli epatociti della prima coltura hanno evidenziato una percentuale di citotossicità pari al 17%, mentre quelli della seconda (escludendo K6 in cui il monostrato si era completamente sfaldato) pari al 27%.

Nel complesso, l'isolamento di epatociti di bovino mediante l'utilizzo del protocollo sopra riportato, ha permesso di ottenere in media  $459.76 \pm 119.59 \times 10^6$  cellule per coltura, con una vitalità complessiva dell' $88.0 \pm 4.23\%$ , calcolata per mezzo della colorazione con trypan blue.

#### **Valutazione qualitativa e quantitativa dell'RNA estratto**

La qualità dell'RNA estratto è stata valutata per tutti i campioni mediante elettroforesi su gel di agarosio 1%: come si può vedere in figura 6.2.2, in cui vengono presentati degli esempi di estratti appartenenti sia all'esperimento *in vivo* sia a quello *in vitro*, i campioni di RNA estratti da fegato hanno presentato una maggior resa di estrazione rispetto ai campioni degli epatociti, essendo più concentrati. In entrambi i casi sono state confermate l'assenza di DNA genomico contaminante, e la presenza di una parziale degradazione (un blando effetto di *smear*, intensità della banda del 28S simile a quella del 18S), che però non hanno precluso l'amplificabilità del template.

Gli epatociti sono risultati una matrice più difficile da estrarre rispetto al fegato *in toto* ed in alcuni casi è stato necessario ricorrere ad una duplice estrazione per ottenere un template più idoneo.

Nelle tabelle 6.2.2 e 6.2.3 invece vengono riportati i dati di concentrazione e di purezza degli estratti, ottenuti dalla lettura al NanoDrop.

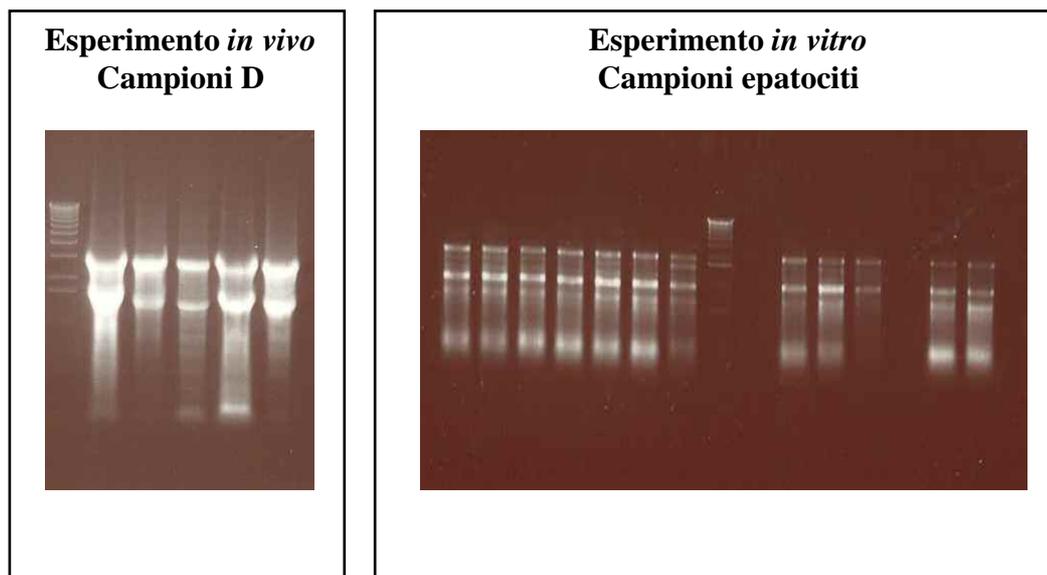


Figura 6.2.2: Elettroforesi in gel di agarosio 1% rispettivamente a sinistra degli estratti di fegato appartenenti agli animali del gruppo D (sottoposti a trattamento con DHEA) e, a destra, di alcuni campioni di epatociti della seconda coltura.

| Gruppo   | Campione | Concentrazione RNA ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) | Abs 260/280 | Abs 260/230 |
|----------|----------|--|-------------|-------------|
| <b>K</b> | K759     | 2.29   | 2.02        | 2.04        |
|          | K869     | 1.26   | 2.01        | 1.73        |
|          | K428     | 0.93   | 2.01        | 2.06        |
|          | K75      | 1.87   | 2.01        | 2.02        |
|          | K11      | 0.55   | 2.01        | 2.07        |
|          | K105     | 0.73   | 2.03        | 1.95        |
| <b>A</b> | A77      | 1.22   | 2.00        | 2.15        |
|          | A745     | 2.97   | 2.01        | 2.00        |
|          | A482     | 1.11   | 1.99        | 2.06        |
|          | A485     | 0.22   | 1.99        | 1.63        |
|          | A622     | 0.81   | 2.06        | 1.86        |
|          | A503     | 0.58   | 2.03        | 0.97        |
| <b>D</b> | D537     | 0.96   | 2.05        | 2.09        |
|          | D604     | 2.79   | 2.02        | 2.10        |
|          | D918     | 1.40   | 2.06        | 2.03        |
|          | D159     | 2.13   | 2.01        | 1.81        |
|          | D359     | 0.69   | 1.97        | 1.49        |

Tabella 6.2.2: concentrazione e purezza dei campioni di RNA estratti a partire dai campioni di fegato appartenenti ai vitelloni oggetto di studio dell'esperimento *in vivo*. Vengono riportati i dati di concentrazione in  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ed i rapporti tra i valori di assorbanza a 260, 280 e 230 nm. Per tutti i campioni, sono stati processati circa 70-80 mg di tessuto e l'RNA estratto è stato risospeso in 50-100  $\mu\text{L}$  di acqua.

| Gruppo      | Campione | Concentrazione RNA ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) | Abs 260/280 | Abs 260/230 |
|-------------|----------|--|-------------|-------------|
| <b>CTRL</b> | IC6X     | 0.899  | 1.92        | 2.12        |
|             | IC6Y     | 1.186  | 1.93        | 2.13        |
|             | IIC6X    | 0.291  | 1.90        | 1.91        |
|             | IIC6Y    | 0.215  | 1.88        | 1.86        |
| <b>ADD</b>  | IA6X     | 0.951  | 1.94        | 1.88        |
|             | IA6Y     | 1.060  | 1.92        | 1.91        |
|             | IIA6X    | 0.313  | 1.85        | 2.08        |
|             | IIA6Y    | 0.306  | 1.89        | 2.05        |
| <b>DHEA</b> | DHEA X   | 0.196  | 1.90        | 1.60        |
|             | DHEA Y   | 0.344  | 1.86        | 1.87        |

Tabella 6.2.3: concentrazione e purezza dei campioni di RNA estratti a partire dai campioni di epatociti in coltura primaria. Vengono riportati i dati di concentrazione in  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ed i rapporti tra i valori di assorbanza a 260, 280 e 230 nm. Per tutti i campioni, sono stati processati circa 9 milioni di cellule e l'RNA estratto è stato risospeso in 35-80  $\mu\text{L}$  di acqua.

**Disegno dei primers**

Per questa tesi sperimentale sono stati selezionati dei geni *target* in più rispetto agli esperimenti precedenti, coinvolti nel metabolismo degli steroidi oggetto di studio. Per tali geni, così come descritto in precedenza, è stata effettuata l'analisi bioinformatica al fine di raccogliere le informazioni necessarie per il disegno dei *primers*. Sono state quindi disegnate le coppie di oligonucleotidi, secondo i criteri riportati nella sezione Materiali e Metodi. Nella tabella 6.2.4 vengono riportate le sequenze dei *primers* ottenuti, con le loro specifiche. Le sequenze dei *primers* per il gene contrassegnato da un asterisco sono state gentilmente concesse da Cantiello (dati personali). Per tutti i geni individuati come *target*, la verifica della corrispondenza delle sequenze dei *primers* e dell'amplificato con il gene bovino oggetto di studio (mediante *Blastn*), ha dato esito positivo.

| Gene             | Sequenza <i>primers</i> 5' → 3' | Lunghezza Primer (bp) | T <sub>m</sub> (°C) | %GC | Lunghezza amplicone (bp) |
|------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------|-----|--------------------------|
| <b>CYP4A11</b>   | F : AACTCGGTTTGCGCCAAGT         | 19                    | 59                  | 50  | 78                       |
|                  | R : CCCGATGCAGTTCCTGGAT         | 19                    | 59                  | 58  |                          |
| <b>DHEA-ST</b>   | F : GAAGGCCACGTCTCATCAG         | 20                    | 59                  | 60  | 81                       |
|                  | R : GATCACCTTGGCCTTGGATTT       | 21                    | 59                  | 48  |                          |
| <b>17βHSDII*</b> | F : CTTACTTTTCTGGCCAAGAGTTGTTA  | 26                    | 58                  | 38  | 75                       |
|                  | R : CAAACCCAGAATCACAACCTGTT     | 23                    | 60                  | 43  |                          |
| <b>PPARα</b>     | F : GGATGTCCCATAACGCGATT        | 20                    | 58                  | 50  | 81                       |
|                  | R : CACACGTAAGGATTTCTGCCTTC     | 23                    | 59                  | 48  |                          |

Tabella 6.2.4: *Primers* per il saggio in Q RT-PCR dei geni *target*. Per ciascun *primer forward* (F) e *reverse* (R) vengono riportate la sequenza, la lunghezza (bp), la temperatura di *melting* (T<sub>m</sub>) e la % in GC, nonché la lunghezza dell'amplicone atteso (bp).

\* Cantiello (dati personali)

**Messa a punto dei saggi in Q RT-PCR**

Per verificare la funzionalità delle varie coppie di *primers* indicate sopra e per determinarne la concentrazione ottimale d'uso è stata effettuata la messa a punto impiegando come template un *pool* di cDNA di fegato di bovino e di epatociti diluito 1:100, come riportato negli esperimenti precedenti.

L'amplificazione è avvenuta con successo in tutti i geni; inoltre mediante l'analisi delle curve di dissociazione, è stata verificata l'assenza di sintesi di dimeri di *primers*, nonché l'amplificazione di un solo amplicone della temperatura di *melting* attesa.

E' stata successivamente valutata l'efficienza di amplificazione, allestendo le relative e specifiche curve degli standard, utilizzando cinque diverse diluizioni seriali (rapporto 1:10) dello stesso *pool* di cDNA.

In tabella 6.2.5 si possono osservare i risultati delle curve standard dei nuovi geni, messi a punto per questo esperimento; la linearità viene mantenuta in un *range* dinamico compreso complessivamente tra 7 e 10 cicli.

| Gene            | Combinazione primers (F/R) | Slope | R <sup>2</sup> | Efficienza (%) |
|-----------------|----------------------------|-------|----------------|----------------|
| <b>CYP4A11</b>  | 900/300                    | -3.28 | 0.99           | 101.8          |
| <b>DHEA-ST</b>  | 300/300                    | -3.20 | 0.99           | 105.4          |
| <b>17βHSDII</b> | 900/300                    | -3.31 | 0.99           | 100.5          |
| <b>PPARα</b>    | 900/900                    | -3.27 | 0.99           | 102.2          |

Tabella 6.2.5: Condizioni di messa a punto dei saggi in Q RT-PCR dei geni *target*: combinazione dei *primers* e curve standard. Vengono riportate le concentrazioni dei *primers* F e R risultate essere più performanti (miglior efficienza di amplificazione) ed i parametri delle curve standard (*slope*, cioè il coefficiente angolare della retta e R<sup>2</sup>, cioè l'indice di regressione lineare) con il relativo calcolo dell'efficienza di reazione.

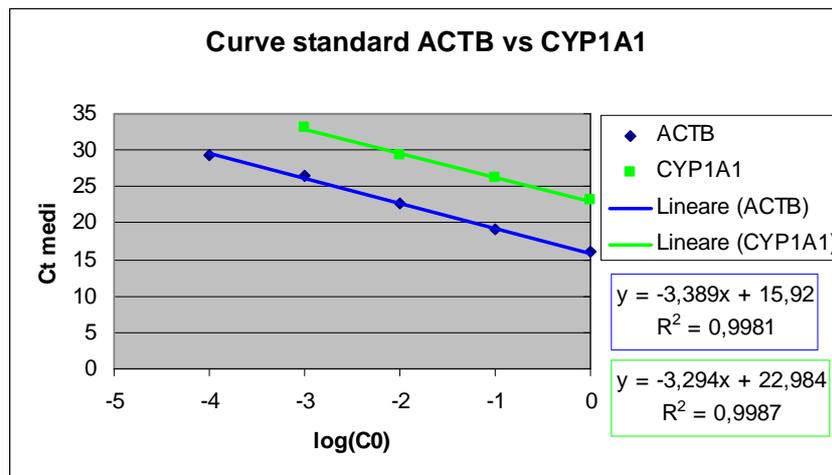
### Scelta gene reference

Anche per questo esperimento è stata effettuata un'analisi per la scelta del gene da utilizzarsi come *reference*. Tra i geni presi in considerazione si annoverano quelli maggiormente impiegati come standard di riferimento interno in studi di questo tipo (Toffolatti *et al.*, 2006): beta-actina (ACTB), gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi (GAPDH) e glucosio-6-fosfato-deidrogenasi (G6PDH). La prima sequenza corrisponde ad una proteina ubiquitaria del citoscheletro, la seconda ad un enzima ubiquitario coinvolto nel metabolismo dei carboidrati (glicolisi e gluconeogenesi), la terza ad un altro enzima coinvolto nel normale metabolismo dei carboidrati ma anche responsabile della protezione dei globuli rossi da danni cellulari e distruzione prematura. Tra i tre geni, anche in questo caso, è stata scelta l'ACTB, poiché nel fegato la sua espressione rimane pressoché costante (l'analisi statistica tra i gruppi non è risultata statisticamente significativa) ed anche nei tessuti *target* della steroidogenesi nel maschio (testicolo) non risente del trattamento con ADD e DHEA (Lopparelli *et al.*, dati personali).

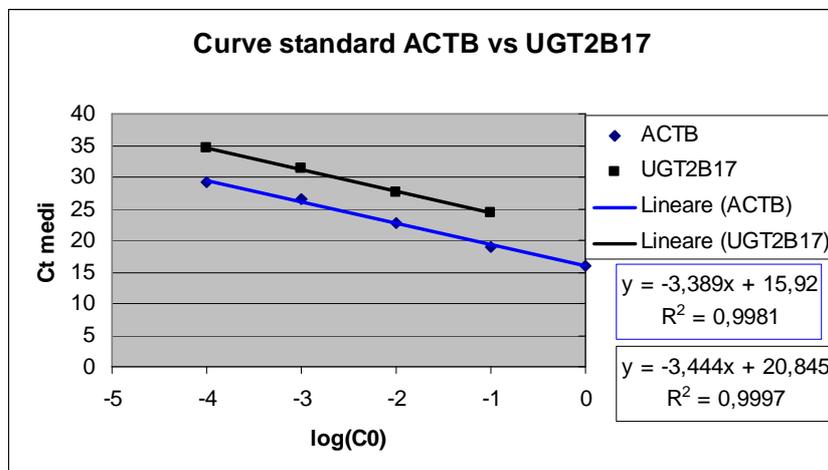
Invece, il gene B2M, valutato negli altri esperimenti, non è stato qui considerato quale possibile gene *housekeeping* in quanto nel ratto è risultato essere modulato dal trattamento con DHEA (Gu *et al.*, 2003).

Qui di seguito (figura 6.2.3) vengono riportati degli esempi di curve di validazione in cui nello stesso grafico vengono presentate le curve degli standard rispettivamente del gene *target* e del gene *housekeeping* utilizzato come riferimento. Si può notare, anche in questo caso, che le curve sono pressoché parallele. Tale analisi è stata effettuata per tutti i geni *target* oggetto di studio, ma qui vengono riportati solo degli esempi.

A



B



C

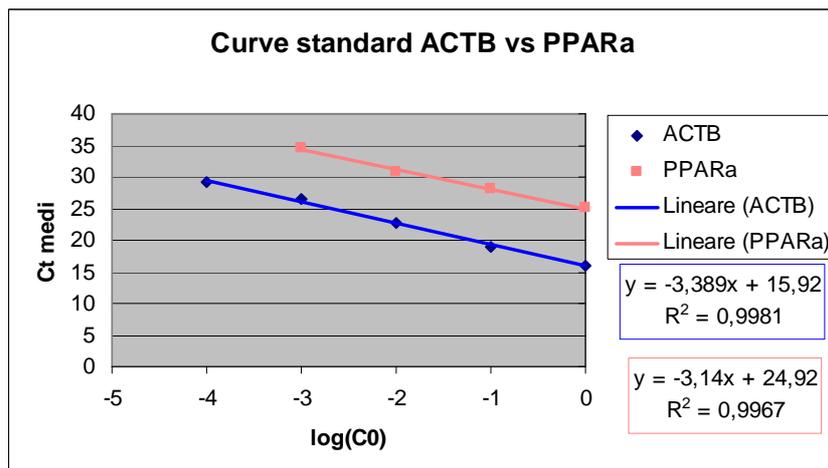


Figura 6.2.3: Grafici delle curve standard dei geni *target* (A) CYP1A1, (B) UGT2B17, (C) PPARa confrontate con quella del gene ACTB, selezionato come *reference*. In ordinata sono riportati i valori dei Ct medi per ogni triplicato, mentre in ascissa la concentrazione dello standard di cDNA in scala logaritmica. A lato di ciascun grafico sono riportate le equazioni delle curve, le quali evidenziano che l'inclinazione è simile e pertanto le rette sono pressoché parallele.

**Effetto del trattamento con ADD e DHEA in un sistema *in vivo* ed in epatociti in coltura primaria**

La quantificazione relativa dei campioni è stata eseguita applicando il metodo ipotizzato da Livak e Schmittgen. Nella tabella 6.2.6 vengono riportati i dati medi di quantificazione relativa di ciascun gruppo appartenente all'esperimento *in vivo* per ciascun gene oggetto di analisi. I dati dei campioni di fegato in singolo invece vengono riportati nell'allegato 3.

| Gene                             | <i>Fold-change</i> (U.A.) |                                |                   |
|----------------------------------|---------------------------|--------------------------------|-------------------|
|                                  | media $\pm$ SEM           |                                |                   |
|                                  | <b>K</b>                  | <b>A</b>                       | <b>D</b>          |
| <b>CYP1A1</b>                    | 1.000 $\pm$ 0.093         | 1.004 $\pm$ 0.106              | 0.875 $\pm$ 0.215 |
| <b>CYP1A2</b>                    | 1.000 $\pm$ 0.069         | 1.451 $\pm$ 0.203              | 0.982 $\pm$ 0.183 |
| <b>CYP2B6</b>                    | 1.000 $\pm$ 0.200         | 0.724 $\pm$ 0.271              | 0.865 $\pm$ 0.570 |
| <b>CYP2C9</b>                    | 1.000 $\pm$ 0.148         | 1.095 $\pm$ 0.151              | 0.903 $\pm$ 0.303 |
| <b>CYP2E1</b>                    | 1.000 $\pm$ 0.191         | 0.375 $\pm$ 0.114              | 0.720 $\pm$ 0.303 |
| <b>CYP3A4</b>                    | 1.000 $\pm$ 0.107         | 1.505 $\pm$ 0.184              | 1.038 $\pm$ 0.216 |
| <b>CYP4A11</b>                   | 1.000 $\pm$ 0.147         | 1.113 $\pm$ 0.184              | 0.750 $\pm$ 0.190 |
| <b>UGT2B17</b>                   | 1.000 $\pm$ 0.120         | 0.875 $\pm$ 0.100              | 0.871 $\pm$ 0.038 |
| <b>GSTA1</b>                     | 1.000 $\pm$ 0.095         | 1.059 $\pm$ 0.225              | 1.018 $\pm$ 0.125 |
| <b>DHEA-ST</b>                   | 1.000 $\pm$ 0.128         | 1.309 $\pm$ 0.183              | 1.033 $\pm$ 0.140 |
| <b>17<math>\beta</math>HSDII</b> | 1.000 $\pm$ 0.112         | 0.907 $\pm$ 0.103              | 0.921 $\pm$ 0.248 |
| <b>CAR</b>                       | 1.000 $\pm$ 0.123         | 1.346 $\pm$ 0.121              | 0.896 $\pm$ 0.172 |
| <b>PXR</b>                       | 1.000 $\pm$ 0.157         | 1.107 $\pm$ 0.063 <sup>c</sup> | 0.572 $\pm$ 0.115 |
| <b>RXR<math>\alpha</math></b>    | 1.000 $\pm$ 0.086         | 1.100 $\pm$ 0.081              | 0.833 $\pm$ 0.080 |
| <b>HNF4<math>\alpha</math></b>   | 1.000 $\pm$ 0.130         | 1.146 $\pm$ 0.091              | 0.745 $\pm$ 0.099 |
| <b>PPAR<math>\alpha</math></b>   | 1.000 $\pm$ 0.234         | 1.331 $\pm$ 0.049 <sup>c</sup> | 0.631 $\pm$ 0.113 |

Tabella 6.2.6: Risultati Q RT-PCR esperimento “**IN VIVO**” espressi come *fold-change* rispetto al gruppo di controllo.

Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey

c = A vs D; c: p<0.05

Anche per gli epatociti la quantificazione relativa dei campioni è stata eseguita applicando il medesimo metodo. I dati che si ottengono vengono infine normalizzati sul controllo allo stesso tempo (incubazione per 6 ore) ed espressi quindi in unità arbitrarie (*fold-change* rispetto al controllo che presenta un valore medio pari a 1). Nella tabella 6.2.7 vengono riportati i dati medi di quantificazione relativa di ciascun gruppo appartenente all'esperimento *in vitro* per ciascun gene oggetto di analisi. I dati dei campioni di epatociti in singolo invece vengono riportati nell'allegato 3.

| Gene                             | <i>Fold-change</i> (U.A.)         |                                  |                   |
|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------|
|                                  | media $\pm$ SEM                   |                                  |                   |
|                                  | CTRL                              | ADD                              | DHEA              |
| <b>CYP1A1</b>                    | 1.000 $\pm$ 0.106 <sup>dd,e</sup> | 0.367 $\pm$ 0.098                | 0.472 $\pm$ 0.028 |
| <b>CYP1A2</b>                    | 1.000 $\pm$ 0.081                 | 0.957 $\pm$ 0.273                | 0.713 $\pm$ 0.110 |
| <b>CYP2B6</b>                    | 1.000 $\pm$ 0.069                 | 1.770 $\pm$ 0.111                | 2.598 $\pm$ 0.632 |
| <b>CYP2C9</b>                    | 1.000 $\pm$ 0.099 <sup>eee</sup>  | 1.107 $\pm$ 0.152 <sup>fff</sup> | 2.948 $\pm$ 0.092 |
| <b>CYP2E1</b>                    | 1.000 $\pm$ 0.063 <sup>e</sup>    | 1.014 $\pm$ 0.171 <sup>f</sup>   | 0.323 $\pm$ 0.028 |
| <b>CYP3A4</b>                    | 1.000 $\pm$ 0.201                 | 1.065 $\pm$ 0.122                | 1.525 $\pm$ 0.053 |
| <b>CYP4A11</b>                   | 1.000 $\pm$ 0.082                 | 1.085 $\pm$ 0.204                | 2.068 $\pm$ 0.664 |
| <b>UGT2B17</b>                   | 1.000 $\pm$ 0.134                 | 1.179 $\pm$ 0.064 <sup>f</sup>   | 0.611 $\pm$ 0.008 |
| <b>GSTA1</b>                     | 1.000 $\pm$ 0.080 <sup>ee</sup>   | 1.342 $\pm$ 0.103 <sup>f</sup>   | 1.813 $\pm$ 0.063 |
| <b>DHEA-ST</b>                   | 1.000 $\pm$ 0.117 <sup>ee</sup>   | 1.299 $\pm$ 0.127 <sup>f</sup>   | 1.928 $\pm$ 0.100 |
| <b>17<math>\beta</math>HSDII</b> | 1.000 $\pm$ 0.139 <sup>e</sup>    | 1.323 $\pm$ 0.069                | 1.978 $\pm$ 0.458 |
| <b>CAR</b>                       | 1.000 $\pm$ 0.061 <sup>e</sup>    | 0.774 $\pm$ 0.158 <sup>f</sup>   | 3.987 $\pm$ 2.070 |
| <b>PXR</b>                       | 1.000 $\pm$ 0.024 <sup>eee</sup>  | 0.733 $\pm$ 0.103 <sup>fff</sup> | 4.199 $\pm$ 0.805 |
| <b>RXR<math>\alpha</math></b>    | 1.000 $\pm$ 0.033 <sup>ee</sup>   | 0.920 $\pm$ 0.045 <sup>ff</sup>  | 1.637 $\pm$ 0.281 |
| <b>HNF4<math>\alpha</math></b>   | 1.000 $\pm$ 0.069                 | 1.405 $\pm$ 0.088                | 1.570 $\pm$ 0.363 |
| <b>PPAR<math>\alpha</math></b>   | 1.000 $\pm$ 0.105 <sup>ee</sup>   | 0.922 $\pm$ 0.095 <sup>ff</sup>  | 2.290 $\pm$ 0.515 |

Tabella 6.2.7: Risultati Q RT-PCR esperimento “**IN VITRO**” espressi come *fold-change* rispetto al gruppo di controllo allo stesso tempo (6h)

Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey

d = CTRL vs ADD;

dd: p<0.01

e = CTRL vs DHEA;

e: p<0.05, ee: p<0.01, eee: p<0.001

f = ADD vs DHEA;

f: p<0.05, ff: p<0.01, fff: p<0.001

Qui di seguito sono riportati i grafici dei geni che, dopo l'analisi statistica dei valori di espressione relativa, sono risultati significativamente modulati dal trattamento con i due composti, rispettivamente per l'esperimento a (*in vivo*) e b (*in vitro*).

Tra le due isoforme di CYP1A1 selezionate, solo l'isoforma inducibile CYP1A1 è risultata modulata dal trattamento con ADD e DHEA, tuttavia solo nel caso dell'esperimento *in vitro*. Infatti, entrambi i composti nel sistema *in vitro* hanno determinato un'inibizione statisticamente significativa dell'espressione di questa isoforma, più spiccata nel caso dell'ADD ( $p < 0.01$  CTRL vs ADD e  $p < 0.05$  CTRL vs DHEA; vedi figura 6.2.4).

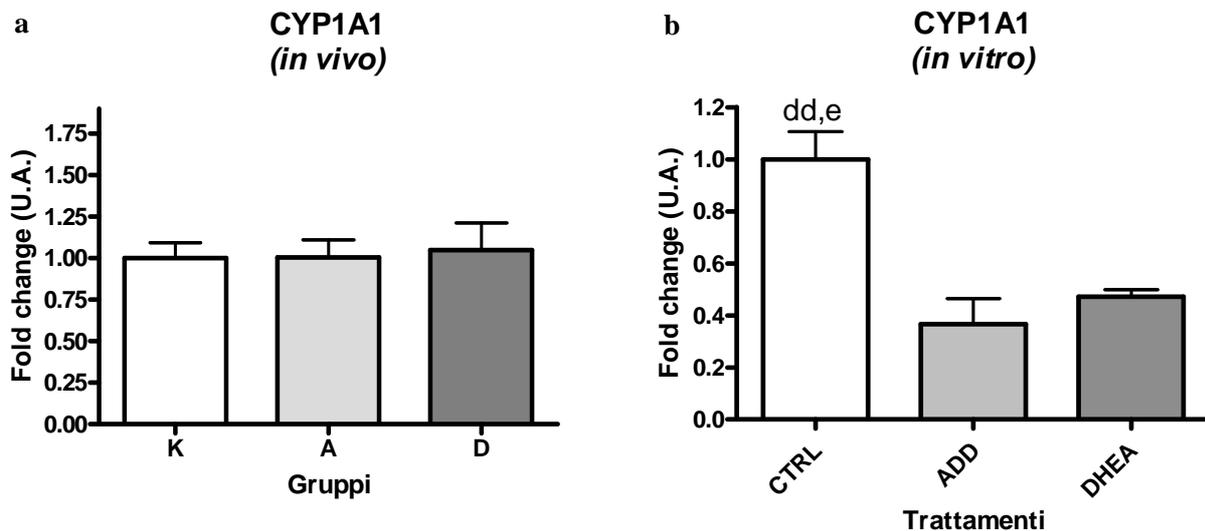


Figura 6.2.4: Espressione di CYP1A1 a seguito del trattamento con ADD e DHEA (a) nel fegato di vitelloni (sistema *in vivo*) e (b) in epatociti in coltura primaria (sistema *in vitro*). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM rispetto al corrispondente gruppo di controllo (K e CTRL; media = 1). Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey  
d = CTRL vs ADD; dd:  $p < 0.01$  e = CTRL vs DHEA; e:  $p < 0.05$

Anche nel caso dei citocromi CYP2B6 e CYP2C9 il trattamento nel sistema *in vivo* non ha sortito alcun effetto. Negli epatociti invece, i due composti hanno determinato un'induzione del CYP2B6, più spiccata da parte del DHEA, seppur non significativa a causa dell'eccessiva variabilità biologica evidenziata; il DHEA, invece, ha determinato un incremento significativo dell'espressione del CYP2C9 sia rispetto alle piastre di controllo, sia rispetto alle piastre incubate con ADD ( $p < 0.001$ , CTRL vs DHEA e ADD vs DHEA) come si evince dalla figura 6.2.5).

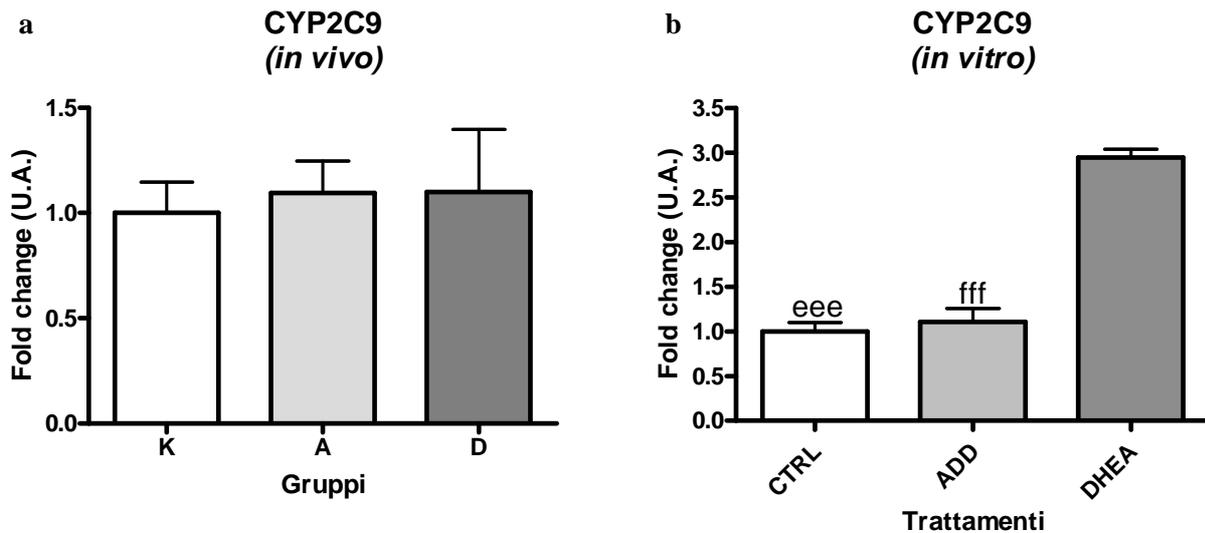


Figura 6.2.5: Espressione di CYP2C9 a seguito del trattamento con ADD e DHEA (a) nel fegato di vitelloni (sistema *in vivo*) e (b) in epatociti in coltura primaria (sistema *in vitro*). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM rispetto al corrispondente gruppo di controllo (K e CTRL; media = 1). Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey e = CTRL vs DHEA; eee:  $p < 0.001$  f = ADD vs DHEA; fff:  $p < 0.001$

L'espressione del CYP2E1 nel fegato bovino cosiccome quella del CYP2B6, risente molto della variabilità interindividuale e per questo motivo le differenze evidenziate nel sistema *in vivo* sono ai limiti della significatività: appare infatti un *trend* all'inibizione per entrambe le molecole, ma più consistente nel caso della somministrazione di ADD. Nella coltura primaria, invece, l'inibizione del CYP2E1 a seguito del trattamento con DHEA appare statisticamente significativa ( $p < 0.05$  CTRL vs DHEA e ADD vs DHEA: vedi figura 6.2.6). Questa stessa molecola ha modulato positivamente negli epatociti l'espressione di CYP3A4 e CYP4A11 ma non in modo significativo.

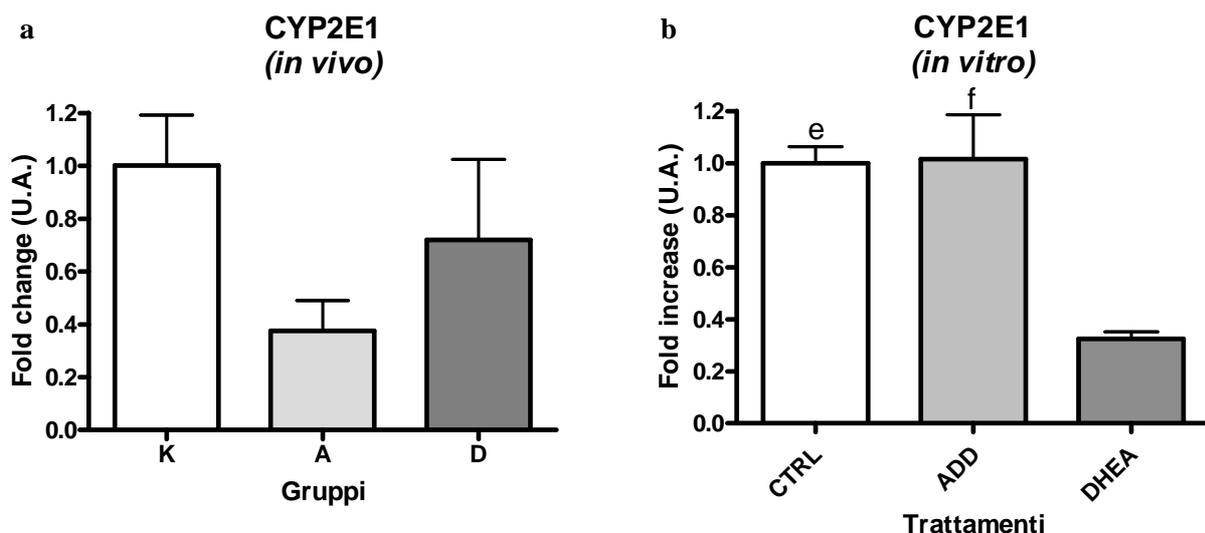


Figura 6.2.6: Espressione di CYP2E1 a seguito del trattamento con ADD e DHEA (a) nel fegato di vitelloni (sistema *in vivo*) e (b) in epatociti in coltura primaria (sistema *in vitro*). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM rispetto al corrispondente gruppo di controllo (K e CTRL; media = 1). Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey. e = CTRL vs DHEA; e:  $p < 0.05$  f = ADD vs DHEA; f:  $p < 0.05$

Per quanto riguarda invece gli enzimi di fase II considerati (UGT2B17, GSTA1 e DHEA-ST), nel sistema *in vivo* non sono state evidenziate delle differenze di alcun tipo. Nel sistema *in vitro*, invece, l'ADD non ha sortito alcun effetto di rilievo, mentre l'incubazione degli epatociti per 6 ore con DHEA, ha determinato un'inibizione pari alla metà rispetto al controllo dell'espressione dell'UGT2B17 ( $p < 0.05$  ADD vs DHEA) ed un'induzione di un fattore di 1.75 volte di GSTA1 e DHEA-ST ( $p < 0.01$  CTRL vs DHEA e  $p < 0.05$  ADD vs DHEA: vedi figure 6.2.7, 6.2.8 e 6.2.9).

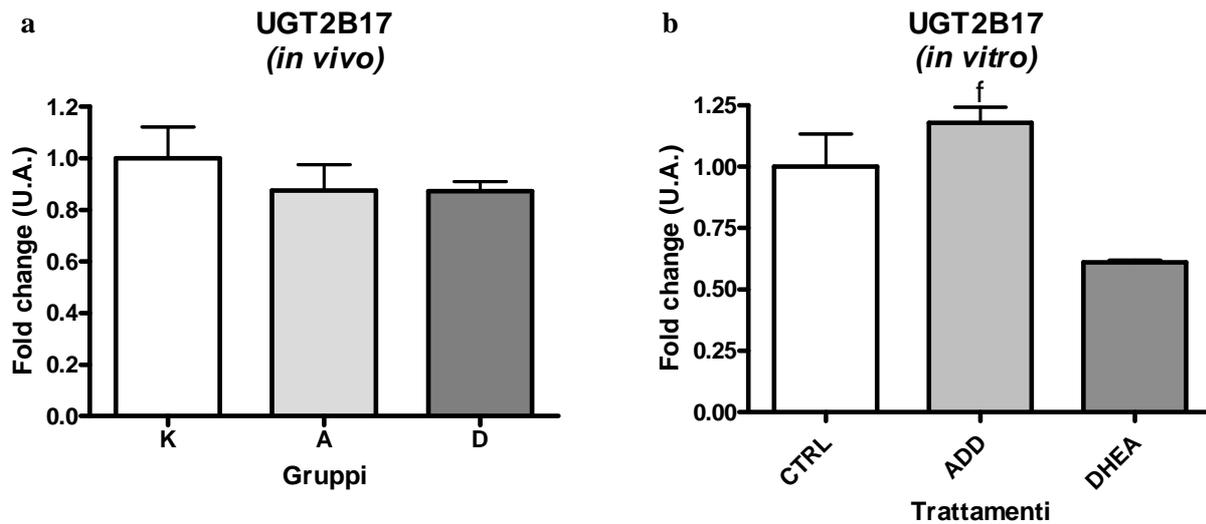


Figura 6.2.7: Espressione di UGT2B17 a seguito del trattamento con ADD e DHEA (a) nel fegato di vitelloni (sistema *in vivo*) e (b) in epatociti in coltura primaria (sistema *in vitro*). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM rispetto al corrispondente gruppo di controllo (K e CTRL; media = 1). Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey  
f = ADD vs DHEA; f:  $p < 0.05$

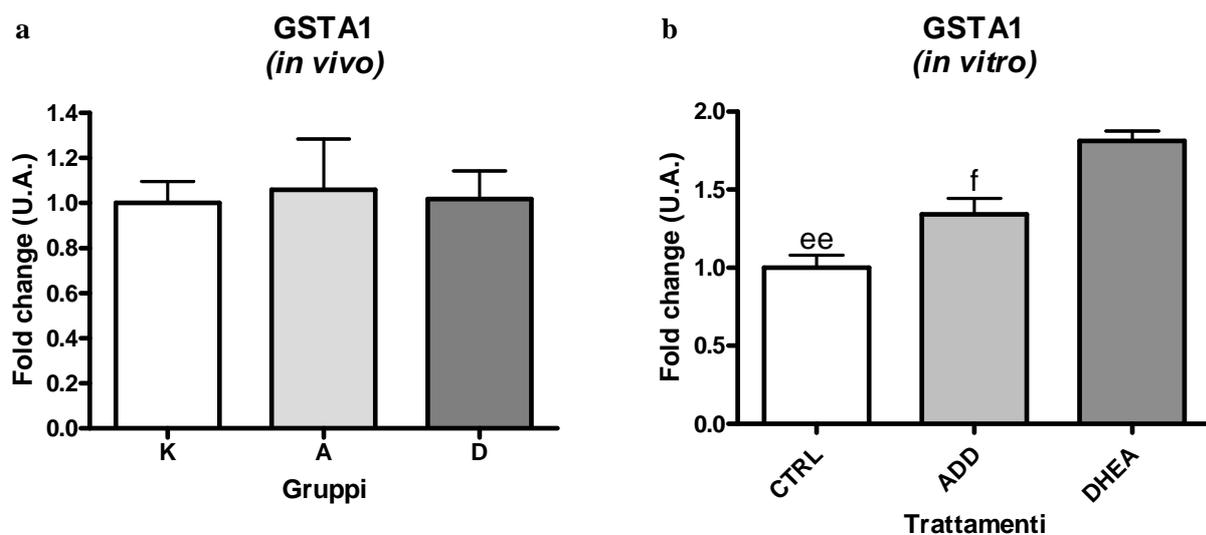


Figura 6.2.8: Espressione di GSTA1 a seguito del trattamento con ADD e DHEA (a) nel fegato di vitelloni (sistema *in vivo*) e (b) in epatociti in coltura primaria (sistema *in vitro*). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM rispetto al corrispondente gruppo di controllo (K e CTRL; media = 1). Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey  
e = CTRL vs DHEA; ee:  $p < 0.01$  f = ADD vs DHEA; f:  $p < 0.05$

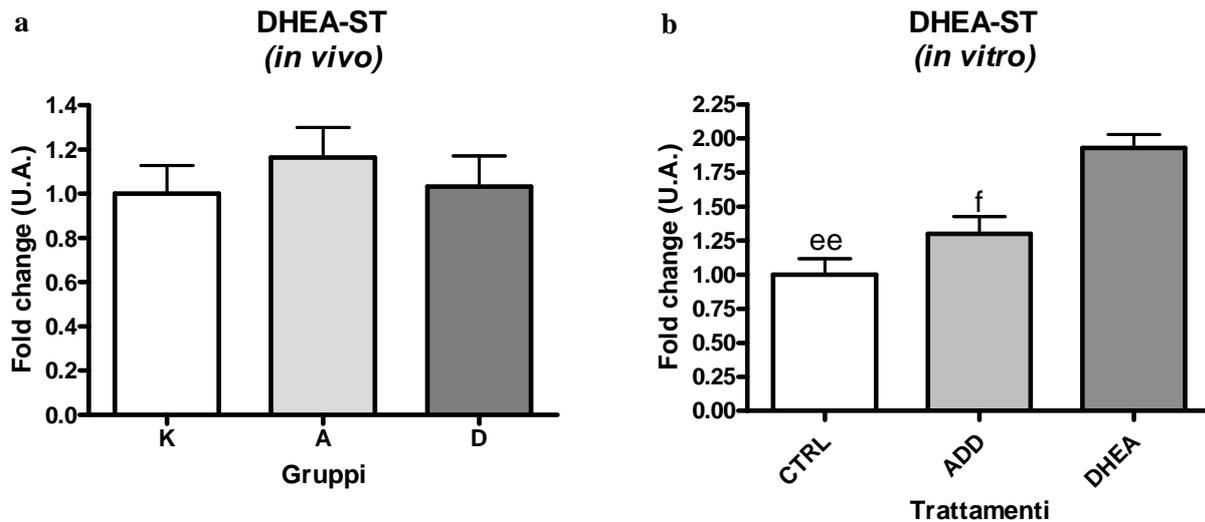


Figura 6.2.9: Espressione di DHEA-ST a seguito del trattamento con ADD e DHEA (a) nel fegato di vitelloni (sistema *in vivo*) e (b) in epatociti in coltura primaria (sistema *in vitro*). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM rispetto al corrispondente gruppo di controllo (K e CTRL; media = 1). Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey e = CTRL vs DHEA; ee:  $p < 0.01$  f = ADD vs DHEA; f:  $p < 0.05$

La  $17\beta$ HSD di tipo II è un enzima coinvolto nella steroidogenesi di testosterone, estradiolo, 5-androstenediolo e diidrotosterone; si ritiene inoltre responsabile della conversione dell'ADD in  $17\beta$ -boldenone. Nel sistema *in vivo* questo enzima non viene modulato dal trattamento, mentre negli epatociti subisce un'induzione che segue il *trend* CTRL>ADD>DHEA, raggiungendo la significatività nelle piastre incubate con DHEA 100  $\mu$ M ( $p < 0.05$  CTRL vs DHEA: figura 6.2.10).

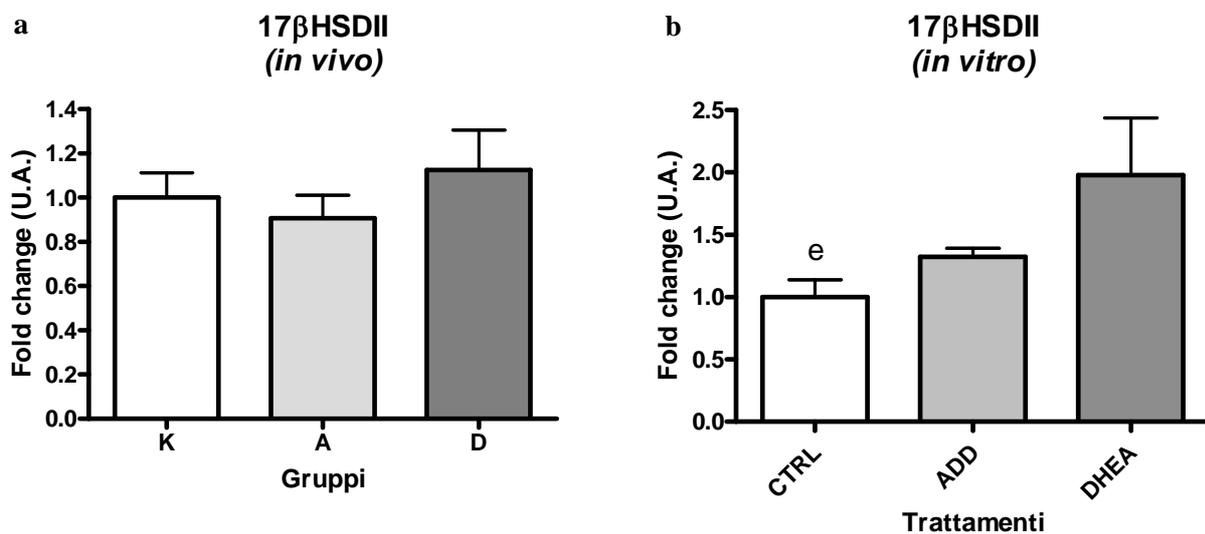


Figura 6.2.10: Espressione di  $17\beta$ HSDII a seguito del trattamento con ADD e DHEA (a) nel fegato di vitelloni (sistema *in vivo*) e (b) in epatociti in coltura primaria (sistema *in vitro*). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM rispetto al corrispondente gruppo di controllo (K e CTRL; media = 1). Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey. e = CTRL vs DHEA; e:  $p < 0.05$

Per quanto riguarda invece i recettori nucleari CAR, PXR, RXR $\alpha$  e PPAR $\alpha$ , la somministrazione dei due composti ai vitelloni non ha provocato variazioni nei profili di espressione, eccetto per PXR e PPAR $\alpha$ , nel gruppo trattato con 50 mg/capo di DHEA dove si è osservato un'inibizione significativa rispetto al gruppo trattato con ADD secondo lo stesso dosaggio ( $p < 0.05$  ADD vs DHEA). *In vitro*, l'espressione di tutti i sopra citati geni (compreso HNF4 $\alpha$  anche se non in modo significativo), ha subito un incremento pari a 1.5 - 4 volte nelle piastre incubate con DHEA ( $p < 0.05$  CTRL vs DHEA e ADD vs DHEA per CAR,  $p < 0.01$  CTRL vs DHEA e ADD vs DHEA per PXR,  $p < 0.01$  CTRL vs DHEA e ADD vs DHEA per RXR $\alpha$  e PPAR $\alpha$ : vedi figure 6.2.11, 6.2.12, 6.2.13 e 6.2.14).

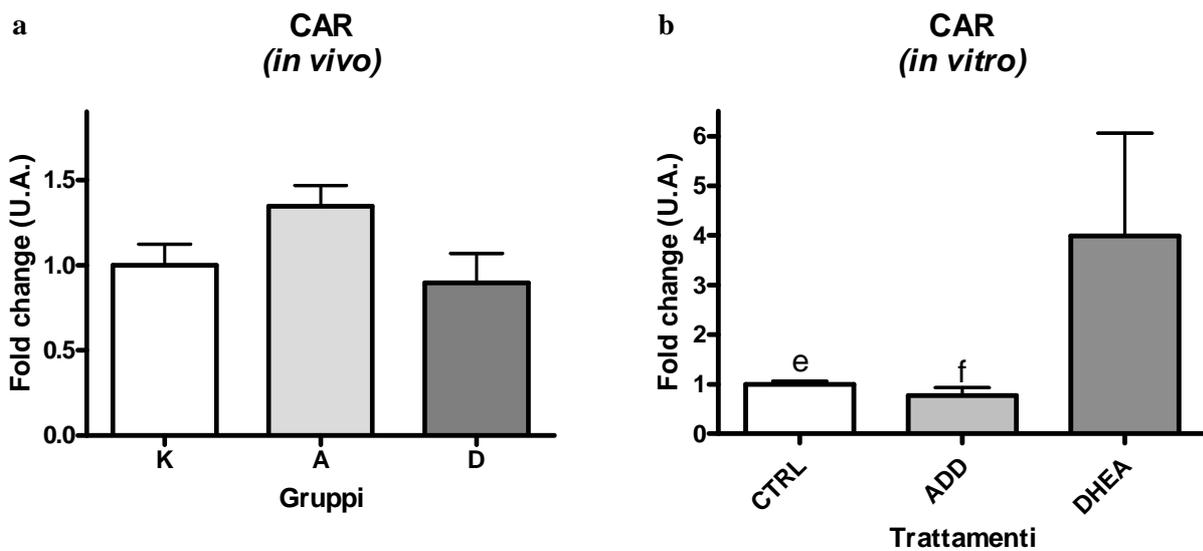


Figura 6.2.11: Espressione di CAR a seguito del trattamento con ADD e DHEA (a) nel fegato di vitelloni (sistema *in vivo*) e (b) in epatociti in coltura primaria (sistema *in vitro*). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM rispetto al corrispondente gruppo di controllo (K e CTRL; media = 1). Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey e = CTRL vs DHEA; e:  $p < 0.05$  f = ADD vs DHEA; f:  $p < 0.05$

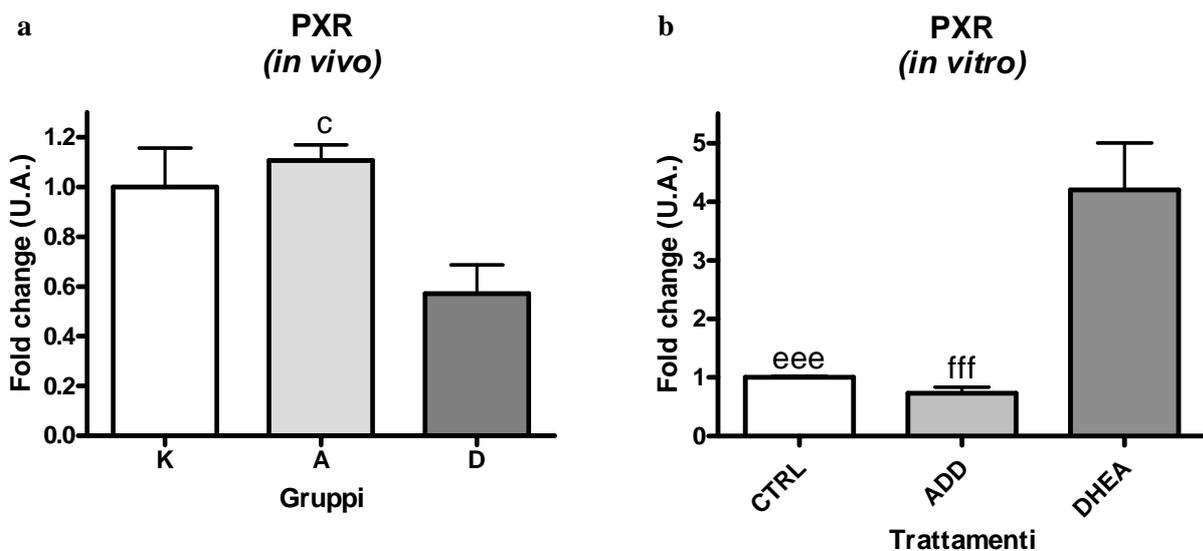


Figura 6.2.12: Espressione di PXR a seguito del trattamento con ADD e DHEA (a) nel fegato di vitelloni (sistema *in vivo*) e (b) in epatociti in coltura primaria (sistema *in vitro*). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM rispetto al corrispondente gruppo di controllo (K e CTRL; media = 1). Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey c = A vs D; c:  $p < 0.05$  e = CTRL vs DHEA; eee:  $p < 0.001$  f = ADD vs DHEA; fff:  $p < 0.001$

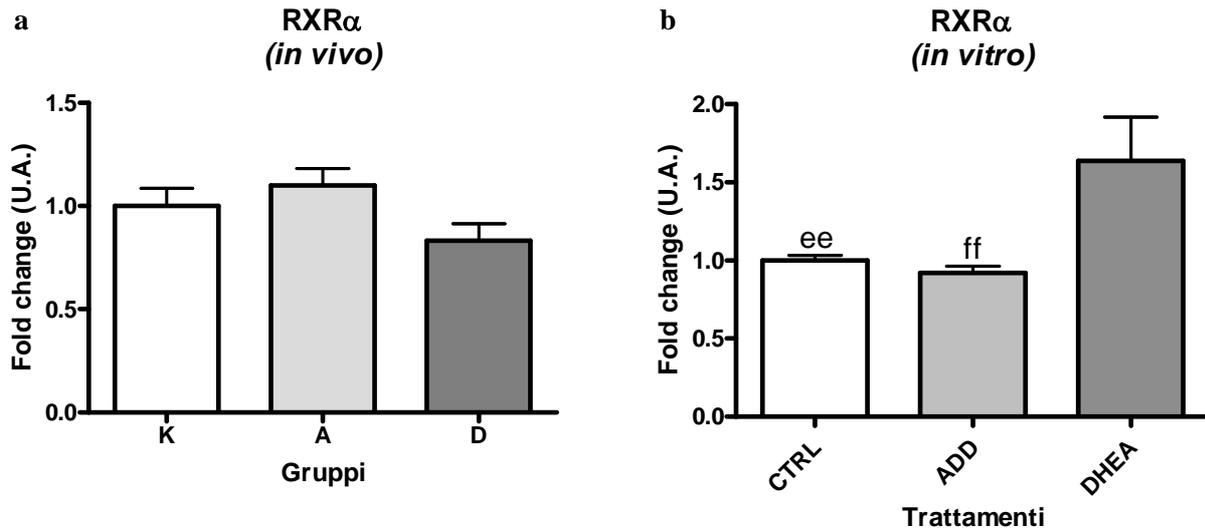


Figura 6.2.13: Espressione di RXR $\alpha$  a seguito del trattamento con ADD e DHEA (a) nel fegato di vitelloni (sistema *in vivo*) e (b) in epatociti in coltura primaria (sistema *in vitro*). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM rispetto al corrispondente gruppo di controllo (K e CTRL; media = 1). Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey e = CTRL vs DHEA; ee: p<0.01 f = ADD vs DHEA; ff: p<0.01

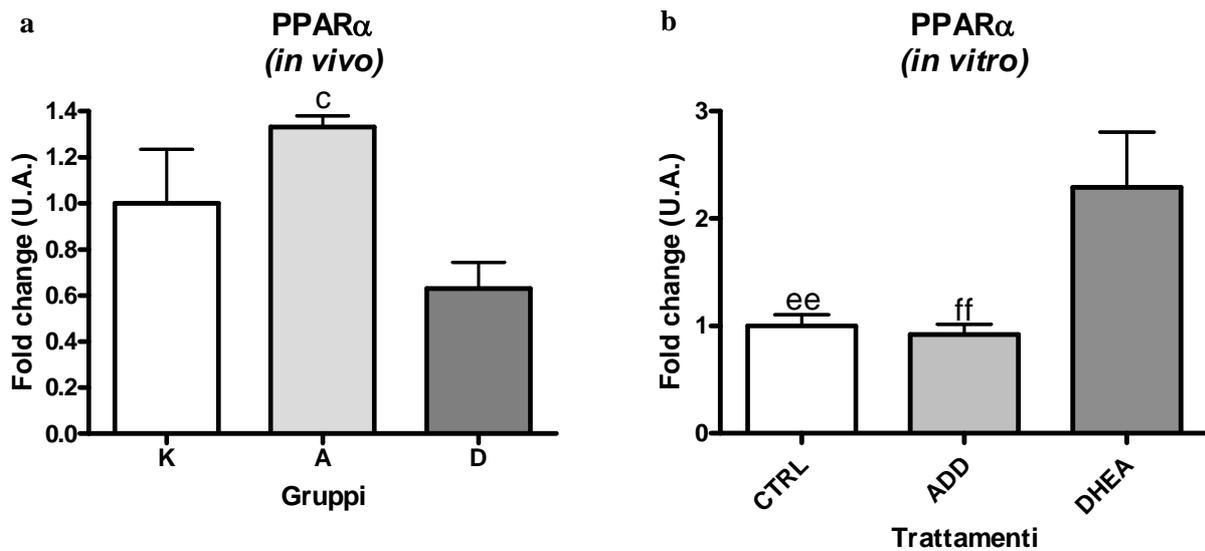


Figura 6.2.14: Espressione di PPAR $\alpha$  a seguito del trattamento con ADD e DHEA (a) nel fegato di vitelloni (sistema *in vivo*) e (b) in epatociti in coltura primaria (sistema *in vitro*). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM rispetto al corrispondente gruppo di controllo (K e CTRL; media = 1). Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey c = A vs D; c: p<0.05 e = CTRL vs DHEA; ee: p<0.01 f = ADD vs DHEA; ff: p<0.01

### 6.3. DISCUSSIONE

Ad oggi, per lo studio del Drug Metabolism (DM), sono disponibili molti sistemi *in vitro*, che comprendono le preparazioni microsomiali, le fettine di fegato, le linee cellulari di epatoma e le colture primarie di epatociti. Quando si valutano le biotrasformazioni degli xenobiotici per predire il metabolismo epatico *in vivo*, è vantaggioso avere a disposizione un sistema *in vitro* che mantenga le caratteristiche dell'epatocita *in vivo*, con il suo completo corredo di enzimi biotrasformativi, proteine responsabili del legame con i farmaci ed i recettori di membrana. Gli epatociti isolati, a questo proposito, si sono dimostrati molto utili in questo tipo di studi, in particolare per la valutazione delle differenze di specie nel metabolismo, ma purtroppo presentano una durata troppo breve per studi di induzione enzimatica o per valutare reazioni metaboliche molto lente (Montesissa *et al.*, 1996). Negli anni, però, sono stati pubblicati molti studi sull'uso di epatociti primari in specie di interesse veterinario, compresi i ruminanti (Van't Klooster *et al.*, 1992; Kuilman *et al.*, 1998; Kuilman *et al.*, 2000). Gli epatociti in coltura primaria, dal canto loro, rappresentano l'unico modello *in vitro* indicato per gli studi a medio-lungo termine. Questo sistema, infatti, permette di studiare contestualmente la produzione di metaboliti, l'induzione e/o l'inibizione enzimatica, nonché la citotossicità. Ciononostante, anche negli epatociti in coltura primaria, alcune funzioni del DM o altre proprietà delle cellule differenziate vengono mantenute per brevi periodi di tempo: basti pensare per esempio alla diminuzione del contenuto di CYP in seguito alla messa in coltura (Eeckhoutte *et al.*, 2002).

Per quanto riguarda gli animali da reddito, sono stati condotti diversi studi relativi all'ottenimento di colture primarie di epatociti; tra i più recenti si possono annoverare quelli relativi al suino e al coniglio (Eeckhoutte *et al.*, 2002; Sinclair *et al.*, 2005; Schnelzer *et al.*, 2006; Lorenti *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2003; Montesissa *et al.*, 2004; Kunieda *et al.*, 2003).

In questo studio, è stato scelto il metodo della coltura primaria di epatociti per valutare gli effetti sul metabolismo di alcuni precursori endogeni ed esogeni degli steroidi sessuali (DHEA e ADD, rispettivamente), impiegati a scopo illecito nel bovino da carne; successivamente si è voluto confrontare questi risultati con quelli ottenuti *in vivo* in vitelloni trattati a scopo illecito con le stesse molecole.

Innanzitutto, il primo obiettivo è stato quello di mettere a punto nel nostro laboratorio un protocollo standardizzato ed affidabile di isolamento di epatociti di bovino in coltura primaria. Il metodo riportato si basa sulle modalità precedentemente descritte in letteratura per il ratto, il maiale ed i ruminanti, bovino compreso (Seglen, 1976; Van't Klooster *et al.*, 1992; Montesissa *et al.*, 1996; Coulet M *et al.*, 1998; Kuilman *et al.*, 1998; Kuilman *et al.*, 2000). I relativamente bassi valori di rilascio della LDH (17% e 27% rispettivamente nella prima e nella seconda coltura), al di sotto del valore soglia del 30% indicato da Kuilman *et al.* (1998) e l'alta percentuale di vitalità ottenuta (88%) in fase di isolamento, suggeriscono che il sistema *in vitro* adottato in questo lavoro possa essere considerato affidabile ed applicabile negli studi di metabolismo. Nel presente studio è stata valutata la capacità biotrasformativa a livello genico, proteico e di attività catalitica in colture primarie di epatociti incubati con ADD e DHEA 100  $\mu$ M, nonché con il solo veicolo (metanolo all'1%).

L'espressione genica è stata valutata considerando un *panel* di 16 geni del metabolismo ossidativo e coniugativo, nonché i fattori di trascrizione corrispondenti, in piastre incubate per 1.5, 3 e 6 ore secondo una cinetica di reazione: per ogni tempo erano disponibili due duplicati biologici per ciascuna delle due colture (eccetto per il trattamento con DHEA che purtroppo è stato effettuato in duplicato ma in una sola coltura). In questo esperimento sono stati processati contestualmente nel nostro laboratorio i monostrati per la valutazione dell'espressione genica in Q RT-PCR ed i terreni di coltura per la valutazione dei metaboliti prodotti in spettrometria di massa. L'espressione proteica delle isoforme CYP2B e CYP3A e le attività catalitiche corrispondenti (16 $\beta$ -, 6 $\beta$ - e 2 $\beta$ -testosterone idrossilasi) invece sono state valutate nei microsomi a 24 ore di trattamento per conseguire i dati del metabolismo *end-point*. In questo lavoro, ristretto ai risultati dell'espressione genica, non sono stati riportati i dati relativi ai metaboliti prodotti ed agli effetti post-traslazionali perché tuttora in corso di studio ed oggetto di altre future pubblicazioni (Gallina *et al.*, dati personali; Capolongo *et al.*, dati personali; Giantin *et al.*, dati personali). Inoltre, pur essendo state effettuate tutte le analisi ai diversi tempi di incubazione, sono stati qui riportati solo i risultati dell'espressione genica relativi alle 6 ore, periodo di tempo necessario per la manifestazione di effetti apprezzabili e degni di nota.

Il protocollo di estrazione di RNA totale da cellule messo a punto per questo lavoro ha permesso di ottenere un estratto caratterizzato da buoni indici di purezza e da una qualità accettabile (perdita parziale dell'integrità): questa matrice infatti, pur non richiedendo una fase di omogeneizzazione prolungata, è risultata piuttosto delicata e complessa ed ha richiesto, in più di qualche caso, una nuova estrazione per poter conseguire un template idoneo alle successive fasi di amplificazione. Non va infatti tralasciato che nel terreno di coltura possono essere presenti reagenti contaminanti in grado di inibire le fasi di retrotrascrizione ed amplificazione e che devono, per quanto possibile, essere eliminati. L'estratto di RNA a partire da 9 milioni di cellule è risultato comunque più diluito rispetto a quello ottenuto dai campioni di fegato di circa 70-80 mg.

Per la valutazione dell'espressione genica è stato utilizzato un *set* di saggi in Q RT-PCR già utilizzati negli esperimenti precedenti, comprendenti gli enzimi biotrasformativi maggiormente coinvolti nel metabolismo ossidativo e coniugativo bovino nonché alcuni fattori di trascrizione. Per questo lavoro però sono stati messi a punto anche dei saggi specifici per alcuni enzimi ed un recettore nucleare (CYP4A11, DHEA-ST, 17 $\beta$ HSDII e PPAR $\alpha$ ) presumibilmente coinvolti nel metabolismo specifico di ADD e DHEA anche nel bovino. Nel complesso, sono stati messi a punto dei saggi caratterizzati da una buona specificità ed efficienza di amplificazione (compresa nel *range* di accettabilità), che, abbinati ad una scelta mirata del gene *reference*, hanno permesso la quantificazione relativa dei campioni oggetto di analisi.

In generale, da una prima stima delle curve di amplificazione ottenute, è stato evidenziato che i vitelloni presentavano una consistente variabilità individuale sia all'interno dello stesso gruppo (per quanto riguarda i geni *target*), sia tra i diversi gruppi sperimentali (considerando il gene *reference*), mentre i duplicati biologici degli epatociti, nell'ambito della stessa coltura, erano caratterizzati da profili di amplificazione sovrapponibili, che nel caso del gene *reference*, descrivevano un unico fascio di curve compatto. Da questa prima considerazione risulta che il sistema *in vitro* consente l'acquisizione di risultati molto più ripetibili

rispetto al sistema *in vivo*. Tuttavia i dati ottenuti distintamente dalle due colture si discostavano gli uni dagli altri e pertanto, per poter mediare ed analizzare i dati, è stato necessario utilizzare dei fattori di correzione tra le due colture.

Scendendo più nel dettaglio, la quantificazione relativa dei trascritti considerati in campioni di fegato appartenenti a vitelloni di razza Valdostana, trattati sperimentalmente con 50 mg/capo di ADD o DHEA, non ha permesso di rilevare alcun effetto di rilievo: non ha determinato infatti alcuna variazione a carico dell'espressione degli enzimi di fase I, confermando quanto evidenziato in precedenza dall'immuno-elettroforesi delle isoforme CYP1A, CYP2B, CYP2C e CYP3A e dalle attività catalitiche relative (Giantin *et al.*, dati personali; Carletti e Capolongo, dati personali).

L'unico effetto, consecutivo alla somministrazione di ADD è stata quella di inibire, anche se non in modo significativo, l'espressione del CYP2E1: questo risultato potrebbe essere parzialmente giustificato dal risultato ottenuto in uno studio effettuato da Zamaratskaia *et al.* (2007), nel quale era stata evidenziata un'inibizione significativa delle attività catalitiche CYP2E-dipendenti in microsomi epatici di suino a seguito del trattamento con lo steroide androsterone. Inoltre, nel precedente esperimento della presente tesi è stato dimostrato come il CYP2E1 sia uno dei geni maggiormente responsivi all'azione degli steroidi.

Il trattamento con DHEA, invece, ha determinato un'inibizione significativa dell'espressione dei recettori PXR e PPAR $\alpha$  nel gruppo D rispetto al gruppo A: questo risultato però è parzialmente in contrasto con quanto riportato in letteratura. È noto infatti che in uomo e ratto il recettore PPAR $\alpha$  è il maggiore responsabile del meccanismo d'azione del DHEA (essendo quest'ultimo un suo ligando specifico) e viene indotto ad alte concentrazioni da questo stesso composto (Mastrocola *et al.*, 2003); il PXR inoltre è coinvolto nel meccanismo di azione del DHEA nel ratto, poiché somministrazioni esogene di DHEA in questa specie determinano oltre all'induzione di PPAR $\alpha$  e CYP4A, anche di PXR e CYP3A23 (Kohalmly *et al.*, 2007).

L'effetto inibitorio riscontrato per questi due recettori può essere legato al basso dosaggio impiegato nella sperimentazione in campo; infatti lo stesso Mastrocola riporta che basse dosi di DHEA, somministrate a ratti per lunghi periodi (nel suo caso specifico 4 mg/giorno per 3 settimane) non sono in grado di attivare il PPAR e la beta-ossidazione, esercitando bensì un effetto protettivo antiossidante nei confronti della perossidazione lipidica.

Per quanto riguarda invece il sistema *in vitro*, in cui epatociti in coltura primaria sono stati incubati per 6 ore con soluzioni 100  $\mu$ M di ADD e DHEA, molti geni sono stati modulati dal trattamento con le due molecole: gli effetti sono stati più limitati nel caso del trattamento con ADD, mentre molto più marcati e diffusi per DHEA. L'incubazione con ADD ha determinato infatti solamente un'inibizione significativa del CYP1A1 e non del CYP1A2 (molto blanda): questo risultato conferma quanto precedentemente osservato per l'attività catalitica CYP1A-dipendente in microsomi epatici di vitelli a carne bianca trattati con un'associazione di ADD e boldenone, estradiolo e testosterone, estradiolo e boldenone (Merlanti *et al.*, 2006; Merlanti, 2005) ed in microsomi di ratto incubati con concentrazioni  $\mu$ M di differenti steroidi (Klinger *et al.*, 2002).

Il DHEA invece, ha provocato tra gli enzimi di fase I considerati, un'inibizione significativa dell'espressione di CYP1A1 e CYP2E1 e, al contrario, un'induzione di CYP2C9 ( $p < 0.001$ ), di CYP2B6, CYP3A4 e CYP4A11 (ai limiti della significatività).

L'effetto induttivo qui descritto è ampiamente documentato in letteratura in epatociti umani per tutte e 4 le isoforme sia a livello di espressione genica sia a livello di attività catalitica, per il coinvolgimento nella regolazione di PXR, CAR e PPAR $\alpha$  (Kohalmy *et al.*, 2007). Inoltre, in uno studio effettuato in bovini trattati con 1 g di DHEA al giorno per 7 giorni, è stato evidenziato tra tutte le sequenze presenti sulla piattaforma *microarray* bovino-specifico, un incremento pari a più di due volte dell'espressione di CYP2C9 rispetto al controllo (Rijk *et al.*, 2006). Nel ratto, invece, a seguito del trattamento con DHEA, è stato notato inspiegabilmente un decremento dell'espressione del CYP2C11 (Kohalmy *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2003).

I risultati ottenuti per il CYP1A1 concordano perfettamente con quanto riportato in letteratura, limitatamente all'attività catalitica di questa stessa isoforma: è già stato infatti evidenziato l'effetto inibitorio degli steroidi sull'attività catalitica 1A-dipendente (Klinger *et al.*, 2002); inoltre la diminuzione dell'espressione del CYP2E1 è in linea con i risultati ottenuti nelle prove sperimentali descritte nei capitoli precedenti, in cui vitelloni da carne sono stati trattati con altri steroidi (DEX ed E<sub>2</sub>), anche se ad oggi non si conosce ancora il meccanismo di regolazione coinvolto.

Per quanto riguarda invece gli enzimi di fase II, i trascritti di UGT2B17, GSTA1, DHEA-ST, scelti per il loro noto coinvolgimento nella coniugazione degli steroidi (You, 2004), sono stati modulati in modo rilevante a seguito dell'incubazione con DHEA. In particolare, UGT2B17 è stata inibita del 50% rispetto alle piastre di controllo: questo risultato purtroppo non è concorde con quanto riportato in letteratura; infatti, pur essendo risultato ugualmente un gene responsivo al trattamento anche nel lavoro prima citato di Rijk *et al.* (2006), in tale studio viene al contrario indotto dalla somministrazione di DHEA *in vivo*. L'incremento dell'espressione di GSTA1 qui riscontrato invece, concorda perfettamente con quanto riportato dallo stesso autore ed è ascrivibile ad un meccanismo di induzione da substrato (You, 2004). Infine, anche l'enzima DHEA-ST, detto anche SULT2A1, altamente espresso nel fegato e responsabile della coniugazione preferenziale del DHEA, il quale viene convertito a sua volta nella forma attiva e circolante, è risultato indotto dal DHEA stesso: probabilmente, anche questo effetto è substrato-dipendente e si realizza attraverso l'attivazione dei recettori responsivi PXR, CAR, RXR $\alpha$ , *Farnesoid X receptor* e *Vitamin D receptor*, come descritto da Echchgadda *et al.*, 2004a, Echchgadda *et al.*, 2004b ed Echchgadda *et al.*, 2003.

La 17 $\beta$ HSD tipo II invece, corrisponde ad un enzima coinvolto nella *clearance* e nel metabolismo degli steroidi sessuali nel fegato umano (Narasaka *et al.*, 2000) ed è responsabile della conversione reversibile tra estrone ed estradiolo e tra androstenedione e testosterone, che determinano un'inattivazione *in loco* degli steroidi attivi (Suzuki *et al.*, 2000); catalizza inoltre l'ultimo *step* chiave nella sintesi di androgeni ed estrogeni, poiché essi richiedono la presenza di un gruppo ossidrilico in posizione 17 $\beta$  del loro nucleo steroideo (Luu-The, 2001). Nel sistema *in vitro*, anche questo enzima ha subito un incremento nell'espressione, visto il suo coinvolgimento nel metabolismo degli steroidi sessuali.

Risultati in linea con l'incremento dell'espressione sopra evidenziato per DHEA-ST e 17 $\beta$ HSD, sono stati ottenuti anche in un altro studio effettuato contestualmente nel nostro laboratorio, in cui sono stati analizzati gli stessi nonché altri geni coinvolti nella steroidogenesi nel testicolo appartenente agli stessi vitelloni descritti nell'esperimento *in vivo* (Lopparelli *et al.*, dati personali).

Infine, per quanto riguarda i recettori orfani CAR, PXR, RXR $\alpha$  e PPAR $\alpha$ , l'incubazione con DHEA ha determinato un incremento significativo della loro espressione di 1.5 - 4 volte rispetto al controllo (per HNF4 $\alpha$  non in maniera significativa). Questo risultato è imputabile al fatto che tutti i sopraccitati recettori presentano quale ligando specifico questa stessa molecola e, a seguito della loro interazione, attivano la trascrizione di tutta una serie di enzimi coinvolti nel suo metabolismo, tra i quali il sistema del CYP (Kohalmy *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2003).

Il diverso comportamento riscontrato *in vivo* ed *in vitro* potrebbe essere ascritto in particolare alla dose utilizzata: se si pensa infatti che 4 mg/capo/giorno per 3 settimane vengono considerati un basso dosaggio nel ratto (Mastrocola *et al.*, 2003), l'impiego di 50 mg/capo una volta a settimana per 5 settimane in un bovino di 400 kg rappresenta veramente una dose irrisoria. D'altro canto, invece, si può supporre che una soluzione 100  $\mu$ M di un certo principio attivo impiegata *in vitro* possa essere paragonata ad una dose giornaliera *in vivo* di 1 g dello stesso composto somministrata per 7 giorni consecutivi ad un vitellone (dosaggio impiegato nello studio di Rijk *et al.*, 2006). Questi motivi possono giustificare l'assenza di effetti rilevanti a livello catalitico, proteico e genico, e la presenza di un effetto protettivo antiossidante del DHEA a basse dosi nel sistema *in vivo*, nonché un considerevole effetto metabolico e pro-ossidante nel sistema *in vitro*.

Inoltre occorre considerare che il sistema *in vitro* rappresenta solamente una semplificazione dell'organismo *in toto*, in quanto difficilmente mima tutti i processi farmaco- o tossicocinetici che avvengono *in vivo* (Freshney, 2001). Negli epatociti in coltura primaria infatti il composto viene direttamente a contatto con la cellula epatica alla dose di impiego e non subisce i fenomeni di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione, che incidono sulla biodisponibilità effettiva del composto nell'organismo. Per questo motivo risulta molto difficile stimare la concentrazione di una molecola da utilizzare *in vitro* sulla base di un dosaggio impiegato *in vivo*, se non attraverso uno studio di farmacocinetica del composto. Inoltre le colture primarie di epatociti presentano un ulteriore limite, che consiste nella perdita progressiva dell'attività P450-dipendente, evidente dopo 72 ore di piastramento nel coniglio (Eeckhoutte *et al.*, 2002). In questo caso però i tempi di incubazione sono stati piuttosto ristretti (massimo 6 ore per gli studi di genomica) e non è mai stata evidenziata una diminuzione di espressione dei CYP negli intervalli di tempo considerati (1.5, 3 e 6 ore: dati non presentati). Ciononostante, questo metodo alternativo *in vitro* è risultato essere un valido sostituto delle sperimentazioni in campo soprattutto per la sua rapidità e riproducibilità intra-coltura. Tuttavia, sono necessarie ulteriori prove sperimentali, volte alla validazione di un protocollo standardizzato di isolamento, in grado di ridurre la variabilità inter-coltura da noi stessi riscontrata.

***ESPRESSIONE DI ALCUNI ENZIMI BIOTRASFORMATIVI  
E DEI RELATIVI FATTORI DI TRASCRIZIONE  
NEL FEGATO DI VITELLI A CARNE BIANCA  
TRATTATI A SCOPO ILLECITO CON DESAMETAZONE***

CANTIELLO M., GIANTIN M., CARLETTI M., CAPOLONGO F., LASSERRE F., BOLLO E., NEBBIA C., MARTIN PGP., PINEAU T., DACASTO M. (2008):

Effect of the illicit administration of dexamethasone upon the liver cytochrome P450 3A expression in veal calves.

*Biochemical Pharmacology (manuscript in preparation)*



## 7.1. MATERIALI E METODI

### Campioni biologici

Per questa sperimentazione sono stati utilizzati 15 vitelli a carne bianca di razza Frisona dell'età di 4 mesi, stabulati presso un allevamento autorizzato come Stabilimento utilizzatore dell'Università di Torino, sito in Fossano (TO). Gli animali sono stati sottoposti ai seguenti trattamenti:

- Gruppo D<sub>TO</sub> (n = 5, peso medio 166 ± 12 kg): trattati con desametazone 21 fosfato sodico (DEX: Desashock<sup>®</sup>) alla dose di 0.4 mg/capo/giorno *per os* per 23 giorni;
- Gruppo V<sub>TO</sub> (n = 5, peso medio 170 ± 17 kg): trattati con DEX 21 isonicotinato (Voren<sup>®</sup>) alla dose di 2 mg/capo per via intramuscolare (IM) per 2 volte a distanza di 8 giorni;
- Gruppo K<sub>TO</sub> (n = 5, 176 ± 18 kg): non sottoposto a trattamento (controllo).

Il DEX somministrato *per os* è stato somministrato ogni giorno con il latte ricostituito. Il giorno antecedente la macellazione gli animali sono stati posti a digiuno. Il giorno successivo, gli stessi sono stati pesati e quindi macellati secondo la normativa vigente. Il fegato è stato prelevato, pesato e quindi si è proceduto ai prelievi delle aliquote per le indagini di biologia molecolare e alla preparazione delle frazioni subcellulari.

### Estrazione RNA totale da campioni di fegato e valutazione quali- e quantitativa dell'estratto

Sono state utilizzate le stesse procedure riportate a pagina 75 e 107.

### Trascrizione inversa (RT)

E' stato seguito lo stesso protocollo riportato a pagina 109.

### Selezione geni target

Nella Tabella 7.1.1, sono riportati i geni selezionati per le successive analisi di quantificazione relativa.

| <b>Gene target</b> | <b>Nome</b>   | <b>ID GenBank</b>  |
|--------------------|---|--------------------|
| CYP2B6             | Citocromo P450 2B6                                      | NM_001075173       |
| CYP2C9             | Citocromo P450 2C9                                      | XM_612374          |
| CYP3A4             | Citocromo P450 3A4                                      | NM_174531          |
| CAR                | <i>Constitutive androstan receptor</i>                  | NM_001079768       |
| PXR                | <i>Pregnan X receptor</i>                               | XM_582516          |
| RXR $\alpha$       | <i>Retinoid X receptor isoforma <math>\alpha</math></i> | XM_881943          |
| HNF4 $\alpha$      | <i>Hepatocyte nuclear factor 4<math>\alpha</math></i>   | NM_001015557       |
| GR                 | Recettore glucocorticoidi                               | ENSBTAT00000025941 |

Tabella 7.1.1: Lista dei geni bovini selezionati per il saggio di *Real Time* PCR.

### Scelta dei primers

Sono state seguite le stesse indicazioni riportate a pagina 111.

**Real Time PCR (Q RT-PCR)**

E' stato seguito lo stesso protocollo riportato a pagina 112.

**Allestimento delle frazioni subcellulari epatiche microsomiali e citosoliche**

E' stata utilizzata la medesima procedura riportata a pagina 117.

**Dosaggio delle proteine microsomiali**

E' stata utilizzata la medesima procedura riportata a pagina 118.

**Immunoelettroforesi**

E' stata oggetto di analisi solo l'isoforma CYP3A ed è stata utilizzata la medesima procedura riportata a pagina 134.

**Analisi dei dati ed analisi statistica**

I dati ottenuti dalla Q RT-PCR e dall'immunoelettroforesi sono espressi come media  $\pm$  DS (Allegato 4). L'analisi statistica per evidenziare differenze tra i gruppi di controllo e quelli sottoposti a trattamento, è stata eseguita dal programma Graph Pad InStat 2.01 (San Diego, CA, USA), utilizzando il test ANOVA (*one-way Analysis of Variance*). In caso di variazioni significative è stato eseguito il post-test Tukey (*Tukey-Kramer multiple comparisons test*). Eventuali differenze tra i gruppi vengono considerate significative solo per valori di  $p < 0.05$ .

## 7.2. RISULTATI

Questo esperimento era parte integrante della Tesi di Dottorato della Dr. Michela Cantiello: in quel contesto erano state valutate le attività catalitiche CYP3A-dipendenti, nonché la relativa espressione genica, nel fegato, mediante l'uso della tecnica di *Northern Blotting*. I risultati dell'attività catalitica tratti dalla sopra indicata tesi, vengono qui citati per consentire una comparazione con i dati oggetto invece della presente tesi, relativi a immunoelettroforesi e Q RT-PCR, ma che globalmente sono oggetto della medesima pubblicazione (Cantiello *et al.*, 2008b).

### Valutazione qualitativa e quantitativa dell'RNA estratto

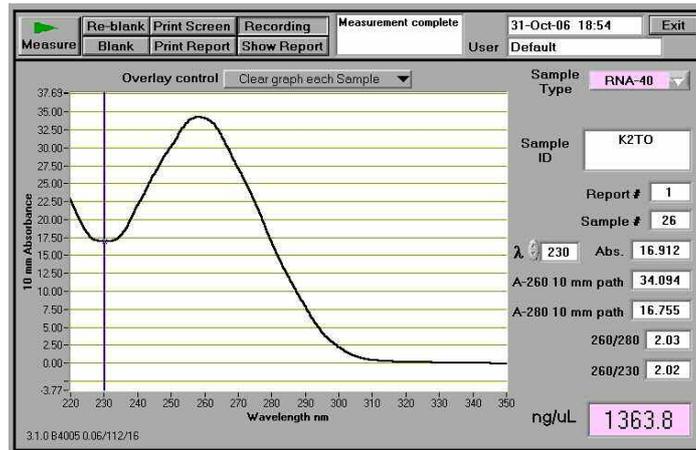
La qualità dell'RNA estratto è stata valutata per i 15 campioni mediante elettroforesi su gel di agarosio 1%: sono state confermate l'assenza di contaminazione da parte del DNA genomico e l'accettabile integrità dell'estratto.

Nella tabella 7.2.1 vengono riportati i dati di concentrazione e di purezza degli estratti ed in figura 7.2.1 invece gli spettri di assorbimento ottenuti durante la lettura di alcuni campioni al NanoDrop.

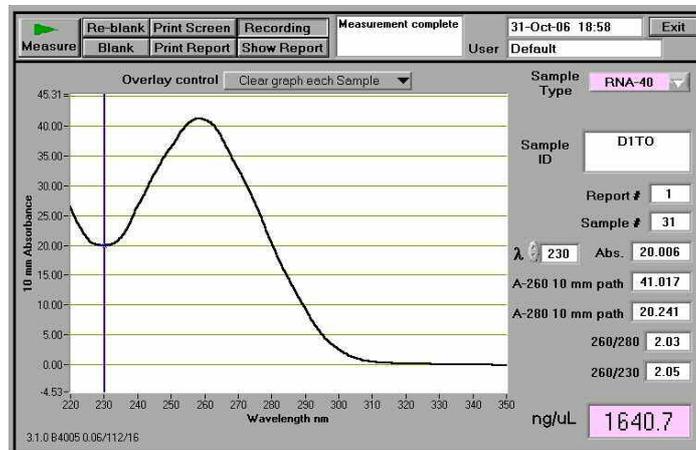
| Gruppo                | Campione       | Concentrazione RNA ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) | Abs 260/280 | Abs 260/230 |
|-----------------------|----------------|--|-------------|-------------|
| <b>K<sub>TO</sub></b> | K <sub>1</sub> | 0.86   | 2.03        | 2.00        |
|                       | K <sub>2</sub> | 1.37   | 2.03        | 2.02        |
|                       | K <sub>3</sub> | 2.28   | 2.01        | 1.33        |
|                       | K <sub>4</sub> | 1.62   | 2.03        | 1.75        |
|                       | K <sub>5</sub> | 1.92   | 2.00        | 1.19        |
| <b>D<sub>TO</sub></b> | D <sub>1</sub> | 1.67   | 2.03        | 2.05        |
|                       | D <sub>2</sub> | 0.92   | 2.03        | 2.01        |
|                       | D <sub>3</sub> | 1.04   | 2.02        | 2.05        |
|                       | D <sub>4</sub> | 2.88   | 2.02        | 1.91        |
|                       | D <sub>5</sub> | 1.37   | 2.02        | 1.67        |
| <b>V<sub>TO</sub></b> | V <sub>1</sub> | 1.79   | 2.04        | 2.03        |
|                       | V <sub>2</sub> | 2.36   | 2.01        | 1.69        |
|                       | V <sub>3</sub> | 1.27   | 2.02        | 1.68        |
|                       | V <sub>4</sub> | 1.10   | 2.03        | 2.01        |
|                       | V <sub>5</sub> | 1.12   | 2.03        | 1.99        |

Tabella 7.2.1: concentrazione e purezza dei campioni di RNA estratti a partire dai campioni di fegato appartenenti ai vitelli a carne bianca oggetto di studio. Vengono riportati i dati di concentrazione in  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ed i rapporti tra i valori di assorbanza a 260, 280 e 230 nm. Per tutti i campioni, sono stati processati circa 60-70 mg di tessuto e l'RNA estratto è stato risospeso in 50-100  $\mu\text{L}$  di acqua.

A



B



C

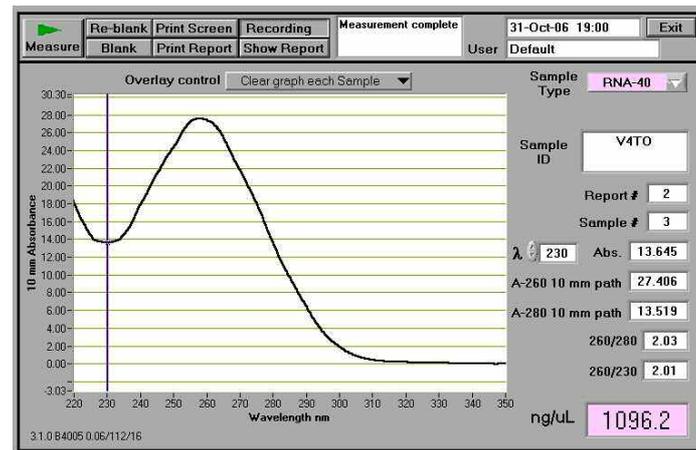


Figura 7.2.1: grafici di assorbanza ottenuti dall'analisi degli estratti K<sub>2</sub>, D<sub>1</sub> e V<sub>4</sub> (A, B, C, rispettivamente) con il NanoDrop; si nota il picco di assorbimento degli acidi nucleici a 260 nm.

**Disegno dei primers e messa a punto dei saggi in Q RT-PCR**

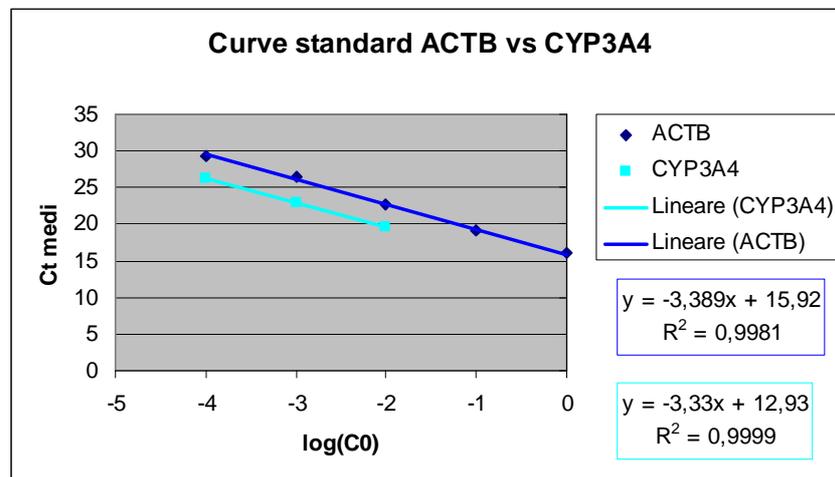
Le coppie di *primers* utilizzate in questa prova sperimentale, specifiche per i geni bovini CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4, CAR, PXR, RXR $\alpha$ , HNF4 $\alpha$  e GR, corrispondono a quelle scelte e messe a punto per gli esperimenti descritti in precedenza.

**Scelta gene reference**

A seguito dell'analisi riportata a pagina 144, effettuata allo scopo di determinare il gene *housekeeping* idoneo per la quantificazione relativa, è stato scelto ed utilizzato il gene codificante per la beta-actina (ACTB).

Qui di seguito (figura 7.2.2) vengono riportati degli esempi di curve di validazione, nei quali si evidenzia che le curve degli standard del gene *target* e *reference* presentano pressoché la stessa inclinazione e sono pertanto parallele.

A



B

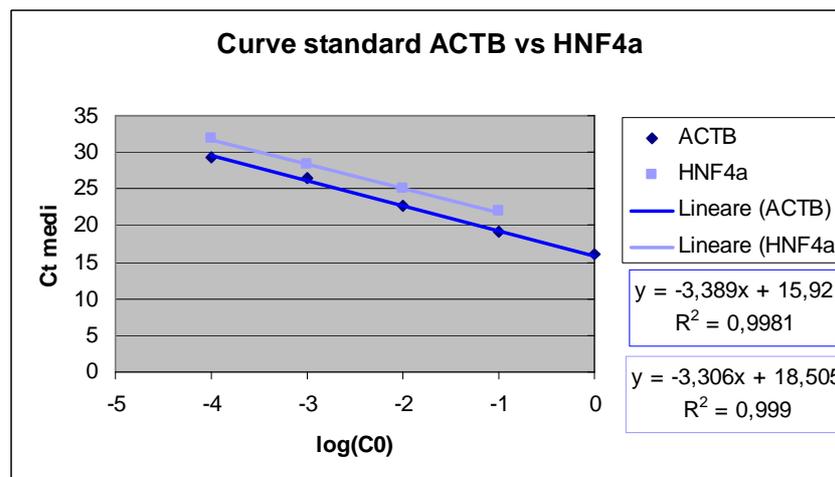


Figura 7.2.2: Grafici delle curve standard dei geni *target* (A) CYP3A4, (B) HNF4 $\alpha$  confrontate con quella del gene ACTB, selezionato come *reference*. In ordinata sono riportati i valori dei Ct medi per ogni triplicato, mentre in ascissa la concentrazione dello standard di cDNA in scala logaritmica. A lato di ciascun grafico sono riportate le equazioni delle curve, le quali evidenziano che l'inclinazione è simile e pertanto le rette sono pressoché parallele.

**Effetto del trattamento con DEX in vitelli a carne bianca****Espressione genica in Q RT-PCR**

La quantificazione relativa dei campioni è stata eseguita applicando il metodo ipotizzato da Livak e Schmittgen. Nella tabella 7.2.2 vengono riportati i dati medi di quantificazione relativa di ciascun gruppo per ciascun gene oggetto di analisi, mentre i dati dei campioni di fegato in singolo vengono riportati nell'allegato 4.

| Gene                           | <i>Fold-change (U.A.)<br/>media ± SEM</i> |                       |                       |
|--------------------------------|---|-----------------------|-----------------------|
|                                | <b>K<sub>TO</sub></b>                     | <b>D<sub>TO</sub></b> | <b>V<sub>TO</sub></b> |
| <b>CYP2B6</b>                  | 1.000 ± 0.468                             | 1.300 ± 0.412         | 1.202 ± 0.504         |
| <b>CYP2C9</b>                  | 1.000 ± 0.118                             | 1.462 ± 0.393         | 2.373 ± 0.645         |
| <b>CYP3A4</b>                  | 1.000 ± 0.098                             | 0.794 ± 0.092         | 0.840 ± 0.179         |
| <b>CAR</b>                     | 1.000 ± 0.112                             | 1.087 ± 0.105         | 1.039 ± 0.164         |
| <b>PXR</b>                     | 1.000 ± 0.176                             | 1.118 ± 0.193         | 1.182 ± 0.292         |
| <b>RXR<math>\alpha</math></b>  | 1.000 ± 0.135                             | 1.053 ± 0.142         | 0.987 ± 0.063         |
| <b>HNF4<math>\alpha</math></b> | 1.000 ± 0.191                             | 1.012 ± 0.128         | 1.278 ± 0.202         |
| <b>GR</b>                      | 1.000 ± 0.091 <sup>bb,c</sup>             | 1.256 ± 0.096         | 1.730 ± 0.102         |

Tabella 7.2.2: Risultati Q RT-PCR esperimento “**DEX vitelli a carne bianca**” espressi come *fold-change* rispetto al gruppo di controllo

Analisi statistica: ANOVA + Tukey's post test

b = K vs D; bb: p<0.01

c = D vs V; c: p<0.05

Il trattamento con DEX non ha determinato effetti di rilievo sull'espressione epatica dei CYP2B6, CYP2C9 e CYP3A4. L'elevata variabilità interindividuale riscontrata ha infatti determinato un appiattimento dei risultati ottenuti per CYP2B6 e CYP2C9: in particolare, nel caso di CYP2C9, il trattamento con DEX ha causato un incremento non statisticamente significativo dell'espressione di tale enzima (1.5 e 2 volte per i trattamenti *per os* e per via intramuscolare, rispettivamente). Nel caso di CYP3A4 si assiste invece ad un *trend* all'inibizione, anche in questo caso non significativo.

Tra i recettori nucleari analizzati, solo l'espressione di GR ha subito un incremento a seguito del trattamento con DEX: in particolare, la somministrazione per via IM ha determinato il maggior effetto induttivo, sia rispetto al gruppo di controllo, sia rispetto al gruppo trattato per via orale ( $p<0.01$  K vs V e  $p<0.05$  D vs T). Tale risultato viene riportato in figura 7.2.3.

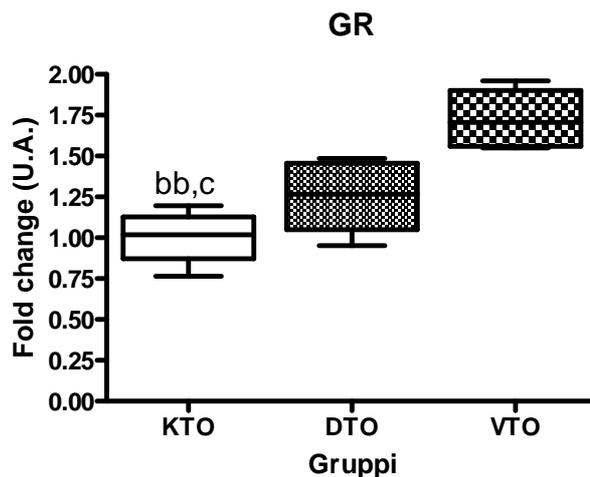


Figura 7.2.3: Rappresentazione *box and whiskers* dell'espressione genica di GR rispetto al gruppo di controllo (K; media = 1) nel fegato di vitelli a carne bianca trattati con DEX somministrato *per os* (D) o per via IM (V). Dati espressi come valore medio  $\pm$  SEM. Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey.  
 b = K vs V; bb:  $p < 0.01$  c = D vs V; c:  $p < 0.05$

### Espressione proteica in Immunolettroforesi

I microsomi epatici ottenuti dalla preparativa di campioni di fegato, sono stati sottoposti in singolo ad immunolettroforesi, utilizzando un anticorpo primario monoclonale anti-CYP3A1/2 di ratto. Il risultato viene riportato in figura 7.2.4. In questa immagine si può notare che l'anticorpo impiegato ha cross-reagito con un'unica banda corrispondente a quella del controllo positivo (DEX, microsomi di ratto indotti con DEX, che è un induttore specifico per CYP3A nelle specie da laboratorio) in presenza di uno scarso rumore di fondo. Successivamente, per dare una connotazione semiquantitativa ai dati ottenuti mediante questa tecnica, è stata effettuata l'analisi della densitometria mediante l'utilizzo del programma ImageJ 1.34s (NIH), il quale fornisce i valori di densità integrata (intensità della banda misurata all'interno di un'area selezionata, costante per tutti i campioni). Tali dati sono stati poi rapportati a quelli del controllo interno (R), ripetuto in ogni *blot*; in questo modo, è stato possibile confrontare *blot* diversi ed ottenere dei dati normalizzati espressi in Unità Arbitrarie di proteina (U.A.).

L'analisi statistica ha evidenziato un'inibizione significativa dell'espressione del CYP3A nei vitelli trattati sia per via orale sia per via IM, più consistente però nel secondo caso ( $p < 0.01$  K vs D e K vs V: vedi figura 7.2.5).

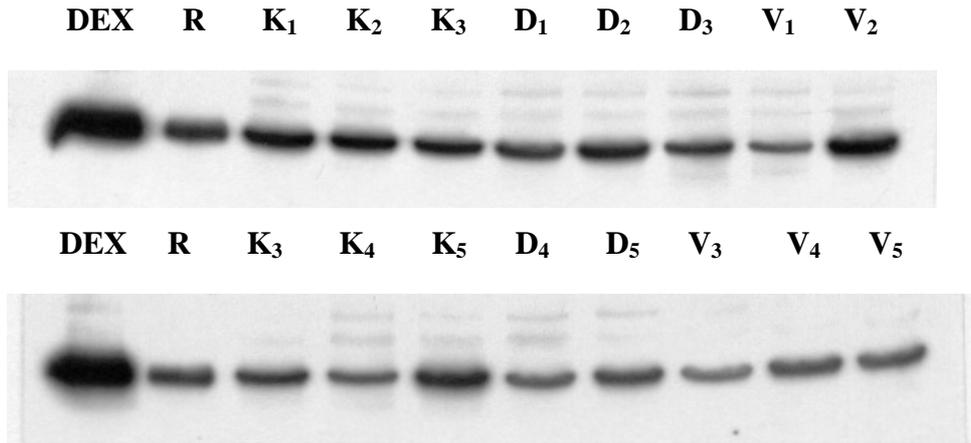


Figura 7.2.4: Immagini dell'immuno-elettroforesi eseguita in singolo su 30 µg di proteina microsomiale epatica appartenenti ai tre gruppi in studio (K, D, V), utilizzando un anticorpo primario monoclonale specifico per l'isoforma CYP3A.

R = controllo interno, corrispondente a 10 µg di sospensione microsomiale epatica di ratti di controllo, utilizzato per la normalizzazione dei risultati nell'analisi densitometrica; DEX = 5 µg di sospensione microsomiale epatica di ratti indotti con desametasone, utilizzato come controllo positivo.

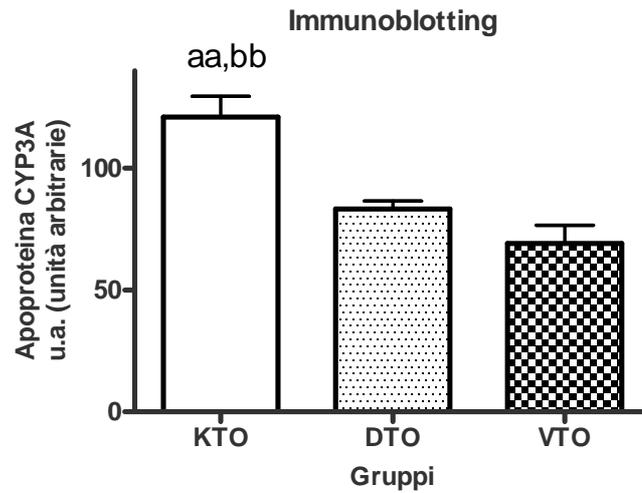


Figura 7.2.5: Risultati dell'Immuno-elettroforesi per CYP3A in vitelli a carne bianca trattati con DEX *per os* (D) o per via IM (V). I dati sono espressi come media ± SEM. Analisi statistica: ANOVA + post test di Tukey.

a = K vs D; aa: p<0.01      b = K vs V; bb: p<0.01

### 7.3. DISCUSSIONE

L'allevamento del vitello a carne bianca occupa una posizione del tutto particolare nell'ambito delle produzioni zootecniche; esso infatti si colloca in stretto rapporto con la bovinicoltura specializzata da latte, in quanto consente di recuperare alla produzione i vitelli maschi di razze lattifere che presentano una scarsa attitudine all'ingrasso intensivo e le femmine che eccedono la quota di rimonta. Questo tipo di allevamento risponde a precise esigenze di consumo, fornendo una carne di alto valore qualitativo soprattutto in virtù della sua elevata tenerezza. In Italia, infatti, la carne di vitello a carne bianca ha conquistato in questi ultimi anni importanti quote di mercato, grazie a determinati requisiti apprezzati e richiesti dal consumatore: in particolare il colore chiaro e la tenerezza. Queste caratteristiche sono state ottenute per anni attraverso l'impiego di tecniche di allevamento piuttosto discutibili (dieta carente di ferro, assenza di fibra nel piano alimentare, stabulazione in box alla catena,...) che hanno inciso notevolmente sulle condizioni fisiche di questi animali (condizioni di stress e stati fisiologici che rasentavano l'anemia), ma che fortunatamente sono state modificate dalle normative comunitarie sul benessere animale.

Vista la continua richiesta di questa tipologia di prodotto carneo è stata sospettata, negli anni scorsi anche la somministrazione a scopo illecito di sostanze anabolizzanti quali i beta-agonisti, gli steroidi sessuali ed i corticosteroidi, anche somministrati in associazione (Groot *et al.*, 1998). L'impiego di queste sostanze tuttavia non solo migliora le *performance* produttive degli animali e conseguentemente il *management* aziendale, ma causa anche alterazioni dell'equilibrio endocrino e metabolico dell'animale stesso, nonché potenziali effetti tossici al consumatore per la presenza di residui nelle derrate alimentari.

L'obiettivo pertanto di questo lavoro è stato quello di valutare gli effetti sui principali enzimi biotrasformativi epatici, nonché sui fattori di trascrizione coinvolti nella loro regolazione, in vitelli a carne bianca trattati a scopo illecito con DEX. In particolare in questo lavoro si è voluto valutare l'espressione genica in Q RT-PCR delle isoforme CYP2B6, CYP2C9 e CYP3A4, dei recettori CAR, PXR, RXR $\alpha$ , HNF4 $\alpha$  e GR, nonché l'espressione a livello proteico di CYP3A.

Per quanto riguarda gli enzimi biotrasformativi CYP2B6 e CYP2C9, è stato evidenziato un comune *trend* di induzione della loro espressione (maggiore per il trattamento con DEX per via IM), che però non ha raggiunto la significatività: tale mancanza può essere presumibilmente imputata all'elevata variabilità interindividuale riscontrata, che ha appiattito i risultati ottenuti. Comunque, e a parziale giustificazione di questo risultato, è noto come il DEX possa modulare l'espressione a livello pre-trascrizionale, oltre che di CYP3A, anche di CYP2B e CYP2C, in seguito all'attivazione molecolare dei recettori nucleari PXR e CAR, in grado di formare un eterodimero con RXR $\alpha$  (You, 2004; Pascussi *et al.*, 2000b). Inoltre, è stato dimostrato che concentrazioni submicromolari di DEX in epatociti in coltura primaria aumentano l'espressione dell'mRNA sia di PXR che di RXR $\alpha$  mediante un controllo pre-trascrizionale che coinvolge anche il GR (Pascussi *et al.*, 2000a). Tuttavia, in questo lavoro CAR, PXR, RXR $\alpha$  e HNF4 $\alpha$ , non hanno subito alcuna variazione di rilievo. Il recettore per i glucocorticoidi, invece, è stato indotto dal trattamento con DEX per via IM nel gruppo V<sub>TO</sub>. Questo interessante risultato può essere dovuto al fatto che i dosaggi impiegati

abbiano determinato la presenza di concentrazioni di DEX a livello epatico molto basse e simili a quelle presenti in stati fisiologici, causando così primariamente l'attivazione di GR e non degli altri recettori orfani. E' stato infatti riportato che il DEX, a concentrazioni fisiologiche, attiva direttamente il GR mentre a dosi elevate si lega a PXR (Pascussi *et al.*, 2001); peraltro questa attivazione è sempre correlata ad un'induzione del CYP3A4 che però in questo lavoro non è stata riscontrata. Va comunque qui ricordato che i vitelli a carne bianca vanno incontro in allevamento ad un forte stato di stress e quindi ad un'alterazione dell'equilibrio endocrino: la somministrazione di composti ad azione antinfiammatoria ed immunodepressiva può pertanto aver ulteriormente compromesso lo stato fisiologico e l'omeostasi dell'animale, determinando così un aumento della transattivazione del GR.

Discorso a parte merita il CYP3A, la sottofamiglia maggiormente coinvolta nel metabolismo ossidativo degli xenobiotici. E' noto che questa isoforma, come più volte ribadito in precedenza, viene indotta da glucocorticoidi naturali e di sintesi come il DEX, da alcuni steroidi come il pregnenolone carbonitrile e dagli antibiotici macrolidici come la rifampicina. In questo lavoro però non è stato evidenziato, mediante analisi dell'mRNA, un effetto induttivo del DEX, bensì un opposto blando effetto inibitorio (non significativo), confermato dalle precedenti analisi in *Northern blot* (diminuzione dell'espressione del CYP3A di circa il 30% in entrambi i gruppi sperimentali: Cantiello, 2003).

Attualmente non sono mai stati pubblicati dati relativi ad una possibile diminuzione dell'espressione del CYP3A bovino conseguente a trattamenti con DEX, se non nell'esperimento sui trattamenti illeciti descritto in precedenza. E' risaputo però che l'induzione del CYP3A varia a seconda della specie e delle molecole (Kocarek *et al.*, 1995; Nebbia *et al.*, 2003). Inoltre, in particolari condizioni (stress, stati patologici) si può osservare una diminuzione dell'espressione di talune isoforme (CYP3A e CYP2C) e tale effetto si è riscontrato anche in seguito alla somministrazione di dosi diverse di DEX (Kiku *et al.*, 2002; Iber *et al.*, 1997; Pascussi *et al.*, 2001). Altri autori infine, hanno dimostrato che il DEX in epatociti di bovino non è in grado di indurre il CYP3A (Van't Klooster *et al.*, 1993; Kuilman *et al.*, 1998).

L'effetto inibitorio osservato a livello pre-trascrizionale è stato confermato anche a livello post-traduzionale. A parità di contenuto di proteina microsomiale e di CYP totale, le attività catalitiche CYP3A-dipendenti 6 $\beta$ - e 2 $\beta$ -testosterone idrossilasi, eritromicina ed etilmorfina *N*-demetilasi, infatti, hanno denotato una diminuzione della capacità biotrasformativa in entrambi i gruppi sperimentali, più evidente però nel gruppo trattato *per os* (-44%, -45%, -79% e -44%, rispettivamente: Cantiello, 2003). La stessa diminuzione dell'espressione del CYP3A è stata riscontrata a livello proteico mediante immunoelettroforesi.

E' stato inoltre valutato il rapporto 6 $\beta$ -idrossicortisolo/cortisolo urinario, conosciuto in uomo e ratto come biomarcatore *in vivo* di induzione/inibizione del CYP3A (Totsuka *et al.*, 1999). Il trattamento con DEX ha determinato in questo esperimento una diminuzione significativa del contenuto totale di cortisolo urinario ed un aumento significativo del rapporto 14 gg dopo l'inizio della somministrazione *per os* e 1 giorno dopo la prima somministrazione IM. Questo incremento del rapporto sarebbe indicativo di un'ipotetica induzione dell'attività del CYP3A, ma in realtà è falsato dal fatto che il DEX determina un'inibizione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e quindi della sintesi del cortisolo (Capolongo *et al.*, 2007).

Non si è pertanto riusciti a dirimere se il DEX possieda un'azione inibitoria specifica per il CYP3A nel bovino o se questo effetto sia primariamente correlato all'utilizzo di una bassa dose, come quella presunta per i trattamenti illeciti in campo. Ciononostante, gli effetti osservati sono stati i medesimi sia a livello pre-trascrizionale che a livello post-traduzionale.

Una possibile spiegazione dell'effetto inibitorio osservato potrebbe essere riconducibile a: a) un diverso comportamento cinetico dei corticosteroidi in funzione del dosaggio, come già riportato da Iber *et al.* (1997); b) ad una diversa struttura anatomica e funzionalità dell'apparato gastroenterico, che pregiudicherebbero la biodisponibilità del composto in vitello e vitellone (ciò spiegherebbe infatti l'opposto effetto evidenziato nei vitelli di questo esperimento e nei vitelloni meticcî francesi della sezione 5 di questa tesi); c) potrebbe aver giocato un ruolo importante anche la presenza di un metabolismo pre-sistemico intestinale della molecola, ed in particolare la presenza di trasportatori di membrana come la Pgp, che può influire sull'assorbimento degli xenobiotici (Bertilsson *et al.*, 2001); d) non si può evitare di considerare anche le condizioni di allevamento degli animali in esame: nei vitelli a carne bianca infatti viene utilizzato solo latte ricostituito a basso tenore di ferro, che può aver influito sulla sintesi dell'emoproteina. Inoltre, visto lo stato di stress e di immunodepressione in cui versano questo tipo di animali, si potrebbe pensare ad un'eventuale compartecipazione di fattori di regolazione del sistema immunitario (Cantiello *et al.*, 2007).

Le prospettive future saranno dunque quelle di approfondire i risultati ottenuti e chiarire alcuni degli aspetti di difficile interpretazione riscontrati.



## 8. CONCLUSIONI GENERALI

Alcuni dei problemi più importanti da affrontare nell'ambito della tossicologia riguardano la valutazione dell'esposizione e dell'effetto degli xenobiotici, nonché i fattori individuali che possono incidere sui processi biotrasformativi attuati dall'organismo nei confronti degli stessi composti. Al giorno d'oggi, per questo tipo di indagini, sono state adottate metodiche basate sulla conoscenza dei meccanismi biochimico-molecolari.

Gli sviluppi recenti nell'ambito biotecnologico infatti hanno permesso ai ricercatori di raggiungere un buon livello di conoscenza della funzione e della regolazione dei geni a livello sistemico e stanno per questo trasformando virtualmente tutte le aree di ricerca biologica, compresa la tossicologia. In questo campo in particolare, è emersa una nuova disciplina denominata tossicogenomica, che si ripromette di identificare e caratterizzare i meccanismi molecolari alla base degli effetti tossici. Il profilo di espressione genica infatti, attraverso l'impiego di tecniche che permettono di valutare e quantificare le variazioni di espressione genica globale (*microarray*), o mirata (Q RT-PCR), sta diventando rapidamente un'analisi standard negli studi tossicologici e possiede la potenzialità di giocare un ruolo centrale in tutti gli *step* della valutazione della sicurezza dei farmaci. Questo tipo di approccio può essere inoltre utilizzato tanto nell'ambito della tossicologia meccanicistica, quanto in quella predittiva (Waring e Halbert, 2002).

In questo contesto, vengono attualmente considerate anche la ricerca e la valutazione di biomarcatori tossicologici di esposizione, di effetto o di risposta, nonché di suscettibilità individuale (Tugwood *et al.*, 2003). I biomarcatori, infatti, sono indispensabili per misurare il livello di esposizione dell'organismo ad un agente tossico, per comprendere la risposta attuata dall'individuo in seguito all'esposizione, per predirne l'effetto, oppure anche per capire la maggiore o minore suscettibilità di un individuo nei confronti di una certa molecola (Timbrell, 1998; Lison, 1999; Vainio, 1998).

Al fine quindi di seguire questa nuova tendenza scientifica e di definire alcuni biomarcatori di esposizione e/o effetto e/o suscettibilità, uno degli obiettivi principali del presente dottorato è stato quello di valutare gli effetti biologici che i trattamenti farmacologici (in questo caso con sostanze impiegate a scopo illecito) provocano sul metabolismo biotrasformativo negli animali e di come fattori intrinseci come la razza, possano modulare l'attività degli stessi enzimi e, conseguentemente, l'entità della risposta dell'individuo in caso di esposizione a tali xenobiotici.

Per raggiungere questo scopo, sono state applicate metodiche biomolecolari, come il clonaggio, per ottenere le sequenze bovine dei geni *target* oggetto di indagine, le cui sequenze però non erano all'epoca disponibili nelle banche dati e, poi, la Q RT-PCR, che ha permesso la messa a punto e l'applicazione di saggi bovino-specifici per la quantificazione dell'espressione di geni codificanti per i maggiori enzimi biotrasformativi epatici, nonché per i fattori di trascrizione relativi.

E' importante qui sottolineare che, in base alle nostre conoscenze, questa è una delle prime volte in cui viene scelto questo tipo di approccio nelle scienze farmaco-tossicologiche relative alla specie bovina: fanno solo eccezione due lavori in cui l'espressione genica dei recettori orfani e di alcuni geni *target* sono stati valutati nel fegato di vitello a carne bianca (Greger *et al.*, 2006; Krüger *et al.*, 2005), grazie all'impiego però di

alcune delle sequenze clonate, sequenziate e depositate nelle banche dati dal nostro stesso gruppo di ricerca (Cantiello *et al.*, 2005). Comunque, in letteratura non sono riportati studi condotti nel bovino, cosiccome per l'uomo e le specie da laboratorio, studi che valutino contestualmente l'espressione degli enzimi di fase I e II, nonché dei recettori coinvolti nella loro regolazione.

In questo lavoro inoltre sono stati presi in considerazione differenti protocolli terapeutici di trattamento illecito (somministrazione in singolo o in associazione, per via orale o IM), più molecole che si ipotizza vengano utilizzate nella realtà zootecnica (DEX, E<sub>2</sub>, ADD e DHEA), sistemi *in vivo* ed *in vitro* (esperimenti in allevamento e colture primarie di epatociti), due diversi sistemi di allevamento bovino (vitellone da carne e vitello a carne bianca), nonché un fattore intrinseco in grado di modulare l'attività biotrasformativa epatica (razza).

In generale, a seguito delle analisi condotte in Q RT-PCR, risulta che gli enzimi considerati appartenenti alla superfamiglia del citocromo P450 vengano modulati in maniera più o meno spiccata e variabile (relativamente all'entità delle risposte) dal trattamento con sostanze illecite e sicuramente non in modo netto e definito (variazioni contenute tra 0.5 e 2 volte rispetto ai controlli). Gli unici due geni che sembrano risentire più sensibilmente del trattamento, indipendentemente dal composto o dalla via di somministrazione impiegati, sono il CYP2B6 ed il CYP2E1. Questi due trascritti risultano infatti inibiti sia dall'impiego di DEX da solo somministrato per via orale o intramuscolare, sia in combinazione ad E<sub>2</sub>; il CYP2E1 inoltre ha subito un decremento nell'espressione anche a seguito di incubazione con DHEA. Tuttavia, i sopraccitati trascritti sono caratterizzati anche da un'estrema variabilità nell'espressione individuale, problema che comunque è stato riscontrato diffusamente in tutti gli esperimenti, in tutti i gruppi oggetto di analisi, nonché nella maggior parte dei trascritti considerati e che ha determinato un appiattimento dei risultati in fase di analisi statistica.

Altri CYP hanno risentito in modo più specifico del trattamento con un particolare promotore della crescita rispetto ad un altro: per esempio le isoforme CYP1A1 e CYP1A2 sono state indotte dal trattamento con estradiolo (sono infatti considerate due delle maggiori isoforme coinvolte nel metabolismo degli estrogeni: Badawi *et al.*, 2000), ma al contrario sono state inibite a seguito dell'incubazione con ADD e DHEA (come già riportato in letteratura da Klinger *et al.* nel 2002, ma limitatamente all'attività catalitica); il CYP2C9 invece è stato l'unico trascritto tra i CYP a subire un incremento consistente a seguito dell'incubazione con DHEA.

Il CYP3A4, dal canto suo, subisce a seguito del trattamento con DEX degli effetti contrastanti, a volte di induzione e a volte di inibizione e quindi non univoci, contrariamente a quanto si legge in letteratura per l'uomo e le specie da laboratorio: in queste specie, infatti, questa isoforma corrisponde ad uno dei geni *target* maggiormente responsivi all'induzione da parte del DEX grazie all'attivazione dei recettori GR, CAR, PXR e RXR $\alpha$  (Pascussi *et al.*, 2001; Pascussi *et al.*, 2003). I risultati contraddittori ottenuti in questi esperimenti possono essere dovuti da una parte al fatto che il CYP3A4 è una delle isoforme maggiormente coinvolte nel metabolismo biotrasformativo epatico e che partecipa alla biotrasformazione di molti composti endogeni ed esogeni (You, 2004) e per questo motivo può risentire simultaneamente degli effetti di più composti, nonché

di diversi fattori (età, razza, condizioni di stress, sistema immunitario,...); dall'altra la sua regolazione sottostà a dei meccanismi molecolari piuttosto complessi: si consideri per esempio la transattivazione da parte di recettori diversi in base alle concentrazioni del ligando specifico, che può esulare in un effetto induttorio o all'opposto, inibitorio (Pascussi *et al.*, 2001; Iber *et al.*, 1997). Per tutta questa serie di motivi il CYP3A4 non può essere considerato sulla base dei risultati ottenuti un buon biomarcatore di trattamento illecito, o per essere definito come tale, dovrebbero prima essere effettuati ulteriori studi atti all'approfondimento delle conoscenze sui meccanismi molecolari di regolazione.

Tra gli enzimi di fase II considerati, i trascritti GSTA1 e SULT1A1 sono risultati responsivi al trattamento sia con il solo DEX sia con la combinazione del corticosteroide con l'E<sub>2</sub>; infatti in entrambi i casi è stato evidenziato lo stesso effetto induttivo: questi risultati sono probabilmente ascrivibili al fatto che questi enzimi sono fisiologicamente coinvolti nella coniugazione degli steroidi e vengono quindi modulati dai loro stessi substrati (You, 2004). Tuttavia, anche in questo caso, probabilmente per le basse dosi impiegate, l'effetto non è stato molto marcato, ma ha comunque rispecchiato la normale tendenza riscontrata in tutti gli altri risultati ottenuti.

Anche alcuni fattori di trascrizione sono stati indotti dai diversi trattamenti: in particolare, l'ER $\alpha$  a seguito della somministrazione di DEX ed estradiolo; il recettore per i glucocorticoidi sia nei vitelli trattati con solo DEX per via intramuscolare sia nei vitelloni trattati con la combinazione dei due steroidi (DEX + E<sub>2</sub>); il *constitutive androstan receptor* e l'RXR $\alpha$  in vitelloni trattati con il singolo DEX o con l'associazione; il *pregnane X receptor* ed il PPAR $\alpha$  (oltre a CAR e RXR $\alpha$ ) a seguito dell'incubazione di epatociti in coltura primaria con DHEA 100  $\mu$ M. Questi risultati purtroppo, seppur significativi, non sono indicativi e specifici di un particolare trattamento, a parte forse il caso dell'induzione dell'ER $\alpha$  a seguito della somministrazione di 17 $\beta$ -estradiolo; in realtà, denotano una generica perturbazione dell'omeostasi nell'organismo animale da parte di composti esogeni che hanno attivato contemporaneamente più fattori di trascrizione in grado di collaborare tra loro, mediante un meccanismo di *cross-talk*. E' noto infatti che molti ligandi, pur essendo considerati specifici per un certo recettore nucleare in realtà, in base alle dosi d'impiego, possono attivare anche altri recettori (vedi per esempio l'attivazione di GR e/o PXR da parte di DEX: Pascussi *et al.*, 2001).

In definitiva, è stata confermata la modulazione di un certo numero di trascritti coinvolti nel metabolismo biotrasformativo e nella loro regolazione, che potenzialmente potrebbero essere impiegati come biomarcatori di esposizione nell'ambito dei trattamenti illeciti. In particolare si suppone che CYP2B6 e CYP2E1 siano i più promettenti tra i 28 trascritti considerati. Tuttavia, prima di poter utilizzare i biomarcatori individuati per lo *screening* in campo, è necessario attuare un processo di validazione degli stessi, mediante l'analisi di campioni positivi e negativi in cieco, che possa permettere di comprendere l'effettiva affidabilità e sensibilità di tali geni candidati. La conferma della validità di questi bioindicatori, permetterebbe in futuro di utilizzare le loro sequenze per la sintesi della proteina corrispondente in sistemi eterologhi e la successiva produzione di anticorpi policlonali specifici per la stessa da impiegare per la creazione di test rapidi di *screening*, come per esempio il kit ELISA. A seguito inoltre di un ulteriore approfondimento dei meccanismi di regolazione molecolare degli enzimi candidati, si potrebbe pensare di impiegare le regioni promotrici degli stessi geni

responsivi per l'allestimento di un sistema *in vitro* (cellule ingegnerizzate in cui il promotore è accoppiato al gene per la luciferasi) corrispondente all'attuale DR-CALUX® *bioassay* (*dioxin responsive chemical activated luciferase gene expression*) disponibile in commercio, che potrà rispondere all'azione specifica di un certo composto illecito, presente ipoteticamente in una derrata alimentare, grazie all'attivazione dell'enzima luciferasi.

In questo lavoro, inoltre, è stato messo a punto un protocollo di isolamento di epatociti di bovino, che è risultato utile ed efficace per lo studio degli effetti dei trattamenti illeciti sulle biotrasformazioni, nonché sui meccanismi di regolazione. Il metodo alternativo *in vitro* adottato si è dimostrato un valido sostituto delle sperimentazioni in campo per la sua rapidità e riproducibilità: la ripetibilità intra-coltura infatti è stata soddisfacente, ma purtroppo sono richieste ulteriori prove sperimentali volte alla validazione di un protocollo standardizzato di isolamento, in grado di ridurre invece la variabilità inter-coltura da noi stessi riscontrata. Altro punto importante sarà quello di effettuare degli studi di farmacocinetica in grado di permettere una corretta estrapolazione delle concentrazioni dei composti da utilizzare *in vitro* sulla base dei dosaggi impiegati *in vivo* in modo da poter conseguentemente ridurre l'impiego di animali.

Infine, in questa tesi è stato dimostrato come la razza rappresenti anche nella specie bovina uno dei possibili fattori in grado di modulare la risposta di un organismo nei confronti degli xenobiotici, confermando quanto precedentemente riportato per l'uomo e le specie da laboratorio. Questo lavoro, peraltro, non ha precedenti in letteratura per questa specie, soprattutto per l'approccio metodologico utilizzato, che ha previsto la caratterizzazione degli enzimi biotrasformativi sia di fase I che di fase II dal gene, alla proteina, passando per l'attività catalitica. I risultati ottenuti dovrebbero rappresentare un punto di riflessione nella pratica terapeutica veterinaria: la maggiore o minore capacità biotrasformativa di una razza rispetto ad un'altra potrebbe infatti precludere l'utilizzo di un certo principio attivo (antibiotico e/o antiparassitario) nella razza dotata di una scarsa attività metabolica specifica. Questo aspetto inoltre dovrebbe essere considerato soprattutto in questa specie non solo per i potenziali effetti tossici che un composto può causare nei confronti dell'organismo animale, ma anche per il conseguente accumulo di residui nelle derrate di origine animale.

Non va inoltre dimenticato che questo fattore intrinseco potrebbe essere discriminante nell'ambito sopra descritto dell'impiego di biomarcatori di trattamento illecito: per la corretta identificazione di soggetti positivi infatti, sarebbe prima necessario avere a disposizione un ampio *set* di dati di espressione tratti da animali di controllo, che dovrebbero però appartenere ad individui di razze diverse.

Il lavoro sulle razze qui presentato comunque rappresenta al momento solo una prima valutazione di questa importante tematica ed in futuro verrà approfondita dall'indagine della possibile presenza di polimorfismi genetici nelle sequenze codificanti per i principali enzimi coinvolti nel ciclo catalitico.

Nel complesso rimangono aperti più spunti di ricerca e le prospettive future saranno dunque quelle di approfondire i risultati preliminari ottenuti nell'ambito delle diverse tematiche affrontate e di chiarire alcuni degli aspetti di difficile interpretazione riscontrati.

## 9. BIBLIOGRAFIA

Aardema MJ and MacGregor JT (2002) Toxicology and genetic toxicology in the new era of “toxicogenomics”: impact of “-omics” technologies. *Mutation Research* **499**:13-25.

AAVV (IV edizione 2003) *Dizionario del Medicinale Veterinario*, Editore Point Veterinarie, Italie

Abraham G, Gottschalk J and Ungemach FR (2004) Possible role of dexamethasone in sensitizing the beta-2-adrenergic receptor system in vivo in calves during concomitant treatment with clenbuterol. *Pharmacology* **72**:196-204.

Aguilar M, Masse R and Gibbs BF (2005) Regulation of cytochrome P450 by posttranslational modification. *Drug Metabolism Review* **37**:379-404.

Akingbemi BT (2005) Estrogen regulation of testicular function. *Reproductive Biology and Endocrinology* **51**:1-13.

Akiyama TE and Gonzalez FJ (2003) Regulation of P450 genes by liver-enriched transcription factors and nuclear receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* **1619**:223-234.

Alberti CG and Villa L (1984) *Chimica Farmaceutica* Org. Edit. Medico-Farmaceutica, Milano, Italia **1**:47-49.

Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouët S, Morel F, Gugen-Guillouzo C and Guillouzo A (2006) Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma Hepa RG cells. *Drug Metabolism and Disposition* **34**:75-83.

Antoine B, Boutin JA and Siest G (1988) Further validation of the Mulder and van Doorn kinetic procedure for the measurement of microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities. *Biochemical Journal* **252**:930-931.

Auchus RJ (2004) Overview of dehydroepiandrosterone biosynthesis. *Seminars in Reproductive Medicine* **22**:281-288.

Badawi AF, Cavalieri EL and Rogan EG (2000) Effect of chlorinated hydrocarbons on expression of cytochrome P450 1A1, 1A2 and 1B1 and 2- and 4-hydroxylation of 17 $\beta$ -estradiol in female Sprague Dawley rats. *Carcinogenesis* **21**:1593-1599.

Baisch H, Otto U and Fack H (1998) Growth of human prostate carcinomas with and without hormone alpha dehydroepiandrosterone in nude mice. *European Urology* **34**:505-515.

Ball GF and Balthazard J (2004) Hormonal regulation of brain circuits mediating male sexual behavior in birds. *Physiology and Behavior* **83**:329-346.

Baranczewski P, Stanczak A, Kautiainen A, Sandin P and Edlund PO (2006) Introduction to early in vitro identification of metabolites of new chemical entities in drug discovery and development. *Pharmacological Reports* **58**:311-352.

Battle T and Stacey G (2001) Cell cultures models for Hepatotoxicology. *Cell Biology and Toxicology* **17**:287-299.

Baulieu EE, Thomas G, Legrain S, Lahlou N, Roger M, Debuire B, Faucounau V, Girard L, Hervy MP, Latour F, Leaud MC, Mokrane A, Pitti-Ferrandi H, Trivalle C, de Lacharrière O, Nouveau S, Rakoto-Arison B, Souberbielle JC, Raison J, Le Bouc Y, Raynaud A, Girerd X and Forette F (2000) Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate and ageing: contribution of DHEAge study to a sociobiomedical issue. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **97**:4279-4284.

Beerman DH, Hogue DE, Fishell VK, Dalrymple RH and Ricks CA (1986) Effects of cimaterol and fishmeal on performance, carcass characteristics and skeletal muscle growth in lambs. *Journal of Animal Science* **62**:370-380.

Bergmeyer HU, Bernt E and Hess B (1963) Lactic dehydrogenase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Edited by Bergmeyer HU, Academic Press, New York, 736-741.

Bertilsson PM, Olsson P and Magnusson KE (2001) Cytokines influence mRNA expression of cytochrome P450 3A4 and MDR1 in intestinal cells. *Journal of Pharmaceutical Science* **90**:638-646.

Bogaards JJP, Bertrand M, Jackson P, Oudshoorn MJ, Weaver RJ, Van Bladeren PJ and Walther B (2000) Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man. *Xenobiotica* **30**:145-151.

Buisson C, Hebestreit M, Weigert AP, Heinrich K, Fryc H, Flenker U, Banneke S, Prevost S, Andre F, Schaenzer W, Houghton E and Le Bizec B (2005) Application of stable carbon isotope analysis to the detection of 17 $\beta$ -estradiol administration to cattle. *Journal of Chromatography* **1093**:69-80.

Burchell B (2003) Genetic variation of human UDP-glucuronosyltransferase: implications in disease and drug glucuronidation. *American Journal of Pharmacogenomics* **3**:37-52.

Burchell B and Coughtrie MWH (1989) UDP-glucuronosyltransferases. *Pharmacology and Therapeutics* **43**:261-289.

Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* **25**:169-193.

Bustin SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* **29**:23-39.

Bustin SA and Nolan T (2004) Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques* **15**:155-166.

Bustin SA, Benes V, Nolan T and Pfaffl MW (2005) Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* **34**:597-601.

Cantiello M (2003) Effetti di trattamenti illeciti sul benessere animale e sugli enzimi farmacometabolizzanti in animali da reddito. *Tesi di Dottorato*, Torino.

Cantiello M, Carletti M, Cannizzo FT, Nebbia C, Bellino C, Pié S, Oswald IP, Bollo E and Dacasto M (2007) Effects of an illicit cocktail on serum immunoglobulins, lymphocyte proliferation and cytokine gene expression in veal calf. *Toxicology* **242**:39-51.

Cantiello M, Carletti M, Dacasto M, Capolongo F, Gardini G, Cascio P, Martin PGP, Pineau T and Nebbia C (2006) Catalytic, immunochemical and molecular characterization of xenobiotic-metabolising enzyme modulation by Phenobarbital in the bovine liver. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **29**:115-116.

Cantiello M, Carletti M, Dacasto M, Martin PGP, Pineau T, Capolongo F, Gardini G and Nebbia C (2008a) Inhibition of in vitro xenobiotic- and testosterone metabolism in liver microsomes from veal calves experimentally treated with a combination of 17 $\beta$ -estradiol, clenbuterol and dexamethasone. *Food and Chemical Toxicology* (submitted)

Cantiello M, Giantin M, Bollo E, Nebbia C, Lasserre F, Martin P, Pineau T and Dacasto M (2005) Cloning and sequencing of some relevant drug metabolism genes in cattle: the Programma Galileo 2003 summary report. *Pharmacologyonline* **3**:66-76.

Cantiello M, Giantin M, Carletti M, Capolongo F, Lasserre F, Bollo E, Nebbia C, Martin PGP, Pineau T and Dacasto M (2008b) Effect of the illicit administration of dexamethasone upon the liver cytochrome P450 3A expression in veal calves. *Biochemical Pharmacology* (manuscript in preparation)

Capolongo F, Merlanti R, Cibir V, De Liguoro M and Montesissa C (2003) *In vivo* hormone treatments in calves: effects on *in vitro* hydroxylation of testosterone. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. **26**:159-160.

Capolongo F, Tapparo M, Merlanti R, Ravarotto L, Tealdo E, Gallina G, Montesissa C and Dacasto M (2007) Illicit treatments in cattle and urinary 6beta-hydroxycortisol/cortisol ratio. *Analytica Chimica Acta* **586**:228-232.

Caron E, Rioux N, Nicolas O, Lebel-Talbot H and Hamelin BA (2005) Quantification of the expression and inducibility of 12 rat cytochrome P450 isoforms by quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **19**:368-378.

Casley WL, Menzies JA, Girard M, Larocque L, Mousseau N, Whitehouse LW and Moon TW (1997) Differences in caffeine 3-demethylation activity among inbred mouse strains: a comparison of hepatic *cyp1a2* gene expression between two inbred strains. *Fundamental and Applied Toxicology* **40**:228-237.

Catania JR, McGarrigle BP, Rittehouse-Olson K and Olson JR (2007) Induction of CYP2B and CYP2E1 in precision-cut rat liver slices cultured in defined medium. *Toxicology in vitro* **21**:109-115.

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

Cinelli S, Fralezza A, Meli C, Ciliutti P and Vericat JA (1991) Alternative methods in toxicology tests: in vitro toxicity. *Cytotechnology* **5**:51-54.

Clarke ML, Harvey DG and Humphreys JR (II Edizione 1981) In: Ballière and Tindall, *Veterinary Toxicology*, London.

Commissione dell'Unione Europea, Decisione della Commissione 2002/657/CE. *Official Journal of European Communities*, L221 (2001) 8

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

Commissione dell'Unione Europea, Direttiva del Consiglio 96/22/CE. *Official Journal of the European Communities*, L125 (1996) 3

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

Commissione dell'Unione Europea, Regolamento del Consiglio 2377/90/CE. *Gazzetta Ufficiale*, L224 (1990) 1

Commissione dell'Unione Europea, Regolamento del Parlamento Europeo e del Consiglio 853/2004/CE. *Official Journal of the European Communities*, L139 (2004) 55

Commissione dell'Unione Europea, Regolamento del Parlamento Europeo e del Consiglio 854/2004/CE. *Official Journal of the European Communities*, L226 (2004) 83

Correa F, García N, García G and Chávez E (2003) Dehydroepiandrosterone as an inducer of mitochondrial permeability transition. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **87**:279-284.

Coulet AS, Le Bizec B, Boerlen F, Monteau F and André F (1998) Calf primary hepatocyte culture as a tool for anabolic steroid metabolism studies. *Analyst* **123**:2489-2492.

Coulet M, Eeckhoutte C, Larrieu G, Sutra JF, Hoogenboom LAP, Huveneers-Oorsprong MBM, Kuiper H, Castell JV, Alvinerie M and Galtier P (1998) Comparative metabolism of thiabendazole in cultured hepatocytes from rats, rabbits, calves, pigs, and sheep, including the formation of bound residues. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* **46**:742-748.

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

Cui X, Thomas A, Han Y, Palamanda J, Montgomery D, White RE, Morrison RA and Cheng KC (2005) Quantitative PCR assay for cytochrome P450 2B and 3A induction in rat precision-cut liver slices: correlation study with induction in vivo. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **52**:234-243.

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

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

Dawling S, Hachey DL, Roodi N and Parl FF (2004) In vitro model of mammary estrogen metabolism: structural and kinetic differences between catechol estrogens 2- and 4-hydroxyestradiol. *Chemical Research in Toxicology* **17**:1258-1264.

Daxenberger A, Ibarreta D and Meyer HH (2001) Possible health impact of animal oestrogen in food. *Human Reproduction Update* **7**:340-355.

De Brabander HF, Poelmans S, Schilt R, Stephany RW, Le Bizet B, Draisci R, Sterk SS, Van Ginkel LA, Courtheyn D, Van Hoof N, Macri A and De Wasch K (2004) Presence and metabolism of the anabolic steroid boldenone in various animal species: a review. *Food Additives and Contaminants* **21**:515-525.

De Longueville F, Surry D, Menenes-Lorente G, Bertholet V, Talbot V, Evrard S, Chandelier N, Pike A, Worboys P, Rasson JP, Le Bourdellès B and Remacle J (2002) Gene expression profiling of drug metabolism and toxicology markers using a low-density DNA microarray. *Biochemical Pharmacology* **64**:137-149.

Decker C, Sugiyama K, Underwood M and Correia MA (1986) Inactivation of rat hepatic cytochrome P-450 by spironolactone. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **136**:1162-1169.

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

Dickson WM (2002) Ghiandole endocrine. In: Swenson MJ, Reece WO, *Duke's Fisiologia degli Animali Domestici*, Idelson-Gnocchi, Italia.

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

Donato MT and Castell JV (2003) Strategies and molecular probes to investigate the role of cytochrome P450 in drug metabolism. *Clinical Pharmacokinetics* **42**:153-178.

Donato MT and O'Connor JE (2004) Metodos de evaluacion del citocromo P450 y des papel en el metabolismo de los xenobioticos. In: Cascales Angosto M, Gómez-Lechón MJ, *Citocromo P-450*, Instituto de España, Real Accademia Nacional de Farmacia, Realigraf S.A., Madrid, España.

Draisci R, Palleschi L, Ferretti E, Lucentini L and Delli Quadri F (2003) Confirmatory analysis of 17 $\beta$ -boldenone, 17 $\alpha$ -boldenone and androsta-1,4-diene-3,17-dione in bovine urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **789**:219-226.

Duanmu Z, Kocarek TA and Rouge-Morris M (2001) Transcriptional regulation of rat hepatic aryl sulfotransferase (SULT1A1) gene expression by glucocorticoids. *Drug Metabolism and Disposition* **29**:1130-1135.

Duanmu Z, Locke D, Smigelski J, Wu W, Dahn MS, Falany CN, Kocarek TA and Runge-Morris M (2002) Effects of dexamethasone on aryl (SULT1A1)- and Hydroxysteroid (SULT2A1)-sulfotransferase gene expression in primary cultured human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* **30**:997-1004.

Echchgadda I, Song CS, Oh TS, Cho SH, Rivera O and Chatterjee B (2004b) Gene regulation for the senescence marker protein DHEA-sulfotransferase by the xenobiotic-activated nuclear pregnane X receptor (PXR). *Mechanisms of Ageing and Development* **125**:733-745.

Echchgadda I, Song CS, Roy AK and Chatterjee B (2003) Xenobiotic induction of human-sulfotransferase gene transcription: role of the xenosensing pregnane X receptor (PXR) and constitutive

androstane receptor (CAR). *Proceedings of the 85<sup>th</sup> Annual Meeting of the Endocrine Society, 19<sup>th</sup> – 22<sup>nd</sup> June 2003, Philadelphia, PA.*

Echchgadda I, Song CS, Roy AK and Chatterjee B (2004a) Dehydroepiandrosterone sulfotransferase is a target for transcriptional induction in the Vitamin D receptor. *Molecular Pharmacology* **65**:720-729.

Eeckhoutte C, Giuliano Albo A, Carletti M, Rossetto Giaccherino A, Galtier P, Nebbia C and Dacasto M (2002) Time-dependent variations of drug-metabolising enzyme activities (DMEs) in primary cultures of rabbit hepatocytes. *Toxicology in Vitro* **16**:375-382.

El Sankary W, Bombail V, Gordon Gibson G and Plant N (2002) Glucocorticoid-mediated induction of CYP3A4 is decreased by disruption of a protein: DNA interaction distinct from the pregnane X receptor response element. *Drug Metabolism and Disposition* **30**:1029-1034.

El-Ali J, Sorger PK and Jensen KF (2006) Cells on chips. *Nature* **442**:403-411.

Ellman GL (1959) Tissue sulphhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **82**:70-77.

Eriksson M, Karlsson HJ, Westman G and Akerman B (2003) Groove-binding unsymmetrical cyanine dyes for staining of DNA: dissociation rates in free solution and electrophoresis gels. *Nucleic Acids Research* **31**:6235-6242.

Falany CN (1997) Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *FASEB Journal* **11**:206-216.

Fey A, Eichler S, Flavier S, Christen R, Höfle MG and Guzmán CA (2004) Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using Salmonella as a model organism. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:3618-3623.

Flaws JA and Bush TL (1998) Racial differences in drug metabolism: an explanation for the higher breast cancer mortality in blacks? *Medical Hypotheses* **50**:327-329.

Freshney I (2001) Application of cell cultures to toxicology. *Cell Biology and Toxicology* **17**:213-230.

Frova C (2006) Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomolecular Engineering* **23**:149-169.

Furukawa M, Nishimura M, Ogino D, Chiba R, Ikai I, Ueda N, Naito S, Kuribayashi S, Moustafa MA, Uchida T, Sawada H, Kamataki T, Funae Y and Fukumoto M (2004) Cytochrome P450 gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells in comparison with the liver. *Cancer Science* **95**:520-529.

Furuta S, Kamada E, Suzuki T, Sugimoto T, Kawabata Y, Shinozaki Y and Sano H (2001) Inhibition of drug metabolism in human liver microsomes by nizatidine, cimetidine and omeprazole. *Xenobiotica* **31**:1-10.

Gardini G, Del Boccio P, Colombatto S, Testore G, Corpillo D, Di Ilio C, Urbani A and Nebbia C (2006) Proteomic investigation in the detection of the illicit treatment of calves with growth-promoting agents. *Proteomics* **6**:2813-2822.

Garfinkle D (1958) Studies on pig liver microsomes. Enzymatic and pigment composition of different microsomal fractions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **77**:493-509.

Gerhold D, Lu M, Xu J, Austin C, Caskey CT and Rushmore T (2001) Monitoring expression of genes involved in drug metabolism and toxicology using DNA microarrays. *Physiological Genomics* **5**:161-170.

Giantin M, Carletti M, Capolongo F, Nebbia C and Dacasto M (2006) Expression of liver cytochrome P450 drug metabolizing enzymes in different meat cattle breeds. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **26**:117.

Giantin M, Carletti M, Capolongo F, Pegolo S, Lopparelli RM, Gusson F, Nebbia C, Cantiello M, Martin P, Pineau T and Dacasto M (2008) Effect of breed upon cytochrome P450s and phase II enzymes expression in cattle liver. *Drug Metabolism and Disposition* (submitted)

Gibson UE, Heid CA and Williams PM (1996) A novel method for real-time quantitative RT-PCR. *Genome Research* **6**:995-1001.

Ginzinger DG (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* **30**:503-512.

Giulietti A, Overberg L, Valkx D, Decallonne B, Buillon R and Mathieu C (2001) An overview of real-time quantitative pcr: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* **25**:386-401.

Glockner R, Steinmetzer P, Lupp A, Danz M and Muller D (2002) In vitro induction of cytochrome P450 2B1- and 3A1-mRNA and enzyme immunostaining in cryopreserved precision-cut rat liver slices. *Toxicology* **176**:187-193.

Gómez-Lechón MJ (2004) Regulación de citocromo P-450 hepático en situaciones fisiopatológicas: inflamación y regeneración hepática. In: Cascales Angosto M, Gómez-Lechón MJ, *Citocromo P-450*, Instituto de España, Real Accademia Nacional de Farmacia, Realigraf S.A., Madrid, España.

Gorski JC, Vannaprasaht S, Hamman MA, Ambrosius WT, Bruce MA, Haehner-Daniels B and Hall SD (2003) The effect of age, sex and rifampicin administration on intestinal and hepatic cytochrome P450 3A activity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **74**:275-287.

Granata A, Pegolo S, De Bona C, Merlanti R, Montesissa C, Dacasto M and Capolongo F (2007) Validation of a HPLC method for the determination of cytochrome P450 2C (CYP2C) activity in bovine liver microsomes. *Proceedings of the 15<sup>th</sup> International Conference on Cytochrome P450*, Bled, Slovenia, June 17<sup>th</sup>-21<sup>st</sup>, 155.

Greger DL, Philipona C and Blum JW (2006) Ontogeny of mRNA abundance of nuclear receptors and nuclear receptor target genes in young cattle. *Domestic Animal Endocrinology* **31**:76-87.

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

Griffin JE and Ojeda SR (V edizione 2004) In: *Textbook of Endocrine Physiology*, Oxford University Press, New York, NY, 228-233.

Groot MJ and Biolatti B (2004) Histopathological effects of boldenone in cattle. *Journal of Veterinary Medicine A* **51**:58-63.

Groot MJ, Berende PLM, Schilt R, Lommen A and Huf FA (1992) Influence of clenbuterol alone and in combination with natural hormones on prostate histology in male goat kids. *Archiv fur Lebensmittelhygiene* **43**:110-114.

- Groot MJ, Schilt R, Ossenkoppele JS, Berende PL and Haasnoot W (1998) Combinations of growth promoters in veal calves: consequences for screening and confirmatory methods. *Journal of Veterinary Medicine* **45**:425-440.
- Gruber FP and Hartung T (2004) Alternatives to animal experimentation in basic research. *Altex* **21**:3-31.
- Gu S, Ripp SL, Prough RA and Geoghegan TE (2003) Dehydroepiandrosterone affects the expression of multiple genes in rat liver including 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a cDNA array analysis. *Molecular Pharmacology* **63**:722-731.
- Guengerich FP (2003) Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Molecular Interventions* **3**:194-204.
- Guillemette C, Bélanger A and Lépine J (2004) Metabolic inactivation of estrogens in breast tissue by UDPglucuronosyltransferase enzymes: an overview. *Breast Cancer Research* **6**:246-254.
- Gusson F, Carletti M, Giuliano Albo A, Dacasto M and Nebbia C (2006) Comparison of hydrolytic and conjugative biotransformations pathways in horse, cattle, pig, broiler chick, rabbit and rat liver subcellular fractions. *Veterinary Research Communications* **30**:271-283.
- Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB (1974) Glutathione-S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* **249**:7130-7139.
- Haduch A, Wójcikowski J and Wladyslawa AD (2005) Effect of short- and long-term treatment with antidepressant drugs on the activity of rat CYP2A in the liver. *Pharmacological Reports* **57**:774-781.
- Hahn ME (2002) Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chemical and Biological Interactions* **141**:131-160.
- Hakkola J, Pasanen M, Pelkonen O, Hukkanen J, Evisalmi S and Anttila S (1997) Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by Ah receptor ligands in human placenta and cultured cells. *Carcinogenesis* **18**:391-397.
- Hamano Y, Kume K, Yamazaki S, Kobayashi S and Terashima Y (1998) Combined effects of clenbuterol and various concentrations of protein on performance of broiler chickens. *British Poultry Science* **39**:117-122.
- Hanioka N, Jinno H, Nishimura T and Ando M (1998) Suppression of male-specific cytochrome P450 isoforms by bisphenol A in rat liver. *Archives of toxicology* **72**:387-394.
- Hanrahan JP, Quirke JF, Bomann W, Allen P, McEwan J, Fitzsimons J, Kotzian J and Roche JF (1986)  $\beta$ -agonists and their effect on growth and carcass quality. In: *Recent advances in animal nutrition*, Haresign W and ColeDJA Eds, Butterworths, London, 125-38.
- Hari Kumar KB and Kuttan R (2006) Inhibition of drug metabolizing enzymes (cytochrome P450) in vitro as well as in vivo by *Phyllanthus amarus* SCHUM & THONN. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **29**:1310-1313.
- Hariparsad N, Sane RS, Strom SC and Desai PB (2005) In vitro methods in human drug biotransformation research: implications for cancer chemotherapy. *Toxicology In Vitro* **20**:135-153.
- He XJ, Ejiri N, Nakayama H and Doi K (2005a) Effects of pregnancy on CYPs protein expression in rat liver. *Experimental and Molecular Pathology* **78**:64-70.

- He XJ, Ejiri N, Nakayama H and Doi K (2005b) Changes in cytochrome P450 isoenzymes (CYPs) protein levels during lactation in rat liver. *Experimental and Molecular Pathology* **79**:224-228.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS and Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. *Biotechnologies* **10**:413-417.
- Hoch U, Zhang Z, Kroetz DL and Ortiz de Montellano PR (2000) Structural determination of the substrate specificities and regioselectivities of the rat and human fatty acid omega-hydroxylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **373**:63-71.
- Honkakoski P and Negishi M (1997) Characterization of a phenobarbital-responsive enhancer module in mouse P450 Cyp2b10 gene. *Journal of Biological Chemistry* **272**:14943-14949.
- Honkakoski P and Negishi M (2000) Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochemical Journal* **347**:321-337.
- Honkakoski P, Zelko I, Sueyoshi T and Negishi (1998) The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Molecular Cell Biology* **18**:5652-5658.
- Huang W, Lin YS, McConn DJ, Calamia JC, Totah RA, Isoherranen N, Glodowski M and Thummel KE (2004) Evidence of significant contribution from CYP3A5 to hepatic drug metabolism. *Drug Metabolism and Disposition* **32**:1434-1445.
- Iber H, Chen Q, Sewer M and Morgan ET (1997) Regulation of hepatic cytochrome P450 2C11 by glucocorticoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **345**:305-310.
- Ingelman-Sundberg M (2002) Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic toxicity. *Toxicology* **181-182**:447-452.
- Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A and Rodriguez-Antona C (2007) Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacology & Therapeutics* **116**:496-526.
- Ioannides C (2002) Xenobiotic metabolism: an overview. In: *Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics*. WILEY. Chichester, West Sussex, UK, 1-29.
- Ioannides C (2006) Cytochrome P450 expression in the liver of food-producing animals. *Current Drug Metabolism* **7**:335-348.
- Istasse I, De Haan V, Van Enaeme C, Buts B, Baldwin P, Gielen M, Demeter D and Bienfait JM (1989) Effects of dexamethasone injections on performance in a pair of monozygotic cattle twins. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **62**:150-158.
- Jang I, Chae K and Cho J (2001) Effects of age and strain on small intestinal and hepatic antioxidant defence enzymes in Wistar and Fisher 344 rats. *Mechanism of Ageing and Development*. **122**:561-570.
- Jaspreet SS, Fei L, Curtis J and Omiecinski (2004) Phenobarbital responsiveness as a uniquely sensitive indicator of hepatocyte differentiation status: requirement of dexamethasone and extracellular matrix in establishing the functional integrity of cultured primary rat hepatocytes. *Experimental Cell Research* **292**:252-264.

Jones SA, Moore LB, Shenk JL, Wisely GB, Hamilton GA, McKee DD, Tomkinson NC, LeCluyse EL, Lambert MH, Willson TM, Kliewer SA and Moore JT (2000) The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Molecular Endocrinology* **14**:27-39.

Juarez-Oropeiza MA, Lopez V, Alvarez-Fernandez G, Gomez Y and Pedernera E (1995) Androstenedione metabolism in the different stage of bovine gonad development. *Journal of Experimental Zoology* **271**:373-378.

Kadlubar FF and Hammons GJ (II Edizione 1987) The role of cytochrome P450 in the metabolism of chemical carcinogens. In: Guengerich FP, *Mammalian cytochrome P450*, CRC Press, Boca Raton and Florida, 81-130.

Kaltenbach CC and Dunn TG (1984) Endocrinologia della riproduzione. In: Hafez E.S.E., *Biologia e Tecnologia della Riproduzione nelle Specie Animali di Interesse Zootecnico*, Editoriale Grasso, Bologna.

Kamanga-Sollo E, Pampusch MS, Xi G, White ME, Hathaway MR and Dayton WR (2004) IGF-I mRNA levels in bovine satellite cells cultures: effects of fusion and anabolic steroid treatment. *Journal of Cell Physiology* **201**:181-189.

Kaplan JC and Delpech M (1995) I vettori: plasmidi, fagi, cosmidi, YAC, virus. In: *Biologia Molecolare e Medicina*, Idelson-Gnocchi G. Editore, Napoli, 517-536.

Karlsson HJ, Lincoln P and Westman G (2003) Synthesis and DNA binding studies of a new asymmetric cyanine dye binding in the minor groove [poly(dA-dT)]<sub>2</sub>. *Bioorganical and Medical Chemistry* **11**:1035-1040.

Katoh M, Matsui T, Okumura H, Nakajima M, Nishimura M, Naito S, Tateno C, Yoshizato K and Yokoi T (2005) Expression of human phase II enzymes in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metabolism and Disposition* **33**:1333-1340.

Kawajiri K and Fujii-Kuriyama Y (2007) Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **464**:207-212.

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

Kedderis GL and Mugford CA (1998) Sex-dependent metabolism of xenobiotics. *Drug Metabolism Reviews* **30**:441-498.

Kent UM, Mills DE, Rajnarayanan RV, Alworth WL and Hollenberg PF (2002) Effect of 17- $\alpha$ -ethynylestradiol on activities of cytochrome P450 2B (P450 2B) enzymes: characterization of inactivation of P450s 2B1 and 2B6 and identification of metabolites. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **300**:549-558.

Kiku Y, Matsuzawa H, Ohtsuka H, Terasaki N, Furuka S, Kon-Nai S, Koiwa M, Yokomizo Y, Sato H, Rosol TJ, Okada H and Yoshino TO (2002) Effects of chlorpromazine, pentoxifylline and dexamethasone on mRNA expression of lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokines in bovine peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of Veterinary Medical Science* **64**:723-726.

Kim YC, Yim HK, Jung YS, Park JH and Kim SY (2007) Hepatic injury induces contrasting response in liver and kidney to chemicals that are metabolically activated: role of male sex hormones. *Toxicology and Applied Pharmacology* **223**:56-65.

Kiyosawa N, Kwekel JC, Burgoon LD, Williams KJ, Tashiro C, Chittim B and Zacharewski TR (2008) o,p'-DDT elicits PXR/CAR, not ER, mediated responses in the immature, ovariectomized rat liver. *Toxicological Sciences* **101**:350-363.

Klingenberg M (1958) Pigment of rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **75**:376-386.

Klinger W, Lupp A, Karge E, Baumbach H, Eichhorn F, Feix A, Fuldner F, Gernhardt S, Knels L, Kost B, Mertens G, Werner F, Oettel M, Römer W, Schwarz S, Elger W and Schneider B (2002) Estradiol, testosterone, dehydroepiandrosterone and androstenedione: novel derivatives and enantiomers. Interactions with rat liver microsomal cytochrome P450 and antioxidant/radical scavenger activities in vitro. *Toxicology Letters* **128**:129-144.

Kniewald J, Kmetić I, Gaurina-Srček V and Kniewald Z (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arhiv za Higijenu Rada I Toksikologiju* **56**:195-204.

Kocarek TA, Schuetz EG, Strom SC, Fisher RA and Guzelian PS (1995) Comparative analysis of cytochrome P4503A induction in primary cultures of rat, rabbit, and human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* **23**:415-421.

Kohalmý K, Tamási V, Kóbori L, Sárváry E, Pascussi JM, Porrogi P, Rozman D, Prough RA, Meyer UA and Monostory K (2007) Dehydroepiandrosterone induces human CYP2B6 through the constitutive androstane receptor. *Drug Metabolism and Disposition* **35**:1495-1501.

Krüger KA, Blum JW and Greger DL (2005) Expression of nuclear receptor and target genes in liver and intestine of neonatal calves fed colostrum and vitamin A. *Journal of Dairy Science* **88**:3971-3981.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A and Zoric N (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* **27**:95-125.

Kuilman MEM, Maas RFM and Fink-Gremmels J (2000) Cytochrome P450-mediated metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B<sub>1</sub> in bovine hepatocytes. *Toxicology In Vitro* **14**:321-327.

Kuilman MEM, Maas RFM, Judah DJ and Fink-Gremmels J (1998) Bovine hepatic metabolism of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* **46**:2707-2713.

Kuiper HA, Noordam MY, van Dooren-Flipsen MMH, Schilt R and Roos AH (1998) Illegal use of  $\beta$ -adrenergic agonists: European Community. *Journal of Animal Science* **76**:195-207.

Kunieda T, Maruyama M, Okitsu T, Shibata N, Takesue M, Totsugawa T, Kosaka Y, Arata T, Kobayashi K, Ikeda H, Oshita M, Nakaji S, Ohmoto K, Yamamoto S, Kuabayashi Y, Kadama M, Tanaka N and Kobayashi N (2003) Cryopreservation of primarily porcine hepatocyte with UW solution. *Cell Transplantation* **12**:607-616.

Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ and Walburger DK (2000) 3'-Minor Groove Binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research* **28**:655-661.

Labrie F, Luu-The V, Martel C, Chernomoretz A, Calvo E, Morissette J and Labrie C (2006) Dehydroepiandrosterone (DHEA) is an anabolic steroid like dihydrotestosterone (DHT), the most potent natural androgen, and tetrahydrotestosterone (THG). *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **100**:52-58.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.

Larsson A, Calsson C and Jonsson M (1995) Characterization of the binding of YO to [poly(dA-dT)]<sub>2</sub> and [poly(dG-dC)]<sub>2</sub>, and of the fluorescent properties of YO and YOYO complexed with the polynucleotides and double-stranded DNA. *Biopolymers* **36**:153-167

LeCluyse E, Madan A, Hamilton G, Carroll K, DeHaan R and Parkinson A (2000) Expression and regulation of cytochrome P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **14**:177-188.

Lee HY, Acosta TJ, Tanikawa M, Sakumoto R, Komiyama J, Tasaki Y, Piskula M, Skarzynsky DJ, Tetsuka M and Okuda K (2007) The role of glucocorticoid in the regulation of prostaglandin biosynthesis in no-pregnant bovine endometrium. *Journal of Endocrinology* **193**:127-135.

Lin HL, Kent UM and Hollenberg (2002) Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 3A4 by 17 $\alpha$ -ethynylestradiol: evidence for heme destruction and covalent binding to protein. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **301**:160-167.

Lin JH (2003) Role of P-glycoprotein in drug metabolism and disposition. *Drug Metabolism Review* **35**:13

Lison D (1999) Importance of biotransformation pathways for interpreting biological monitoring of exposure. *Toxicology Letters* **108**:91-97.

Liu PS and Wang PY (2004) DHEA attenuates catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *Journal of Biomedical Science* **11**:200-205.

Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> Method. *Methods* **25**:402-408.

Löfgren S, Hagbjörk AL, Ekman S, Fransson-Steen R and Terelius Y (2004) Metabolism of human cytochrome P450 marker substrates in mouse: a strain and gender comparison. *Xenobiotica* **34**:811-834.

Lorenti A, Hidalgo AM, Barlich MR, Torres J, Batalle J, Izaguirre MF, Fiorucci MP, Casco V, Gadano A and Argibay PF (2006) Structural and functional polarity of porcine hepatocyte cultured spheroids. *Acta Gastroenterologica Latinoamericana* **36**:66-75.

Lowry O, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**:265-275.

- Lupp A, Glockner R, Danz M and Muller D (2002) Cryopreserved precision-cut rat liver slices: morphology and cytochrome P450 isoforms expression after prolonged incubation. *Toxicology in vitro* **16**:749-758.
- Luu-The V (2001) Analysis and characteristics of multiple type of human 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **76**:143-151.
- Ma YZ, Ma ZQ, Gui CQ, Yao JS and Sun RY (2003) Hepatotoxicity and toxicokinetics of ketoconazole in rabbits. *Acta Pharmacologica Sinica* **24**:778-782.
- Machala M, Souček P, Neča J, Ulrich R, Lamka J, Szotáková B and Skálová L (2003) Interspecies comparisons of hepatic cytochrome P450 enzyme levels in male ruminants. *Archives of Toxicology* **77**:555-560.
- Massirer KB and Pasquinelli AE (2006) The evolving role of microRNAs in animal gene expression. *Bioassays* **28**:449-452.
- Mastrocola R, Aragno M, Betteto S, Brignardello E, Catalano MG, Danni O and Boccuzzi G (2003) Pro-oxidant effect of dehydroepiandrosterone in rats is mediated by PPAR activation. *Life Sciences* **73**:289-299.
- Mazel P (1971) Experiments illustrating drug metabolism in vitro. In *Fundamentals of drug metabolism and drug disposition*. (Ladu BN, Mandel MG and Way EL, Eds), 569-572.
- McCune JS (2000) In vivo and in vitro induction of human cytochrome P4503A4 by dexamethasone. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **68**:356-366.
- Merlanti R (2005) Trattamenti ormonali nel vitello a carne bianca: effetti a carico delle attività farmacometabolizzanti epatiche citocromo P450-dipendenti ed identificazione di biomarker urinari di trattamento. *Tesi di Dottorato*, Padova.
- Merlanti R, Carletti M, De Bona C, Capolongo F, Nebbia C, Poppi L, Dacasto M and Montesissa C (2006) Influence of diets containing animal or plant sterols and a boldenone/boldione combination on liver drug metabolism in veal calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **29**:126-127.
- Merlanti R, Gallina G, Capolongo F, Contiero L, Biancotto G, Dacasto M and Montesissa C (2007) An in vitro study on metabolism of 17beta-boldenone and boldione using cattle liver and kidney subcellular fractions. *Analytica Chimica Acta* **586**:177-183.
- Meyer HH (2001) Biochemistry and physiology of anabolic hormones used for improvement of meat production *Acta Phatologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavia* **109**:1-8.
- Meyer HHD and Rinke LM (1991) The pharmacokinetics and residues of clenbuterol in veal calves. *Journal of Animal Science* **69**:4538-4544.
- Meystre C, Frey H, Voser W and Wettstein A (1956) Gewinnung von 1;4-Bisdehydro-3-oxo-steroiden. Uber Steroide, 139. Mitteilung. *Helvetica Chimica Acta* **39**:734-742.
- Miller NE and Halpert J (1986) Analogs of chloramphenicol as mechanism-based inactivators of rat liver cytochrome P-450: modifications of propanediol side chain, the p-nitro group and the dichloromethyl moiety. *Molecular Pharmacology* **29**:391-398.

Montesissa C, Anfossi P, Van't Klooster G and Mengelers M (1996) The use of cultured hepatocytes from goats and cattle to investigate oxidative metabolism. *Veterinary Research Communications* **20**:449-460.

Montesissa C, Capolongo F, Santi A, Biancotto G and Dacasto M (2004) Metabolism of tilmicosin by rabbit liver microsomes and hepatocytes. *Veterinary Journal* **167**:87-94.

Morales AJ, Haubrich RH, Hwang JY, Asakura H and Yen SSC (1998) The effect of six months treatment with a 100 mg daily dose of dehydroepiandrosterone (DHEA) on circulating sex steroids, body composition and muscle strength in age-advanced men and women. *Clinical Endocrinology* **49**:421-439.

Morrison TB, Weis JJ and Wittwer CT (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* **24**:954-962.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **51**:263-273.

Mutembei HM, Pesch S, Schuler G and Hoffmann B (2005) Expression of oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  and of aromatase in the testis of immature and mature boars. *Reproduction in Domestic Animal* **40**:228-236.

Muto N, Hirai H, Tanaka T, Itoh N and Tanaka K (1997) Induction and inhibition of cytochrome P450 isoforms by imazalil, a food contaminant, in mouse small intestine and liver. *Xenobiotica* **27**:1215-1223.

Nagar S and Remmel RP (2006) Uridine diphosphoglucuronosyltransferase pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* **25**:1659-1672.

Nahmias Y, Berthiaume F and Yarmush ML (2006) Integration of technologies for hepatic tissue engineering. *Advance in Biochemical Engineering/Biotechnology* **103**:309-329.

Nakajima M, Iwanari M and Yokoi T (2003) Effects of histone deacetylation and DNA methylation on the constitutive and TCDD-inducible expression of the human CYP1 family in MCF-7 and HeLa cells. *Toxicology Letters* **144**:247-256.

Nakajima M, Tane K, Nakamura S, Shimada N, Yamazaki H and Tokoi T (2002) Evaluation of approach to predict the contribution of multiple cytochrome P450s in drug metabolism using relative activity factor: effects of the differences in expression levels of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome b(5) in the expression system and the differences in the marker activities. *Journal of Pharmacological Sciences* **91**:952-963.

Nakata K, Tanaka Y, Nakano T, Adachi T, Tanaka H, Kaminuma T and Ishikawa T (2006) Nuclear-receptor-mediated transcriptional regulation in phase I, II and III xenobiotic metabolizing enzymes. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **21**:437-457.

Narasaka T, Moriya T, Endoh M, Suzuki T, Shizawa S, Mizokami Y, Matsuoka T and Sasano H (2000) 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and dehydroepiandrosterone sulfotransferase in the human liver. *Endocrinology Journal* **47**:697-705.

Nawata H, Yanase T, Goto K, Okabe T and Ashida K (2002) Mechanism of action of anti-ageing DHEA-S and the replacement of DHEA-S. *Mechanism of Ageing and Development* **123**:1101-1106.

Nebbia C (2001) Biotrasformation enzymes as determinants of xenobiotic toxicity in domestic animals. *Veterinary Journal* **161**:238-252.

Nebbia C (2005) Trattamenti illeciti con steroidi sessuali, corticosteroidi e beta-agonisti: rischi per il consumatore e nuovi approcci diagnostici. Workshop: "Residui negli alimenti di origine animale: analisi del rischio, prevenzione e sorveglianza". *ISTISAN Conference*. Istituto Superiore di Sanità, 19-20 Dicembre 2005. Roma, Italia

Nebbia C, Dacasto M and Carletti M (2004) Postnatal development of hepatic oxidative, hydrolytic and conjugative drug-metabolizing enzymes in female horses. *Life Science* **74**:1605-1619.

Nebbia C, Dacasto M, Rossetto Giaccherino A, Giuliano Albo A and Carletti M (2003) Comparative expression of liver cytochrome P450-dependent monooxygenases in the horse and in other agricultural and laboratory species. *Veterinary Journal* **165**:53-64.

Nebbia C, Dacasto M, Soffietti MG, Rasero R, Principato GB and Di Simplicio P (1993) Inhibition of hepatic xenobiotic metabolism and of glutathione-dependent enzyme activities by zinc ethylene-bis-dithiocarbamate in the rabbit. *Pharmacology and Toxicology* **73**:233-239.

Nebert DW and Gelboin HV (1968) substrate-inducible microsomal aryl hydrocarbon hydroxylase in mammalian cell culture. I. Assay and properties of the induced enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **243**:6242-6249.

Nebert DW and Roe AI (2000) Ethnic and genetic differences in metabolism genes and risk of toxicity and cancer. *The Science of the Total Environment* **274**:93-102.

Nebert DW, Nelson DR, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalup IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, Phillips IR, Sato R and Waterman MR (1989) The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci. *DNA and Cell Biology* **8**:1-13.

Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kurijama Y, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalup IC, Johnson EF, Loper JC, Sato R, Waterman MR and Waxman D (1991) The P450 superfamily: updated on new sequences, gene mapping recommended nomenclature. *DNA and Cell Biology* **10**:1-14.

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC and Nebert DW (1996) The P450 superfamily: updated on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**:1-42.

Nims RW, Prough RA, Jones CR, Stockus DL, Dragnev KH, Thomas PE and Lubet RA (1997) In vivo induction and in vitro inhibition of hepatic cytochrome P450 activity by the benzodiazepine anticonvulsivants clonazepam and diazepam. *Drug Metabolism and Disposition* **25**:750-756.

Nowell S and Falany CN (2006) Pharmacogenetics of human cytosolic sulfotransferases. *Oncogene* **25**:1673-1678.

O'Donnel L, Robertson KM, Jones ME and Simpson ER (2001) Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews* **22**:289-318.

Oesch-Bartlomowicz B and Oesch F (2005) Phosphorylation of cytochromes P450: first discovery of a posttranslational modification of a drug-metabolizing enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**:446-449.

Okino ST, Pookot D, Li LC, Zhao H, Urakami S, Shiina H, Igawa M and Dahiya R (2006) Epigenetic inactivation of the dioxin-responsive cytochrome P4501A1 gene in human prostate cancer. *Cancer Research* **66**:7420-7428.

Okita RT and Okita JR (2001) Cytochrome P450 4A fatty acid omega hydroxylases. *Current Drug Metabolism* **2**:265-281.

Omura T e Sato R (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *The Journal of Biological Chemistry* **239**: 2370-2378.

Opherk C, Tronche F, Kellendonk C, Kohlmuller D, Schulze A, Schmid W and Schutz G (2004) Inactivation of glucocorticoid receptor in hepatocytes leads to fastin hypoglycaemia and ameliorates hyperglycaemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Molecular Endocrinology* **18**:1346-1353.

Paine AJ (1996) Validity and reliability of in vitro systems in safety evaluation. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2**:207-212.

Palmer S, Wiegand AP, Maldarelli F, Bazmi H, Mican JM, Polis M, Dewar RL and Planta A (2003) New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *Journal of Clinical Microbiology* **41**:4531-4563.

Pampori NA and Shapiro BH (1993) Sexual dimorphism in avian hepatic monooxygenases. *Biochemical Pharmacology* **46**:885-890.

Parikka V, Peng Z, Hentunen T, Risteli J, Elo T, Väänänen HK and Härkönen P (2005) Estrogen responsiveness of bone formation in vitro and altered bone phenotype in aged estrogen receptor- $\alpha$ -deficient male and female mice. *European Journal of Endocrinology* **152**:301-314.

Park KS, Sohn DH, Veech RL and Song BJ (1993) Translational activation of ethanol-inducible cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) by isoniazid. *European Journal of Pharmacology* **248**:7-14.

Parkinson A (VI Edizione 2001) Biotransformation of xenobiotics. In: Klaassen CD, Casarett & Doull's *Toxicology, the basic science of poisons*, Mc Graw Hill, New York, 133-224.

Pasanen M (2004) Species differences in CYP enzymes. In: Cascales Angosto M, Gómez-Lechón MJ, *Citocromo P-450*, Instituto de España, Real Accademia Nacional de Farmacia, Realigraf S.A., Madrid, España.

Pascussi JM, Drocourt L, Fabre JM, Maurel P and Vilarem MJ (2000a) Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid X receptor- $\alpha$  expression in human hepatocytes: synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators. *Molecular Pharmacology* **58**:361-372.

Pascussi JM, Drocourt L, Gerbal-Chaloin S, Fabre JM, Maurel P and Vilarem MJ (2001) Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes. *European Journal of Biochemistry* **268**: 6346-6357.

Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Fabre JM, Maurel P and Vilarem MJ (2000b) Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes: consequences on Cytochrome P450 gene regulation. *Molecular Pharmacology* **58**:1441-1450.

Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Drocourt L, Maurel P and Vilarem MJ (2003) The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangled network of nuclear and steroid receptors *Biochimica et Biophysica Acta* **1619**:243-253.

Peffer RC, Moggs JG, Pastoor T, Currie RA, Wright J, Milburn G, Waechter F and Rusyn I (2007) Mouse liver effects of cyproconazole, a triazole fungicide: role of the constitutive androstane receptor. *Toxicological Science* **99**:315-325.

Pegolo S, Merlanti R, Giantin M, Dacasto M, Montesissa C and Capolongo F (2007) Validation of HPLC determination of CYP1A and CYP2C activities in bovine liver microsomes. *Journal of Chromatography B* (submitted)

Pelkonen O (2004) Induction of CYP enzymes. In: Cascales Angosto M, Gómez-Lechón MJ, 2004. *Citocromo P-450* Instituto de España, Real Academia Nacional de Farmacia, Realigraf S.A., Madrid, España, 126-127.

Pelkonen O, Mäenpää J, Taavitsainen P, Rautio A and Raunio H (1998) Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* **28**:1203-1253.

Peters IR, Helps CR, Hall EJ and Day MJ (2004) Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design. *Journal of Immunological Methods*. **286**:203-217.

Piersma AH (2006) Alternative methods for developmental toxicity testing. *Basic Clinical Pharmacology* **98**:427-431.

Poelmans S, Schilt R, Stephany RW, Le Bizec B, Draisci R, Sterk S, Van Ginkel LA, Courtheyn D, Van Hoof N, Lucentini L, De Wasch K and De Brabander HF (2003) *EU expert report on boldenone: state of the art*, 13 May 2003.

Poli G, Cocilovo A, Dall'Ara P, Martino PA and Ponti W (II edizione, 2005) Western blotting (Immunoblotting). In: *Microbiologia e immunologia veterinaria*, UTET, Stamperia Artistica Nazionale, Torino, 688-689.

Presidente della Repubblica Italiana, Decreto Legislativo n. 336 del 4 agosto 1999. *Gazzetta Ufficiale n.230 del 30 Settembre 1999*.

Presidente della Repubblica Italiana, Decreto Legislativo n.158 del 16 marzo 2006. *Gazzetta Ufficiale n.98 del 28 Aprile 2006*.

Prough RA, Linder MW, Pinaire JA, Xiao GH and Falkner KC (1996) Hormonal regulation of hepatic enzymes involved in foreign compound metabolism. *FASEB Journal* **10**:1369-1377.

Reed R, Holmes D, Weyers J and Jones A (I Edizione 2002) Genetica molecolare III: tecniche di ingegneria genetica. In: *Metodologie di base per le scienze biomolecolari*, Zanichelli, Bologna.

Reinke LA and Moyer MJ (1985) p-Nitrophenol hydroxylation. A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol. *Drug Metabolism and Disposition* **13**:548-552.

Reiter M, Walf VM, Christians A, Pfaffl MW and Meyer HHD (2007) Modification of mRNA expression after treatment with anabolic agents and the usefulness for gene expression-biomarkers. *Analytica Chimica Acta* **586**:73-81.

Rekka E, Evdokimova E, Eeckhoudt S, Labar G and Calderon PB (2002) Role of temperature on protein and mRNA P450 3A (CYP3A) isozymes expression and midazolam oxidation by cultured rat precision-cut liver slices. *Biochemical Pharmacology* **64**:633-643.

Rijk J, Baykus H, van Hende J, Peijnenburg A, Groot M and Nielen M (2006) Changes in gene expression profiles of bovines treated with the prohormone dehydroepiandrosterone (DHEA), using a bovine DNA micro-array. *Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Symposium on hormone and veterinary drug residue analysis*, May 16<sup>th</sup> – 19<sup>th</sup>, 2006, Antwerp, Belgium, 194.

Ririe KM, Rasmussen RP and Wittwer CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA *melting* curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* **245**:154-160.

Rutledge RG and Côté C (2003) Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Research* **31**(16)

Rutten AJL, Falke HE, Catsburg JF, Top R, Blaaboer BJ, Van Holsteijn I, Doorn L and Van Leeuwen FXR (1987) Interlaboratory comparison of total cytochrome P-450 and protein determinations in rat liver microsomes. *Archives of Toxicology* **61**:27-33.

Saito K, Sakai N, Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A and Fujita S (2004) Strain differences in diazepam metabolism at its three metabolic sites in Sprague-Dawley, Brown Norway, Dark Agouti and Wistar strain rats. *Drug Metabolism and Disposition* **32**:959-965.

Sakuma T, Yokoi T and Kamataki T (1995) Isolation and characterization of a new cDNA clone belonging to the cytochrome P450 2C gene subfamily in hamsters. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **319**:267-273.

Sallovitz J, Lifschitz A, Imperiale F, Pis A, Virkel G and Lanusse C (2002) Breed differences on the plasma availability of moxidectin administered pour-on to calves. *Veterinary Journal* **164**:47-53.

Sanderson T and Van Den Berg M (2003) Interactions of xenobiotics with the steroid hormone biosynthesis pathway. *Pure and Applied Chemistry* **75**:1957-1971.

Sawada M and Kamataki T (1998) Genetically engineered cells stably expressing cytochrome P450 and their application to mutagen assays. *Mutation Research* **411**:19-43.

Scheller K and Sekeris CE (2003) The effects of steroid hormones on the transcription of genes encoding enzymes of oxidative phosphorylation. *Experimental Physiology* **88**:129-140.

Schenkman JB and Jansson I (2003) The many roles of cytochrome b5. *Pharmacology and Therapeutics* **97**:139-152.

Schmidely P (1993) Quantitative bibliographic review on the use of anabolic hormones with steroidogenic action in ruminants for meat production. II. Principal mode of action. *Reproduction, Nutrition, Development* **33**:297-323.

- Schnelzer E, Acikopez A, Fruhauf NR, Crome O, Klempnauer J, Christianus U and Bader A (2006) Biotransformation of cyclosporine in primary rat, porcine and human liver cell co-cultures. *Xenobiotica* **36**:693-708.
- Schuler G, Ozalp GR, Hoffmann B, Harada N, Browne P and Conley AJ (2006) Reciprocal expression of 17 $\alpha$ -hydroxylase-C17,20-lyase and aromatase cytochrome P450 during bovine trophoblast differentiation: a two-cell system drives placental oestrogen synthesis. *Reproduction* **131**:669-679.
- Schwerin M, Kuehn C, Wimmers S, Walz C and Goldammer T (2006) Trait-associated expressed hepatic and intestine genes in cattle of different metabolic type – putative functional candidates for nutrient utilization. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **123**:307-314.
- Seglen PO (1976) Preparation of isolated rat liver cells. *Methods in Cell Biology* **23**:29-83.
- Sheweita SA (2000) Drug-metabolizing enzymes: mechanisms and functions. *Current Drug Metabolism* **1**:107-132.
- Shibuya M, Echizen H, Kubo S, Tamura N, Suzuki K, Ushiyama H and Ohnishi A (2003) Reduced urinary 6 $\beta$ -hydroxycortisol to cortisol ratios in patients with liver cirrhosis. *Hepatology Research* **26**:28-33.
- Shimada T, Hayes CL, Yamazaki H, Amin S, Hecht SS, Guengerich FP and Sutter TR (1996) Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Research* **56**:2979-2984.
- Simpson AE (1997) The cytochrome P450 4 (CYP4) family. *General Pharmacology* **28**:351-359.
- Simpson DA, Feeney S, Boyle C and Stitt AW (2000) Retinal VEGF mRNA measure by SYBR Green I fluorescence: a versatile approach to quantitative PCR. *Molecular Vision* **6**:178-183.
- Sinclair J, Jeffery E, Wrighton S, Kostrubsky V, Szakacs J, Wood S and Sinclair P (1998) Alcohol-mediated increases in acetaminophen hepatotoxicity. Role of CYP2E and CYP3A. *Biochemical Pharmacology* **55**:1557-1565.
- Sinclair PA, Hancorck S, Gilmore WJ and Squires EJ (2005) Metabolism of the 16-androstene steroids in primary cultured porcine hepatocytes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **96**:79-87.
- Sipes G and Gandolfi AJ (III Edizione 1986) Biotransformation of toxicants In: Klassen CD, Amdur MO and Doull J, *Toxicology. The basic science of poisons*, Mac Millan, New York, 694-778.
- Sivapathasundaram S, Magnisali P, Coldham NG, Howells LC, Sauer MJ and Ioannides C (2001) A study of the expression of the xenobiotic-metabolising cytochrome P450 proteins and testosterone metabolism in bovine liver. *Biochemical Pharmacology* **62**:635-645.
- Sivapathasundaram S, Magnisali P, Coldham NG, Howells LC, Sauer MJ and Ioannides C (2003a) Cytochrome P450 expression and testosterone metabolism in the liver of deer. *Toxicology* **187**:49-65.
- Sivapathasundaram S, Sauer MJ and Ioannides C (2003b) Xenobiotic conjugation system in deer compared with cattle and rat. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. **134**:169-173.
- Stabenfeldt GH (2002) Attività riproduttiva della femmina. In: Swenson MJ, Reece WO, *Duke's Fisiologia degli Animali Domestici*, Idelson-Gnocchi, Italia

Stott WT, Kan HL, McFadden LG, Sparrow BR and Gollapudi BB (2004) Effect of strain and diet upon constitutive and chemically induced activities of several xenobiotic metabolizing enzymes in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **39**:325-333.

Suzuki T, Sasano H, Andersson S and Mason JI (2000)  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta 5 \rightarrow \Delta 4$ -isomerase activity associated with the human  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 isoform. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **85**:3669-3672.

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

Taniguchi S, Yanase T, Haji M, Ishibashi K, Takayanagi R and Nawata H (1995) The antiobesity effect of dhydroepiandrosterone in castrated or noncastrated obese Zucker male rats. *Obesity Research* **3**:639-643.

Testai E (2001) The drug-metabolizing enzyme system and the experimental tools used for *in vitro* toxicology for metabolic studies. *Cell Biology and Toxicology* **17**:272-285.

Thomas RJ, Bhandari R, Barrett DA, Bennett AJ, Fry JR, Powe D, Thomson B and Shakesheff KM (2005) The effect of three-dimensional co-culture of hepatocytes and hepatic stellate cells on key hepatocyte functions in vitro. *Cell Tissue Organs* **181**:67-79.

Thomford PJ and Dziuk PJ (1986) The influence of dose of Phenobarbital and intervals to measurement on concentration of liver enzymes in barrows and gilts. *Journal of Animal Science* **63**:1184-1190.

Timbrell JA (1982) *Principles of biochemical toxicology*, Taylor and Francis, London.

Timbrell JA (1998) Biomarkers in toxicology. *Toxicology* **129**:1-12.

Toffolatti L, Gastaldo LR, Patarnello T, Romualdi C, Merlanti R, Montesissa C, Poppi L, Castagnaro M and Bargelloni L (2005) Expression analysis of androgen-responsive genes in the prostate of veal calves treated with anabolic hormones. *Domestic Animal Endocrinology* **30**:38-55.

Tokizane T, Shiina H, Igawa M, Enokida H, Urakami S, Kawakami T, Ogishima T, Okino ST, Li LC, Tanaka Y, Nonomura N, Okuyama A and Dahiya R (2005) Cytochrome P450 1B1 is overexpressed and regulated by hypomethylation in prostate cancer. *Clinical Cancer Research* **11**:5793-5801.

Totsuka S, Watanabe T, Koyanagi F, Tanaka K, Yasuda M and Manabe S (1999) Increase in urinary excretion of  $6\beta$ -hydroxycortisol in common marmosets as a marker of hepatic CYP3A induction. *Archives of Toxicology* **73**:203-207.

Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **76**:4350-4354.

Townsend AJ, Kinningham KK, St. Clair D, Tephly T, Morrow CS and Guemgerich FP (1999) Symposium overview: characterization of xenobiotic metabolizing enzyme function using heterologous expression systems. *Toxicological Sciences* **48**:143-150.

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

- Tsuchiya Y, Nakajima M, Takagi S, Taniya T, Yokoi T (2006) MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1. *Cancer Research* **66**:9090-9098.
- Tugwood JD, Hollins LE and Cockerill MJ (2003) Genomics and the search for novel biomarkers in toxicology. *Biomarker* **8**:79-92
- Tuschl G and Mueller O (2006) Effects of cell culture conditions on primary rat hepatocytes – Cell morphology and differential gene expression. *Toxicology* **218**:205-215.
- Tyagi S and Kramer FR (1996) Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology* **14**:303-308.
- Tydén E, Olsén L, Tallkvist J, Tjälve H and Larsson P (2007) Cytochrome P4503A, NADPH cytochrome P450 reductase and cytochrome *b5* in the upper airways in horse *Research in Veterinary Science* (doi:10.1016/j.rvsc.2007.09.012).
- Vainio H (1998) Use of biomarkers – new frontiers in occupational toxicology and epidemiology. *Toxicology Letters* **102-103**:581-589.
- Van Cromphaut SJ, Stockmans I, Torrekens S, Van Herck E, Carmeliet G and Bouillon R (2007) Duodenal calcium absorption in dexamethasone-treated mice: functional and molecular aspects. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **460**:300-305.
- Van Poucke C and Van Peteghem C (2002) Development and validation of multi-analyte method for the detection of anabolic steroids in urine with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **772**:211-217.
- Van Puymbroeck M, Kullman MEM, Maas RFM, Witkamp RF, Leyssen L, Vanderzande D, Gelan J and Raus J (1998a) In vitro liver models are important tools to monitor the abuse of anabolic steroid in cattle. *Analyst* **123**:2453-2456.
- Van Puymbroeck M, Kullman MEM, Maas RFM, Witkamp RF, Leyssen L, Vanderzande D, Gelan J and Raus J (1998b) Identification of some important metabolites of bol in urine and feces of cattle by GC-MS. *Analyst* **123**:2681-2686.
- Van't Klooster GAE (1992) Drug metabolism in ruminants and *in vitro* approach. *Tesi di Dottorato*, Wageningen.
- Van't Klooster GAE, Blaauboer BJ, Noordhoek J and Van Miert ASJPAM (1993) Cytochrome P450 induction and metabolism of alkoxyresorufins, ethylmorphine and testosterone in cultured hepatocytes from goats, sheep and cattle. *Biochemical Pharmacology* **46**:1781-1790.
- Van't Klooster GAE, Woutersen-Van Nijnanten FMA, Klein WR, Blaauboer BJ, Noordhoek J and Van Miert ASJPAM (1992) Effects of various medium formulations and attachment substrata on the performance of cultured ruminant hepatocytes in biotransformation studies. *Xenobiotica* **22**:523-534.
- Vegiopoulos A and Herzig S (2007) Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Molecular and Cellular Endocrinology* **275**:43-61
- Vickers AE and Fisher RL (2005) Precision-cut organ slices to investigate target organ injury. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* **1**:687-699.

- Wang H and LeCluyse EL (2003) Role of orphan nuclear receptors in the regulation of drug-metabolising enzymes. *Clinical Pharmacokinetics* **42**:1331-1357.
- Wang H, Huang M, Peng R and Le J (2006) Influences of 3-methylchloranthrene, phenobarbital and dexamethasone on xenobiotic metabolizing-related cytochrome P450 enzymes and steroidogenesis in human fetal adrenal cortical cells. *Acta Pharmacologica Sinica* **27**:1093-1096.
- Wang X and Seed B (2003) A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic Acids Research* **31**:154-162.
- Waring JF and Halbert DN (2002) The promise of toxicogenomics. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* **4**:229-235.
- Warriss PD, Kestin SC, Rolph TP and Brown SN (1990) The effects of the beta-adrenergic agonist sulbutamol on meat quality in pigs. *Journal of Animal Science* **68**:128-136.
- Wauthier V, Verbeeck RK and Calderon PB (2007) The effect of ageing on cytochrome P450 enzymes: consequences for drug biotransformation in the elderly. *Current Medicinal Chemistry* **14**:745-757.
- Wendel A (2002) Do we need a “Chair of alternative methods”, and where? *Altex* **19**:64-68.
- Weng Q, Tanaka Y, Taniyama H, Tunoda N, Nambo Y, Watanabe G and Taya K (2007) Immunolocalization of steroidogenic enzymes in equine fetal adrenal glands during mid-late gestation. *Journal of Reproduction and Development* **53**:1093-1098.
- Werringloer J (1978) Assay of formaldehyde generated during microsomal oxidation reactions. *Methods in Enzymology* **52**:297-302.
- Whitlock JP (1999) Induction of cytochrome P4501A1. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **39**:297-302.
- Williams ET, Leyk M, Wrighton SA, Davies PJA, Loose DS, Shipley GL and Strobel HW (2004) Estrogen regulation of the cytochrome P450 3A subfamily in humans. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **311**:728-735.
- Williams RT (II Edizione 1971) *Detoxification Mechanism*, Wiley, New York.
- Wilson WD, Tanious FA, Barton HJ, Jones RL, Fox K, Wydra RL, and Streckowski L (1990) DNA sequence dependent binding modes of 40,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Biochemistry* **29**:8452-8461.
- Witkamp R (1992) *Oxidative drug metabolism in ruminants and laboratory species. Tesi di Dottorato*, Utrecht.
- Wong ML and Medrano F (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* **39**:75-85.
- Wu L, Gu J, Cui H, Zhang QY, Behr M, Fang C, Weng Y, Kluetzman K, Swiatek PJ, Yang W, Kaminsky L and Ding X (2005) Transgenic mice with a hypomorphic NADPH-cytochrome P450 reductase gene: effects on development, reproduction, and microsomal cytochrome P450. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **312**:35-43.
- Xu C, Yong-Tao Li C and Tony Kong AN (2005) Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of Pharmacal Research* **28**:249-268.

- Yamazaki H, Nakano M, Imai Y, Ueng YF, Guengerich FP and Shimada T (1996) Roles of cytochrome b5 in the oxidation of testosterone and nifedipine by recombinant cytochrome P450 3A4 and by human liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **325**:174-182.
- Yan X, Habbersett RC, Cordek JM, Nolan JP, Yoshida TM, Jett JH and Marrone BL (2000) Development of a mechanism-based, DNA staining protocol using SYTOX orange nucleic acid stain and DNA fragment sizing flow cytometry. *Analytical Biochemistry* **286**:138-148.
- Yan Z and Caldwell GW (2001) Metabolism profiling and cytochrome P450 inhibition & induction in drug discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **1**:403-425.
- Yang NC, Jeng KC, Ho WM and Hu ML (2002) ATP depletion is an important factor in DHEA-induced inhibition and apoptosis in BV-2 cells. *Life Science* **70**:1979-1988.
- You L (2004) Steroid hormone biotransformation and xenobiotic induction of hepatic steroid metabolizing enzymes. *Chemico-Biological Interactions* **147**:233-246.
- Young VR (1980) Hormonal control of protein metabolism-body protein gain. In: Buttery PJ, Lindsay DB, *Protein Deposition in Animals*, Butterworths, London.
- Yu R, Chen C, Mo YY, Hebbar V, Owuor ED, Tan TH and Kong ANT (2000) Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* **275**:39907-39913.
- Yu S, Rao S and Reddy JK (2003) Peroxisome proliferator-activated receptors, fatty acid oxidation, steatohepatitis and hepatocarcinogenesis. *Current Molecular Medicine* **3**:561-572.
- Zamaratskaia G, Gilmore WJ, Lundström K and Squires EJ (2007) Effect of testicular steroids on catalytic activities of cytochrome P450 enzymes in porcine liver microsomes. *Food and Chemical Toxicology* **45**:676-681.
- Zhang K, Kohno S, Kuroha M, Kokue E and Shimoda M (2006) Clinical oral doses of dexamethasone decreases intrinsic clearance of quinidine, a cytochrome P450 3A substrate in dogs. *Journal of Veterinary Medicine Sciences* **68**:903-907.
- Zhang Y, Gaikwad NW, Olson K, Zahid M, Cavalieri EL and Rogan EG (2007) Cytochrome P450 isoforms catalyze formation of catechol estrogen quinines that react with DNA. *Metabolism: Clinical and Experimental* **56**:887-894.
- Zhu BT and Lee AJ (2005) NADPH-dependent metabolism of 17 $\beta$ -estradiol and estrone to polar and nonpolar metabolites by human tissues and cytochrome P450 isoforms. *Steroids* **70**:225-244.
- Zimmiak P, Awasthi S and Awasthi YC (1993) Phase III detoxification system. *Trends in Biochemical Science* **17**:463-468.
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J and Vitzthum F (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* **32**: 103.

Zweers-Zeilmaker WM, Van Miert, Horbach GJ and Witkamp RF (1998) In vitro complex formation and inhibition of hepatic cytochrome P450 activity by different macrolides and tiamulin in goats and cattle. *Research in Veterinary Science* **66**:51-55.

## 10. SITOGRAFIA

<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>

[http://frodo.wi.mit.edu/egibin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/egibin/primer3/primer3_www.cgi)

<http://genome.uscs.edu/>

<http://ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>

<http://www.emea.europa.eu/htms/general/contacts/CVMP/CVMP.html>

<http://www.ensembl.org/index.html>

[www.merckvetmanual.com](http://www.merckvetmanual.com)

[www.toulouse.inra.fr/multalin/multalin](http://www.toulouse.inra.fr/multalin/multalin)



## 11. ABBREVIAZIONI

16 $\beta$ OH-T, 6 $\beta$ OH-T e 2 $\beta$ OH-T = 16 $\beta$ -, 6 $\beta$ - e 2 $\beta$ -testosterone idrossilasi, rispettivamente

17 $\alpha$ -bol = 17 $\alpha$ -boldenone

17 $\beta$ -bol = 17 $\beta$ -boldenone o boldenone

3MC = 3-metilclorantrene

A = gruppo di vitelloni da carne trattati con ADD *per os* (50 mg/capo 1 volta a settimana per 5 settimane)

ACN = acetonitrile

ACTB = beta-actina

ACTH = ormone adrenocorticotropo

ADD = androstadienedione (androsta-1,4-diene-3,17-dione, detto anche boldione)

AhR = *aryl hydrocarbon receptor*

Aniline-OH = anilina idrossilasi

APDEM = aminopirina *N*-demetilasi

ARE = *anti-oxidant responsive element*

Arnt = *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*

B2M = beta 2 microglobulina

BA = Blonde d' Aquitaine

BENZDEM = benzfetamina *N*-demetilasi

bHLH = *basic-helix-loop-helix*

B<sub>PD</sub> = vitelloni da carne trattati con DEX IM (esperimento DEX vitelloni)

BPOH = benzo[a]pirene idrossilasi

CAR = *constitutive androstan receptor*

CCD = dispositivo *charge-coupled*

CDNB = 1-cloro-2,4-dinitrobenzene

CH = Charolais

CRH = fattore di rilascio dell'ormone adrenocorticotropo

CTRL = piastre epatociti di controllo

CYP = citocromo P450

D = gruppo di vitelloni da carne trattati con DHEA *per os* (50 mg/capo 1 volta a settimana per 5 settimane)

DBD = *DNA binding domain*

DCNB = 3,4-dicloronitrobenzene

D<sub>de</sub> = vitelloni da carne trattati con DEX da solo *per os* (esperimento DEX + E<sub>2</sub>)

DE<sub>de</sub> = vitelloni da carne trattati con associazione DEX *per os* + E<sub>2</sub> IM (esperimento DEX + E<sub>2</sub>)

DEX = desametazone

DHEA = deidroepiandrosterone

DHEA-ST = DHEA solfotransferasi

DHT = diidrotestosterone  
 DM = metabolismo dei farmaci (*drug metabolism*)  
 DMEs = enzimi biotrasformativi (*drug metabolising enzymes*)  
 dNTPs = nucleotidi trifosfati  
 DS = deviazione standard  
 D<sub>TO</sub> = vitelli a carne bianca trattati con DEX *per os* (esperimento DEX vitelli a carne bianca)  
 DTT = ditionitrotolo  
 E<sub>2</sub> = 17β-estradiolo  
 ELISA = *enzyme-linked immunoassorbent assay*  
 EpRE = *electrophile response element*  
 ER = *estrogen receptor*  
 ERDEM = eritromicina *N*-demetilasi  
 EROD = etossiresorufina *O*-deetilasi  
 ETDEM = etilmorfina *N*-demetilasi  
 ETR = etossiresorufina  
 FCS = siero fetale bovino  
 FSH = ormone follicolo stimolante  
 GH = ormone della crescita  
 GR = *glucocorticoid receptor*  
 GSH = glutatione ridotto  
 GST = glutatione S-transferasi  
 HACCP = *hazard analysis of critical control points*  
 HNF4 = *hepatocyte nuclear factor 4*  
 HPLC = cromatografia liquida ad alta prestazione (*high performance liquid chromatography*)  
 HRE = *hormone response elements*  
 HSP-90 = *heat shock protein 90*  
 IGF = *insulin growth factor*  
 IM = intramuscolare  
 IPTG = isopropiltiogalattoside  
 K = vitelloni da carne di controllo (esperimento ADD-DHEA)  
 K<sub>de</sub> = vitelloni da carne di controllo (esperimento DEX + E<sub>2</sub>)  
 K<sub>PD</sub> = vitelloni da carne di controllo (esperimento DEX vitelloni)  
 K<sub>TO</sub> = vitelli a carne bianca di controllo (esperimento DEX vitelli a carne bianca)  
 LBD = *ligand binding domain*  
 LDH = lattato deidrogenasi  
 LH = ormone luteinizzante  
 LIM = Limousine

LMR = limite massimo residuale  
 LPS = lipopolisaccaride  
 MAPEG = proteine di membrana (GST) coinvolte nel metabolismo del glutatione e degli eicosanoidi  
 MAV = metodo alternativo *in vitro*  
 MeOH = metanolo  
 miRNA = microRNA  
 MROD = metossiresorufina *O*-deetilasi  
 NAD(P)H-R = NAD(P)H citocromo c riduttasi  
 NADPH = nicotinamide adenin dinucleotide fosfato  
 NTC = *no template control*  
 PAHs = idrocarburi aromatici policiclici  
 PB = fenobarbitale  
 PBREM = *phenobarbital response element module*  
 PBS = tampone fosfato (*phosphate buffer solution*)  
 PCN = pregnenolone 16 $\alpha$ -carbonitrile  
 PCR = *polymerase chain reaction*  
 PdC = promotore della crescita  
 PEP = fosfoenolpiruvato  
 PGF2 $\alpha$  = prostaglandina F2 $\alpha$   
 PgP = P-glicoproteina  
 PK = piruvato chinasi  
 PKA = protein chinasi A  
 PM = Piemontese  
 pNP-OH = *p*-nitrofenolo idrossilasi  
 pNP-UGT = *p*-nitrofenolo UGT  
 PPAR = *peroxisome proliferator activated receptor*  
 PXR = *pregnan X receptor*  
 PXREM = *pregnan X receptor response element module*  
 Q RT-PCR = *Real Time PCR*  
 R = microsomi di ratto di controllo, controllo interno per immunoelettroforesi  
 r<sub>s</sub> = coefficiente di correlazione non parametrico di Spearman  
 RT- = controllo negativo in cui non è avvenuta la retrotrascrizione  
 RT = trascrizione inversa (*reverse transcription*)  
 RXR = *retinoid X receptor*  
 S9 = frazione post-mitocondriale  
 SDS = sodio dodecil solfato  
 SEM = errore standard medio

SHBG = *sex hormone binding globulin*

SNPs = polimorfismi genetici (*single nucleotide polymorphisms*)

StAR= *steroidogenic acute regulatory protein*

SULT = sulfotransferasi

TAO = triacetiloleandomicina

TAODEM = TAO *N*-demetilasi

TBP = *TATA box binding protein*

TBT4-OH = tolbutamide metil-idrossilasi

TCA = acido tricloroacetico

TCDD = 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-diossina

T<sub>m</sub> = temperature di *melting*

TMDI = *Total Maximum Daily Intake*

TP = tampone fosfato

T<sub>PD</sub> = vitelloni da carne trattati con DEX *per os* (esperimento DEX vitelloni)

TST = testosterone

UDPGA = acido uridin-difosfo-glucuronico

UGT = uridindifosfoglucuroniltransferasi

UTR = *untranslated region*

V<sub>TO</sub> = vitelli a carne bianca trattati con DEX IM (esperimento DEX vitelli a carne bianca)

Xgal = 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galattoside

XRE = *xenobiotic response element*

αN-UGT = α-naftolo UGT

βnaf = β-naftoflavone

## **12. ALLEGATI**

### **Allegato 1**

Tabella A: risultati quantificazione relativa campioni Standard zootecnici

### **Allegato 2**

Tabella B: risultati quantificazione relativa campioni esperimento DEX PD (vitelloni)

Tabella C1-C2: risultati quantificazione relativa campioni esperimento DEX + E<sub>2</sub>

### **Allegato 3**

Tabella D1-D2: risultati quantificazione relativa campioni esperimento ADD-DHEA in vivo

Tabella E1-E2: risultati quantificazione relativa campioni esperimento epatociti in coltura primaria

### **Allegato 4**

Tabella F: risultati quantificazione relativa campioni esperimento DEX TO (vitelli a carne bianca)

Le caselle contrassegnate dal simbolo (-) corrispondono ai dati di espressione non considerati perché relativi ad individui *outliers*, definiti con il test di Grubbs.



Tabella A. Risultati quantificazione relativa campioni Standard zootecnici

| Campione         | Gene target | CYP1A1       | CYP1A2       | CYP2B6       | CYP2C8       | CYP2C9       | CYP2C18      | CYP2C19      | CYP2E1       | CYP3A4       | UGT1A1       | UGT1A6       | UGT2B17      | GSTA1        | GSTM1        | GSTP1        |
|------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| CH <sub>1</sub>  |             | 0,770        | 0,497        | 0,384        | -            | 0,829        | 0,897        | 0,367        | 0,303        | 0,620        | 0,493        | 1,814        | 0,971        | 0,770        | 0,574        | 0,938        |
| CH <sub>2</sub>  |             | 0,831        | 0,780        | 0,045        | 0,044        | 0,395        | 0,968        | 0,174        | 0,886        | 0,876        | 0,558        | 1,124        | 0,977        | 0,617        | 1,891        | 0,767        |
| CH <sub>3</sub>  |             | 1,184        | -            | 0,007        | 0,824        | 1,249        | -            | -            | 4,911        | -            | 1,394        | 0,945        | 0,998        | 0,967        | 1,404        | 0,716        |
| CH <sub>4</sub>  |             | 0,621        | 0,555        | 0,247        | -            | 0,651        | 0,609        | 0,091        | 0,492        | 0,490        | 0,453        | 1,164        | 0,799        | 0,634        | 0,398        | 0,833        |
| CH <sub>5</sub>  |             | 1,686        | 2,221        | 0,016        | 0,608        | 2,085        | 1,408        | 1,759        | 0,357        | 0,883        | 1,404        | 0,757        | 1,047        | 1,208        | 1,028        | 0,964        |
| CH <sub>6</sub>  |             | 0,826        | 0,960        | 0,209        | 0,139        | 1,311        | 1,427        | 1,270        | 1,410        | 1,094        | 1,265        | 2,233        | 1,195        | 1,780        | 0,539        | 1,033        |
| CH <sub>7</sub>  |             | 0,996        | 1,207        | 0,025        | 0,379        | 1,223        | 0,744        | 0,402        | 0,320        | 1,319        | -            | 0,271        | 1,187        | 1,446        | 1,117        | 1,170        |
| CH <sub>8</sub>  |             | 0,560        | -            | 0,172        | 5,623        | -            | -            | 2,289        | -            | -            | 1,473        | 0,273        | 0,593        | 0,754        | 0,272        | 1,254        |
| CH <sub>13</sub> |             | 1,341        | 0,908        | 7,568        | 0,118        | 0,683        | 1,031        | 0,657        | 0,194        | 1,624        | 1,148        | -            | 1,382        | 0,583        | -            | 1,431        |
| CH <sub>14</sub> |             | 1,184        | 0,871        | 1,329        | 0,265        | 0,574        | 0,916        | 1,992        | 0,126        | 1,094        | 0,812        | 0,417        | 0,851        | 1,242        | 1,777        | 0,893        |
| Media CH         |             | <b>1.000</b> |
| ±                |             | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            |
| DS               |             | <b>0.350</b> | <b>0.542</b> | <b>2.341</b> | <b>1.887</b> | <b>0.523</b> | <b>0.290</b> | <b>0.842</b> | <b>1.521</b> | <b>0.367</b> | <b>0.421</b> | <b>0.679</b> | <b>0.224</b> | <b>0.405</b> | <b>0.598</b> | <b>0.226</b> |
| PM <sub>2</sub>  |             | 2,997        | 1,779        | 9,780        | -            | 3,387        | 1,388        | 2,091        | 1,874        | 2,158        | 1,328        | 0,637        | 1,272        | 1,561        | 5,462        | 0,977        |
| PM <sub>3</sub>  |             | 2,352        | 1,881        | 2,809        | -            | 5,064        | -            | 2,611        | 0,148        | 1,647        | 1,006        | 0,358        | 1,220        | 2,317        | 2,584        | 0,799        |
| PM <sub>4</sub>  |             | 1,807        | 1,683        | 0,058        | 1,731        | 1,853        | 1,884        | -            | 0,028        | 1,079        | 0,920        | 0,562        | 0,977        | 2,872        | 4,140        | 1,345        |
| PM <sub>5</sub>  |             | -            | 1,080        | 2,042        | 1,881        | 2,129        | 1,314        | 2,522        | 0,060        | 1,222        | 0,965        | 0,373        | 0,875        | 1,081        | 1,265        | 1,062        |
| PM <sub>6</sub>  |             | 2,149        | 2,252        | 5,656        | 6,283        | 3,096        | 1,176        | 2,150        | 0,093        | -            | 1,525        | 0,136        | 2,038        | 2,699        | -            | 1,621        |
| PM <sub>7</sub>  |             | 1,733        | 1,425        | 6,726        | 4,862        | 5,898        | 1,332        | 0,385        | 1,025        | 1,283        | 0,939        | -            | 1,354        | 0,915        | 4,957        | 1,107        |
| PM <sub>8</sub>  |             | 1,663        | 1,593        | 1,050        | 9,723        | 2,849        | 1,074        | 0,393        | 1,202        | 1,064        | 0,768        | 0,240        | 1,212        | 1,175        | 5,655        | 1,033        |
| PM <sub>9</sub>  |             | 1,640        | 2,131        | 2,411        | 1,190        | 2,446        | 1,112        | 0,739        | 0,149        | 0,801        | 0,687        | 0,228        | 1,138        | 1,349        | 2,867        | 1,123        |
| Media PM         |             | <b>2.049</b> | <b>1.728</b> | <b>3.817</b> | <b>4.278</b> | <b>3.340</b> | <b>1.326</b> | <b>1.556</b> | <b>0.573</b> | <b>1.322</b> | <b>1.017</b> | <b>0.362</b> | <b>1.261</b> | <b>1.746</b> | <b>3.847</b> | <b>1.134</b> |
| ±                |             | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            |
| DS               |             | <b>0.496</b> | <b>0.377</b> | <b>3.281</b> | <b>3.340</b> | <b>1.429</b> | <b>0.273</b> | <b>1.006</b> | <b>0.701</b> | <b>0.450</b> | <b>0.279</b> | <b>0.182</b> | <b>0.351</b> | <b>0.770</b> | <b>1.654</b> | <b>0.249</b> |
| BA <sub>2</sub>  |             | 2,090        | 1,258        | 6,062        | 1,190        | 2,057        | 2,149        | -            | 0,074        | 2,496        | 1,635        | 0,147        | 1,644        | 2,045        | 5,240        | 1,308        |
| BA <sub>3</sub>  |             | 1,332        | 0,859        | 2,329        | 0,364        | 1,946        | 1,045        | 1,060        | 0,425        | 1,000        | 1,283        | 0,085        | -            | 0,866        | -            | 1,005        |
| BA <sub>4</sub>  |             | 2,047        | 2,332        | 8,455        | 3,056        | 4,925        | 1,923        | 1,489        | 1,543        | 1,580        | 1,985        | 0,295        | 1,461        | 1,948        | 9,983        | 1,492        |
| BA <sub>5</sub>  |             | -            | 1,232        | 7,012        | -            | 2,395        | 1,991        | 0,350        | 1,677        | 1,670        | 1,319        | 0,027        | 1,555        | 1,208        | 7,010        | 1,212        |
| BA <sub>6</sub>  |             | 1,910        | 1,755        | 4,000        | 1,961        | 2,532        | 1,388        | 0,956        | -            | 1,879        | 2,312        | 0,212        | 1,901        | 1,216        | 2,675        | 2,010        |
| BA <sub>7</sub>  |             | 1,964        | 1,445        | 3,555        | 2,030        | 4,318        | 2,520        | 0,556        | 2,323        | 1,505        | 1,904        | 0,024        | 1,888        | 1,572        | 11,628       | 1,382        |
| BA <sub>8</sub>  |             | 2,573        | 2,534        | 1,945        | 5,862        | 4,857        | 2,468        | 1,574        | 2,762        | 1,892        | 1,777        | 0,081        | 2,023        | 2,059        | 3,293        | 1,451        |
| Media BA         |             | <b>2.045</b> | <b>1.631</b> | <b>4.765</b> | <b>2.410</b> | <b>3.290</b> | <b>1.926</b> | <b>0.998</b> | <b>1.468</b> | <b>1.717</b> | <b>1.745</b> | <b>0.124</b> | <b>1.745</b> | <b>1.559</b> | <b>6.638</b> | <b>1.409</b> |
| ±                |             | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            |
| DS               |             | <b>0.396</b> | <b>0.612</b> | <b>2.459</b> | <b>1.916</b> | <b>1.347</b> | <b>0.543</b> | <b>0.489</b> | <b>1.048</b> | <b>0.455</b> | <b>0.368</b> | <b>0.100</b> | <b>0.223</b> | <b>0.476</b> | <b>3.608</b> | <b>0.312</b> |

Tabella B. Risultati quantificazione relativa campioni esperimento DEX (vitelloni)

| Campione        | Gene target | CYP1A1       | CYP1A2       | CYP2B6       | CYP2C9       | CYP2E1       | CYP3A4       | UGT2B17      | GSTA1        | SULT1A1      | CAR          | PXR          | RXR $\alpha$ | HNF4 $\alpha$ | GR           |
|-----------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|
| K <sub>1</sub>  |             | 0,975        | 0,886        | 2,099        | 0,524        | 0,896        | 1,043        | 1,055        | 0,858        | 0,823        | 1,253        | 1,624        | 1,187        | 1,001         | 0,877        |
| K <sub>2</sub>  |             | 0,942        | 0,886        | 0,076        | 1,431        | 0,579        | 0,529        | 1,070        | 1,337        | 0,706        | 0,471        | 0,559        | 0,925        | 1,015         | 0,758        |
| K <sub>3</sub>  |             | 1,398        | -            | -            | 1,162        | 1,258        | 1,506        | 1,290        | -            | 1,346        | 1,083        | 0,774        | 1,041        | 0,927         | 1,043        |
| K <sub>4</sub>  |             | 0,652        | 0,580        | -            | 0,937        | 0,713        | 0,427        | 0,839        | 0,539        | 0,706        | 0,923        | 0,674        | 0,869        | 1,142         | 0,774        |
| K <sub>5</sub>  |             | 0,897        | 1,032        | 0,219        | 0,875        | -            | 0,722        | 1,123        | 1,337        | 0,828        | 1,129        | 1,149        | 1,204        | 1,036         | 0,994        |
| K <sub>6</sub>  |             | 1,709        | 1,219        | 2,143        | 0,984        | 1,660        | 0,987        | -            | -            | -            | -            | 1,879        | 1,318        | 1,330         | 1,592        |
| K <sub>7</sub>  |             | 0,988        | 1,177        | 0,586        | 1,178        | 0,048        | 1,455        | 1,005        | 0,939        | 0,870        | 0,838        | 0,624        | 0,668        | 0,679         | 0,774        |
| K <sub>8</sub>  |             | 0,831        | 1,091        | 1,705        | 0,756        | 1,349        | 1,465        | 0,881        | 0,999        | 1,557        | 1,270        | 1,094        | 0,971        | 0,974         | 1,527        |
| K <sub>9</sub>  |             | 0,608        | 1,129        | 0,171        | 1,154        | 1,496        | 0,865        | 0,736        | 0,992        | 1,164        | 1,032        | 0,624        | 0,817        | 0,896         | 0,660        |
| <b>Media K</b>  |             | <b>1.000</b>  | <b>1.000</b> |
| ±               |             | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±             | ±            |
| <b>DS</b>       |             | <b>0.350</b> | <b>0.209</b> | <b>0.943</b> | <b>0.268</b> | <b>0.541</b> | <b>0.407</b> | <b>0.176</b> | <b>0.278</b> | <b>0.318</b> | <b>0.260</b> | <b>0.478</b> | <b>0.208</b> | <b>0.177</b>  | <b>0.339</b> |
| T <sub>10</sub> |             | 0,872        | 0,917        | 0,227        | 1,836        | 0,009        | 0,973        | 0,845        | 1,365        | 1,483        | 0,923        | 0,953        | 1,085        | 0,733         | 0,994        |
| T <sub>11</sub> |             | 0,694        | 0,593        | 0,160        | 0,868        | 0,006        | 0,713        | 0,783        | 1,669        | 1,453        | 0,576        | 0,586        | 0,773        | 0,497         | 0,818        |
| T <sub>12</sub> |             | 0,808        | 1,121        | 0,075        | 2,124        | 0,082        | 1,496        | 0,971        | 1,716        | 1,657        | 2,122        | 1,658        | 2,053        | 1,672         | 1,141        |
| T <sub>13</sub> |             | 1,909        | -            | -            | 1,773        | 0,028        | 1,029        | 1,738        | -            | -            | 2,594        | 1,366        | 1,983        | 1,166         | -            |
| T <sub>14</sub> |             | 1,052        | 1,177        | 0,042        | 0,751        | -            | 0,753        | 1,702        | 2,232        | 2,040        | 1,361        | 0,901        | 1,482        | 0,753         | 1,215        |
| T <sub>15</sub> |             | 0,377        | 0,653        | 0,712        | 0,614        | 0,041        | 0,387        | 0,762        | 0,834        | 1,108        | 1,068        | 0,674        | 1,085        | 0,522         | 0,865        |
| T <sub>16</sub> |             | 0,770        | 1,381        | 0,016        | 0,756        | 0,012        | 0,393        | 0,772        | 1,230        | 1,739        | 1,608        | 0,864        | 1,078        | 0,796         | 1,058        |
| T <sub>17</sub> |             | 1,341        | 1,219        | 0,144        | 0,805        | 0,032        | 0,973        | 0,998        | 3,029        | 2,112        | 1,490        | 1,057        | 1,422        | 0,994         | 1,207        |
| T <sub>18</sub> |             | 0,982        | 1,039        | 0,003        | 0,937        | 0,038        | 0,647        | 0,938        | 1,124        | 0,806        | 1,236        | 1,087        | 1,364        | 0,884         | 0,896        |
| <b>Media T</b>  |             | <b>0.978</b> | <b>1.012</b> | <b>0.266</b> | <b>1.163</b> | <b>0.031</b> | <b>0.818</b> | <b>1.057</b> | <b>1.650</b> | <b>1.550</b> | <b>1.442</b> | <b>1.016</b> | <b>1.369</b> | <b>0.891</b>  | <b>1.024</b> |
| ±               |             | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±             | ±            |
| <b>DS</b>       |             | <b>0.437</b> | <b>0.276</b> | <b>0.354</b> | <b>0.577</b> | <b>0.024</b> | <b>0.347</b> | <b>0.386</b> | <b>0.701</b> | <b>0.442</b> | <b>0.615</b> | <b>0.332</b> | <b>0.428</b> | <b>0.361</b>  | <b>0.156</b> |
| B <sub>19</sub> |             | 0,879        | 0,936        | 0,088        | 4,046        | 0,424        | 0,830        | 0,906        | 1,034        | 0,932        | 0,874        | 0,926        | 1,155        | 1,416         | 0,807        |
| B <sub>20</sub> |             | 0,922        | 0,715        | 0,266        | 0,465        | 1,029        | 0,743        | 1,179        | 0,566        | 0,721        | 0,761        | 0,973        | 0,840        | 0,591         | 0,921        |
| B <sub>21</sub> |             | -            | 0,626        | 0,015        | 2,023        | 0,501        | 0,433        | 0,794        | 2,426        | 1,041        | 0,601        | 0,620        | 0,778        | 0,533         | 0,743        |
| B <sub>22</sub> |             | 0,866        | 0,580        | 0,023        | 0,273        | 0,031        | 0,625        | 1,005        | 2,040        | 0,992        | 0,810        | 0,543        | 0,741        | 0,454         | 0,753        |
| B <sub>23</sub> |             | 0,948        | 0,930        | 0,193        | 0,485        | 0,149        | 1,029        | 1,299        | 3,602        | 2,040        | 1,068        | 0,633        | -            | 0,824         | 0,889        |
| B <sub>24</sub> |             | 0,872        | 1,419        | -            | 0,546        | 0,002        | 0,967        | 1,290        | 5,023        | -            | 1,542        | 0,895        | -            | 1,615         | 1,110        |
| <b>Media B</b>  |             | <b>0.898</b> | <b>0.868</b> | <b>0.216</b> | <b>1.306</b> | <b>0.356</b> | <b>0.771</b> | <b>1.079</b> | <b>2.449</b> | <b>1.145</b> | <b>0.943</b> | <b>0.765</b> | <b>0.878</b> | <b>0.905</b>  | <b>0.871</b> |
| ±               |             | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±             | ±            |
| <b>DS</b>       |             | <b>0.036</b> | <b>0.309</b> | <b>0.262</b> | <b>1.487</b> | <b>0.388</b> | <b>0.221</b> | <b>0.210</b> | <b>1.654</b> | <b>0.515</b> | <b>0.331</b> | <b>0.186</b> | <b>0.189</b> | <b>0.492</b>  | <b>0.137</b> |

Tabella C1. Risultati quantificazione relativa campioni esperimento DEX + E<sub>2</sub>

| Campione         | Gene target | CYP1A1       | CYP1A2       | CYP2B6       | CYP2C9       | CYP2E1       | CYP3A4       | UGT1A1       | UGT2B17      | GSTA1        | GSTP1        | SULT1A1      |
|------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| K <sub>7</sub>   |             | 1,200        | 1,171        | 0,9970       | 1,034        | 0,996        | 0,757        | 0,552        | 1,045        | 0,962        | 0,960        | 1,031        |
| K <sub>8</sub>   |             | 1,192        | 1,327        | 1,2533       | 1,034        | 1,296        | 0,931        | 1,286        | 1,323        | -            | 1,455        | -            |
| K <sub>9</sub>   |             | 0,843        | 1,264        | 1,4904       | 1,336        | 1,898        | 1,326        | 1,234        | 1,003        | 0,955        | 1,396        | 1,082        |
| K <sub>10</sub>  |             | 1,175        | 0,999        | 0,8924       | 0,606        | 0,106        | 1,281        | 1,082        | 0,942        | 1,498        | 0,775        | 1,090        |
| K <sub>11</sub>  |             | 0,961        | 0,789        | 0,1308       | 1,354        | 0,254        | 1,123        | 0,897        | 0,923        | 0,826        | 0,780        | 1,031        |
| K <sub>12</sub>  |             | 0,630        | 0,450        | 1,2360       | 0,636        | 1,449        | 0,581        | 0,948        | 0,765        | 0,760        | 0,634        | 0,765        |
| <b>Media K</b>   |             | <b>1.000</b> |
| ±                |             | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            |
| <b>DS</b>        |             | <b>0.233</b> | <b>0.333</b> | <b>0.475</b> | <b>0.325</b> | <b>0.700</b> | <b>0.297</b> | <b>0.267</b> | <b>0.185</b> | <b>0.292</b> | <b>0.346</b> | <b>0.134</b> |
| D <sub>1</sub>   |             | 0,584        | 0,482        | 0,0172       | 1,432        | 0,288        | 1,915        | -            | 1,305        | 1,697        | 1,367        | 1,128        |
| D <sub>2</sub>   |             | 0,837        | 0,701        | 0,0301       | 1,327        | 0,001        | 1,441        | 1,143        | 0,765        | 1,167        | 0,604        | 1,468        |
| D <sub>3</sub>   |             | 1,009        | 0,636        | 0,0447       | 1,452        | 0,086        | 1,171        | 1,278        | 1,045        | 1,733        | 1,182        | 1,468        |
| D <sub>4</sub>   |             | 0,878        | 0,598        | 0,0281       | 1,373        | 0,215        | 1,308        | 0,910        | 0,916        | 1,794        | 1,387        | 1,323        |
| D <sub>5</sub>   |             | 0,975        | 0,673        | 0,0264       | 1,668        | 0,015        | 1,524        | 1,038        | 1,060        | 1,184        | 0,595        | 1,176        |
| D <sub>6</sub>   |             | 0,948        | 0,692        | 0,0152       | 1,041        | 0,003        | 1,556        | 1,031        | 0,982        | 1,234        | 0,698        | 1,144        |
| <b>Media D</b>   |             | <b>0.872</b> | <b>0.630</b> | <b>0.027</b> | <b>1.382</b> | <b>0.102</b> | <b>1.486</b> | <b>1.080</b> | <b>1.012</b> | <b>1.468</b> | <b>0.972</b> | <b>1.285</b> |
| ±                |             | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            |
| <b>DS</b>        |             | <b>0.155</b> | <b>0.082</b> | <b>0.011</b> | <b>0.204</b> | <b>0.123</b> | <b>0.254</b> | <b>0.138</b> | <b>0.180</b> | <b>0.302</b> | <b>0.381</b> | <b>0.158</b> |
| DE <sub>13</sub> |             | 1,183        | 0,971        | 0,5766       | 1,876        | 0,035        | 1,566        | 0,903        | 0,755        | 1,060        | 0,620        | 1,176        |
| DE <sub>14</sub> |             | 1,529        | 1,100        | 0,0309       | -            | 0,388        | 2,200        | 0,849        | 1,105        | 3,039        | 1,830        | 1,489        |
| DE <sub>15</sub> |             | 0,837        | 0,925        | 0,7769       | 0,919        | 0,410        | 1,115        | 0,512        | 0,588        | 1,128        | 1,435        | 0,976        |
| DE <sub>16</sub> |             | 1,175        | 0,736        | 0,0627       | 0,789        | 1,129        | 1,431        | 0,968        | 0,948        | 1,562        | 1,743        | 1,710        |
| DE <sub>17</sub> |             | 1,639        | 1,139        | 2,1372       | 1,633        | 0,014        | 2,096        | 1,323        | 0,891        | 2,664        | 1,088        | 1,409        |
| DE <sub>18</sub> |             | 1,217        | 1,524        | 0,0432       | 0,757        | 0,092        | 1,503        | 1,573        | 1,243        | 2,401        | 0,902        | 1,978        |
| <b>Media DE</b>  |             | <b>1.263</b> | <b>1.066</b> | <b>0.605</b> | <b>1.195</b> | <b>0.345</b> | <b>1.652</b> | <b>1.021</b> | <b>0.922</b> | <b>1.975</b> | <b>1.270</b> | <b>1.456</b> |
| ±                |             | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            |
| <b>DS</b>        |             | <b>0.286</b> | <b>0.266</b> | <b>0.815</b> | <b>0.522</b> | <b>0.422</b> | <b>0.416</b> | <b>0.374</b> | <b>0.236</b> | <b>0.838</b> | <b>0.481</b> | <b>0.361</b> |

Tabella C2. Risultati quantificazione relativa campioni esperimento DEX + E<sub>2</sub>

| <i>Gene target</i>                  |                                     |                                     |                                     |                                     |                                     |                                     |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Campione                            | CAR                                 | PXR                                 | RXR $\alpha$                        | HNF4 $\alpha$                       | GR                                  | ER $\alpha$                         |
| K <sub>7</sub>                      | 0,816                               | 1,415                               | 0,618                               | 0,989                               | 0,900                               | -                                   |
| K <sub>8</sub>                      | 1,421                               | 1,080                               | -                                   | 1,168                               | -                                   | 1,368                               |
| K <sub>9</sub>                      | 1,254                               | 0,973                               | 1,371                               | 1,488                               | 1,179                               | 0,909                               |
| K <sub>10</sub>                     | 1,187                               | 1,029                               | 1,279                               | 0,996                               | 1,101                               | 0,848                               |
| K <sub>11</sub>                     | 0,816                               | 0,728                               | 1,032                               | 0,814                               | 0,938                               | 1,073                               |
| K <sub>12</sub>                     | 0,506                               | 0,774                               | 0,700                               | 0,545                               | 0,882                               | 0,802                               |
| <b>Media K <math>\pm</math> DS</b>  | <b>1.000 <math>\pm</math> 0.343</b> | <b>1.000 <math>\pm</math> 0.247</b> | <b>1.000 <math>\pm</math> 0.336</b> | <b>1.000 <math>\pm</math> 0.319</b> | <b>1.000 <math>\pm</math> 0.132</b> | <b>1.000 <math>\pm</math> 0.230</b> |
| D <sub>1</sub>                      | 0,887                               | 1,538                               | 1,723                               | 1,305                               | -                                   | 0,552                               |
| D <sub>2</sub>                      | 0,715                               | 1,258                               | 1,068                               | 1,360                               | 0,795                               | 0,819                               |
| D <sub>3</sub>                      | 1,092                               | 1,043                               | 1,511                               | 1,389                               | 0,789                               | 1,406                               |
| D <sub>4</sub>                      | 0,632                               | 0,883                               | 1,343                               | 1,067                               | 1,027                               | 0,708                               |
| D <sub>5</sub>                      | 0,682                               | 1,065                               | 1,315                               | 0,755                               | 0,800                               | 0,518                               |
| D <sub>6</sub>                      | 0,937                               | 0,890                               | 1,500                               | 1,017                               | 0,789                               | 1,233                               |
| <b>Media D <math>\pm</math> DS</b>  | <b>0.864 <math>\pm</math> 0.178</b> | <b>1.113 <math>\pm</math> 0.250</b> | <b>1.410 <math>\pm</math> 0.222</b> | <b>1.149 <math>\pm</math> 0.247</b> | <b>0.840 <math>\pm</math> 0.105</b> | <b>0.873 <math>\pm</math> 0.367</b> |
| DE <sub>13</sub>                    | 0,701                               | 0,620                               | -                                   | 0,556                               | 0,806                               | -                                   |
| DE <sub>14</sub>                    | 1,632                               | 1,435                               | 1,712                               | 0,962                               | 1,472                               | 2,146                               |
| DE <sub>15</sub>                    | 1,026                               | 1,249                               | 1,202                               | 1,176                               | 0,888                               | 1,285                               |
| DE <sub>16</sub>                    | 1,187                               | 1,190                               | 1,390                               | 1,468                               | 1,196                               | 1,397                               |
| DE <sub>17</sub>                    | 1,441                               | 1,103                               | 1,521                               | 1,332                               | 1,327                               | 1,560                               |
| DE <sub>18</sub>                    | 1,599                               | 1,988                               | 1,748                               | 1,584                               | 1,493                               | 1,908                               |
| <b>Media DE <math>\pm</math> DS</b> | <b>1.264 <math>\pm</math> 0.363</b> | <b>1.264 <math>\pm</math> 0.447</b> | <b>1.514 <math>\pm</math> 0.227</b> | <b>1.180 <math>\pm</math> 0.376</b> | <b>1.197 <math>\pm</math> 0.293</b> | <b>1.659 <math>\pm</math> 0.360</b> |

Tabella D1. Risultati quantificazione relativa campioni esperimento **ADD-DHEA in vivo** (enzimi)

| Campione                | Gene target | CYP1A1       | CYP1A2       | CYP2B6       | CYP2C9       | CYP2E1       | CYP3A4       | CYP4A11      | UGT2B17      | GSTA1        | DHEA-ST      | 17βHSDII     |
|-------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>K</b> <sub>759</sub> |             | 0,683        | 0,836        | 0,815        | 0,670        | 0,579        | 0,993        | 1,273        | 0,585        | 0,935        | 0,678        | 0,581        |
| <b>K</b> <sub>869</sub> |             | 1,324        | 1,151        | 0,787        | 1,425        | 0,567        | 0,993        | 0,628        | 1,131        | 1,097        | 0,837        | 0,906        |
| <b>K</b> <sub>428</sub> |             | 1,110        | 0,814        | 0,564        | 1,249        | 1,058        | 0,659        | 0,615        | 0,938        | 0,808        | 0,910        | 1,204        |
| <b>K</b> <sub>75</sub>  |             | 1,079        | 1,159        | 1,735        | 1,302        | -            | 1,172        | 0,811        | 1,411        | 0,948        | 1,408        | 1,387        |
| <b>K</b> <sub>11</sub>  |             | 0,818        | 0,890        | 1,489        | 0,684        | 1,548        | 0,790        | 1,230        | 0,780        | 1,417        | 0,787        | 0,971        |
| <b>K</b> <sub>105</sub> |             | 0,986        | 1,151        | 0,609        | 0,670        | 1,249        | 1,394        | 1,442        | 1,154        | 0,795        | 1,379        | 0,951        |
| <b>Media K</b>          |             | <b>1.000</b> |
| ±                       |             | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            |
| <b>DS</b>               |             | <b>0.227</b> | <b>0.170</b> | <b>0.490</b> | <b>0.361</b> | <b>0.427</b> | <b>0.263</b> | <b>0.359</b> | <b>0.295</b> | <b>0.232</b> | <b>0.314</b> | <b>0.275</b> |
| <b>A</b> <sub>77</sub>  |             | 0,966        | 0,842        | 1,324        | 0,612        | 0,010        | 1,028        | 0,806        | 0,542        | 0,537        | 0,635        | 0,583        |
| <b>A</b> <sub>745</sub> |             | 0,730        | 0,878        | 0,804        | 1,008        | -            | 1,404        | 1,318        | 1,030        | 0,588        | 1,296        | 0,900        |
| <b>A</b> <sub>482</sub> |             | 1,292        | 1,446        | 0,025        | 1,249        | 0,266        | 1,132        | 0,535        | 1,115        | 1,041        | 1,176        | 1,115        |
| <b>A</b> <sub>485</sub> |             | 1,197        | 1,922        | 1,288        | 1,207        | 0,371        | 2,203        | 1,776        | 0,887        | 0,734        | 1,370        | 1,139        |
| <b>A</b> <sub>622</sub> |             | -            | 1,989        | 0,181        | 1,672        | 0,587        | 1,384        | 0,888        | -            | 1,595        | 2,034        | -            |
| <b>A</b> <sub>503</sub> |             | 0,835        | 1,627        | -            | 0,824        | 0,642        | 1,878        | 1,355        | 0,800        | 1,857        | 1,342        | 0,800        |
| <b>Media A</b>          |             | <b>1.004</b> | <b>1.451</b> | <b>0.724</b> | <b>1.095</b> | <b>0.375</b> | <b>1.505</b> | <b>1.113</b> | <b>0.875</b> | <b>1.059</b> | <b>1.309</b> | <b>0.907</b> |
| ±                       |             | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            |
| <b>DS</b>               |             | <b>0.238</b> | <b>0.498</b> | <b>0.606</b> | <b>0.370</b> | <b>0.255</b> | <b>0.451</b> | <b>0.451</b> | <b>0.223</b> | <b>0.552</b> | <b>0.448</b> | <b>0.231</b> |
| <b>D</b> <sub>537</sub> |             | 0,712        | 1,066        | 0,125        | 1,719        | -            | 0,965        | 1,093        | 0,828        | 0,872        | 0,781        | 1,096        |
| <b>D</b> <sub>604</sub> |             | 0,182        | 0,317        | 0,020        | 0,114        | 0,002        | 0,312        | 0,114        | -            | -            | 0,923        | 0,101        |
| <b>D</b> <sub>918</sub> |             | 1,087        | 1,359        | -            | 0,612        | 0,660        | 1,612        | 1,172        | 0,851        | 1,196        | 1,468        | 0,741        |
| <b>D</b> <sub>159</sub> |             | 1,485        | 1,250        | 2,488        | 1,496        | 1,485        | 0,999        | 0,762        | 0,822        | 1,260        | 0,750        | 1,055        |
| <b>D</b> <sub>359</sub> |             | 0,908        | 0,915        | 0,826        | 0,575        | 0,732        | 1,301        | 0,606        | 0,984        | 0,744        | 1,243        | 1,610        |
| <b>Media D</b>          |             | <b>0.875</b> | <b>0.982</b> | <b>0.865</b> | <b>0.903</b> | <b>0.720</b> | <b>1.038</b> | <b>0.750</b> | <b>0.871</b> | <b>1.018</b> | <b>1.033</b> | <b>0.921</b> |
| ±                       |             | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            | ±            |
| <b>DS</b>               |             | <b>0.481</b> | <b>0.409</b> | <b>1.140</b> | <b>0.677</b> | <b>0.606</b> | <b>0.483</b> | <b>0.424</b> | <b>0.076</b> | <b>0.249</b> | <b>0.312</b> | <b>0.554</b> |

Tabella D2. Risultati quantificazione relativa campioni esperimento **ADD-DHEA *in vivo*** (fattori di trascrizione)

| <b>Gene target</b>                 | <b>CAR</b>                          | <b>PXR</b>                          | <b>RXR<math>\alpha</math></b>       | <b>HNF4<math>\alpha</math></b>      | <b>PPAR<math>\alpha</math></b>      |
|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Campione</b>                    |                                     |                                     |                                     |                                     |                                     |
| <b>K<sub>759</sub></b>             | 0,624                               | 0,724                               | 0,807                               | 0,540                               | 0,345                               |
| <b>K<sub>869</sub></b>             | 1,414                               | 0,549                               | 1,173                               | 1,118                               | 1,428                               |
| <b>K<sub>428</sub></b>             | 0,853                               | 0,702                               | 0,790                               | 0,966                               | 1,045                               |
| <b>K<sub>75</sub></b>              | 1,194                               | 1,235                               | 0,959                               | 0,908                               | 0,530                               |
| <b>K<sub>11</sub></b>              | 0,758                               | 1,361                               | 0,943                               | 0,946                               | 0,781                               |
| <b>K<sub>105</sub></b>             | 1,157                               | 1,429                               | 1,329                               | 1,522                               | 1,871                               |
| <b>Media K <math>\pm</math> DS</b> | <b>1.000 <math>\pm</math> 0.302</b> | <b>1.000 <math>\pm</math> 0.384</b> | <b>1.000 <math>\pm</math> 0.212</b> | <b>1.000 <math>\pm</math> 0.319</b> | <b>1.000 <math>\pm</math> 0.573</b> |
| <b>A<sub>77</sub></b>              | 1,223                               | 0,892                               | 0,824                               | 0,883                               | 1,172                               |
| <b>A<sub>745</sub></b>             | 1,102                               | 1,075                               | 1,075                               | 0,960                               | 1,398                               |
| <b>A<sub>482</sub></b>             | 1,181                               | 0,979                               | 0,953                               | 1,280                               | 1,234                               |
| <b>A<sub>485</sub></b>             | 1,809                               | 1,279                               | 1,165                               | 1,095                               | 1,365                               |
| <b>A<sub>622</sub></b>             | 1,625                               | 1,252                               | 1,395                               | 1,495                               | 1,305                               |
| <b>A<sub>503</sub></b>             | 1,133                               | 1,164                               | 1,189                               | 1,161                               | 1,509                               |
| <b>Media A <math>\pm</math> DS</b> | <b>1.346 <math>\pm</math> 0.296</b> | <b>1.107 <math>\pm</math> 0.153</b> | <b>1.100 <math>\pm</math> 0.199</b> | <b>1.146 <math>\pm</math> 0.222</b> | <b>1.331 <math>\pm</math> 0.121</b> |
| <b>D<sub>537</sub></b>             | 1,043                               | 0,505                               | 1,007                               | 0,646                               | 1,027                               |
| <b>D<sub>604</sub></b>             | 0,387                               | 0,313                               | 0,532                               | 0,445                               | 0,666                               |
| <b>D<sub>918</sub></b>             | 0,660                               | 0,855                               | 0,914                               | 0,880                               | 0,635                               |
| <b>D<sub>159</sub></b>             | 1,390                               | 0,355                               | 0,853                               | 0,732                               | 0,423                               |
| <b>D<sub>359</sub></b>             | 1,000                               | 0,832                               | 0,862                               | 1,021                               | 0,402                               |
| <b>Media D <math>\pm</math> DS</b> | <b>0.896 <math>\pm</math> 0.385</b> | <b>0.572 <math>\pm</math> 0.258</b> | <b>0.833 <math>\pm</math> 0.179</b> | <b>0.745 <math>\pm</math> 0.221</b> | <b>0.631 <math>\pm</math> 0.252</b> |

Tabella E1-E2. Risultati quantificazione relativa campioni esperimento **epatociti in coltura primaria**

| <i>Gene target</i>      | CYP1A1               | CYP1A2               | CYP2B6               | CYP2C9               | CYP2E1               | CYP3A4               | CYP4A11              | UGT2B17              | GSTA1                | DHEA-ST              | 17βHSDII             |
|-------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <b>Campione</b>         |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |
| <b>IC<sub>6</sub>X</b>  | 1,0346               | 1,1411               | 1,1173               | 1,0623               | 1,0416               | 1,4749               | 0,8184               | 1,1046               | 1,1883               | 1,2864               | 0,7803               |
| <b>IC<sub>6</sub>Y</b>  | 0,9654               | 0,8589               | 0,8827               | 0,9377               | 0,9584               | 0,5251               | 1,1816               | 0,6002               | 0,8117               | 0,7136               | 0,7537               |
| <b>II<sub>6</sub>X</b>  | 1,2575               | 1,1411               | 1,1207               | 1,2347               | 1,1479               | 1,1309               | 1,0864               | 1,1555               | 1,0554               | 1,0139               | 1,1519               |
| <b>II<sub>6</sub>Y</b>  | 0,7425               | 0,8589               | 0,8793               | 0,7653               | 0,8521               | 0,8691               | 0,9136               | 1,1396               | 0,9446               | 0,9861               | 1,3141               |
| <b>Media CTRL ± DS</b>  | <b>1.000 ± 0.212</b> | <b>1.000 ± 0.163</b> | <b>1.000 ± 0.137</b> | <b>1.000 ± 0.198</b> | <b>1.000 ± 0.126</b> | <b>1.000 ± 0.402</b> | <b>1.000 ± 0.164</b> | <b>1.000 ± 0.267</b> | <b>1.000 ± 0.160</b> | <b>1.000 ± 0.234</b> | <b>1.000 ± 0.277</b> |
| <b>IA<sub>6</sub>X</b>  | 0,2175               | 0,5785               | 1,8025               | 1,4612               | 0,7164               | 0,8297               | 0,9143               | 1,0894               | 1,3370               | 1,3043               | 1,2588               |
| <b>IA<sub>6</sub>Y</b>  | 0,2190               | 0,6928               | 1,7777               | 1,1787               | 0,8698               | 0,9664               | 0,9207               | 1,1595               | 1,5146               | 1,6058               | 1,4261               |
| <b>IIA<sub>6</sub>X</b> | 0,4035               | 0,7903               | 2,0201               | 1,0601               | 0,9653               | 1,4020               | 1,6930               | 1,3647               | 1,4618               | 1,3012               | 1,4480               |
| <b>IIA<sub>6</sub>Y</b> | 0,6287               | 1,7660               | 1,4788               | 0,7291               | 1,5042               | 1,0625               | 0,8120               | 1,1008               | 1,0554               | 0,9861               | 1,1599               |
| <b>Media ADD ± DS</b>   | <b>0.367 ± 0.195</b> | <b>0.957 ± 0.546</b> | <b>1.770 ± 0.222</b> | <b>1.107 ± 0.303</b> | <b>1.014 ± 0.343</b> | <b>1.065 ± 0.244</b> | <b>1.085 ± 0.408</b> | <b>1.179 ± 0.128</b> | <b>1.342 ± 0.205</b> | <b>1.299 ± 0.253</b> | <b>1.323 ± 0.138</b> |
| <b>DHEA X</b>           | 0,5002               | 0,8239               | 4,2410               | 3,0401               | 0,3509               | 1,5774               | 2,7313               | 0,6192               | 1,8762               | 1,8275               | 1,5200               |
| <b>DHEA Y</b>           | 0,4446               | 0,6031               | 0,9556               | 2,8563               | 0,2951               | 1,4717               | 1,4040               | 0,6023               | 1,7505               | 2,0277               | 2,4352               |
| <b>Media DHEA ± DS</b>  | <b>0.472 ± 0.039</b> | <b>0.713 ± 0.156</b> | <b>2.598 ± 0.894</b> | <b>2.948 ± 0.130</b> | <b>0.323 ± 0.040</b> | <b>1.525 ± 0.075</b> | <b>2.068 ± 0.939</b> | <b>0.611 ± 0.012</b> | <b>1.813 ± 0.089</b> | <b>1.928 ± 0.142</b> | <b>1.978 ± 0.647</b> |

| <i>Gene target</i>      | CAR                  | PXR                  | RXRα                 | HNF4α                | PPARα                |
|-------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <b>Campione</b>         |                      |                      |                      |                      |                      |
| <b>IC<sub>6</sub>X</b>  | 0,9170               | 1,0277               | 0,9273               | 1,0035               | 1,2510               |
| <b>IC<sub>6</sub>Y</b>  | 1,0830               | 0,9723               | 1,0727               | 0,9965               | 0,7490               |
| <b>II<sub>6</sub>X</b>  | 0,8759               | 0,9481               | 1,0346               | 0,8301               | 0,9446               |
| <b>II<sub>6</sub>Y</b>  | 1,1241               | 1,0519               | 0,9654               | 1,1699               | 1,0554               |
| <b>Media CTRL ± DS</b>  | <b>1.000 ± 0.122</b> | <b>1.000 ± 0.048</b> | <b>1.000 ± 0.066</b> | <b>1.000 ± 0.139</b> | <b>1.000 ± 0.210</b> |
| <b>IA<sub>6</sub>X</b>  | 0,6008               | 0,7267               | 0,8186               | 1,2354               | 0,7595               |
| <b>IA<sub>6</sub>Y</b>  | 0,5926               | 0,7897               | 0,8834               | 1,4590               | 0,9815               |
| <b>IIA<sub>6</sub>X</b> | 1,2473               | 0,9547               | 1,0275               | 1,6261               | 1,1629               |
| <b>IIA<sub>6</sub>Y</b> | 0,6547               | 0,4611               | 0,9521               | 1,2981               | 0,7834               |
| <b>Media ADD ± DS</b>   | <b>0.774 ± 0.317</b> | <b>0.733 ± 0.205</b> | <b>0.920 ± 0.090</b> | <b>1.405 ± 0.175</b> | <b>0.922 ± 0.189</b> |
| <b>DHEA X</b>           | 6,0578               | 5,0039               | 1,9174               | 1,9337               | 2,8046               |
| <b>DHEA Y</b>           | 1,9169               | 3,3942               | 1,3558               | 1,2070               | 1,7750               |
| <b>Media DHEA ± DS</b>  | <b>3.987 ± 2.928</b> | <b>4.199 ± 1.138</b> | <b>1.637 ± 0.397</b> | <b>1.570 ± 0.514</b> | <b>2.290 ± 0.728</b> |

Tabella F. Risultati quantificazione relativa campioni esperimento DEX vitelli a carne bianca

| Gene target                         | CYP2B6                              | CYP2C9                              | CYP3A4                              | CAR                                 | PXR                                 | RXR $\alpha$                        | HNF4 $\alpha$                       | GR                                  |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Campione</b>                     |                                     |                                     |                                     |                                     |                                     |                                     |                                     |                                     |
| <b>K<sub>1</sub></b>                | 0,378                               | -                                   | 1,112                               | 1,022                               | 1,630                               | 0,830                               | 0,527                               | 1,198                               |
| <b>K<sub>2</sub></b>                | 0,058                               | 0,951                               | 1,192                               | 0,694                               | 0,969                               | 0,660                               | 0,593                               | 0,764                               |
| <b>K<sub>3</sub></b>                | 2,743                               | 1,273                               | 0,749                               | 1,051                               | 0,626                               | 0,973                               | 1,084                               | 1,058                               |
| <b>K<sub>4</sub></b>                | 0,745                               | 0,706                               | 0,948                               | 1,233                               | 0,714                               | 1,072                               | 1,316                               | 0,980                               |
| <b>K<sub>5</sub></b>                | 1,076                               | 1,070                               | -                                   | -                                   | 1,060                               | 1,465                               | 1,480                               | -                                   |
| <b>Media K <math>\pm</math> DS</b>  | <b>1.000 <math>\pm</math> 1.047</b> | <b>1.000 <math>\pm</math> 0.237</b> | <b>1.000 <math>\pm</math> 0.196</b> | <b>1.000 <math>\pm</math> 0.225</b> | <b>1.000 <math>\pm</math> 0.395</b> | <b>1.000 <math>\pm</math> 0.303</b> | <b>1.000 <math>\pm</math> 0.426</b> | <b>1.000 <math>\pm</math> 0.182</b> |
| <b>D<sub>1</sub></b>                | 0,428                               | 0,985                               | 0,954                               | 1,436                               | 1,479                               | 1,415                               | 1,401                               | 1,425                               |
| <b>D<sub>2</sub></b>                | 1,860                               | 0,817                               | 0,608                               | 1,127                               | 1,053                               | 1,339                               | 1,114                               | 1,267                               |
| <b>D<sub>3</sub></b>                | 0,318                               | 2,563                               | 0,988                               | 1,134                               | 0,685                               | 1,000                               | 1,084                               | 1,486                               |
| <b>D<sub>4</sub></b>                | 2,455                               | 1,482                               | 0,541                               | 0,896                               | 0,729                               | 0,688                               | 0,740                               | 1,150                               |
| <b>D<sub>5</sub></b>                | 1,440                               | -                                   | 0,878                               | 0,842                               | 1,641                               | 0,824                               | 0,720                               | 0,953                               |
| <b>Media T <math>\pm</math> DS</b>  | <b>1.300 <math>\pm</math> 0.921</b> | <b>1.462 <math>\pm</math> 0.787</b> | <b>0.794 <math>\pm</math> 0.206</b> | <b>1.087 <math>\pm</math> 0.236</b> | <b>1.118 <math>\pm</math> 0.432</b> | <b>1.053 <math>\pm</math> 0.317</b> | <b>1.012 <math>\pm</math> 0.285</b> | <b>1.256 <math>\pm</math> 0.215</b> |
| <b>V<sub>1</sub></b>                | 0,305                               | 1,751                               | 0,445                               | 0,621                               | 0,639                               | 1,007                               | 0,990                               | 1,549                               |
| <b>V<sub>2</sub></b>                | 0,557                               | 0,817                               | 0,825                               | 0,961                               | 0,740                               | 0,801                               | 0,970                               | -                                   |
| <b>V<sub>3</sub></b>                | 0,343                               | 4,078                               | 0,775                               | 1,199                               | 0,879                               | 1,065                               | 1,316                               | 1,570                               |
| <b>V<sub>4</sub></b>                | 2,064                               | 1,493                               | 1,313                               | 1,377                               | 1,439                               | 1,072                               | 1,835                               | 1,960                               |
| <b>V<sub>5</sub></b>                | 2,743                               | 3,726                               | -                                   | -                                   | 2,211                               | -                                   | -                                   | 1,842                               |
| <b>Media BA <math>\pm</math> DS</b> | <b>1.202 <math>\pm</math> 1.127</b> | <b>2.373 <math>\pm</math> 1.442</b> | <b>0.840 <math>\pm</math> 0.358</b> | <b>1.039 <math>\pm</math> 0.327</b> | <b>1.182 <math>\pm</math> 0.653</b> | <b>0.987 <math>\pm</math> 0.127</b> | <b>1.278 <math>\pm</math> 0.404</b> | <b>1.730 <math>\pm</math> 0.203</b> |

### 13. PUBBLICAZIONI

#### a. "Per esteso"

**a.1. GIANTIN M., CARLETTI M., CAPOLONGO F., PEGOLO S., LOPPARELLI R.M., GUSSON F., NEBBIA C., CANTIELLO M., MARTIN P., PINEAU T., DACASTO M. (2007):**

Effect of breed upon cytochrome P450s and phase II enzymes expression in cattle liver.

*Drug Metabolism and Disposition* (submitted)

**a.2. MENOZZI A., POZZOLI C., POLI E., DACASTO M., GIANTIN M., LOPPARELLI R.M., PASSERI B., ZULLIAN C., GOBBETTI T., BERTINI S. (2007):**

Effects of non-selective and selective cyclooxygenase inhibitor on small intestinal motility in the horse.

*Research in Veterinary Science* (submitted)

**a.3. PEGOLO S., MERLANTI R., GIANTIN M., DACASTO M., MONTESISSA C., CAPOLONGO F. (2007):**

Validation of HPLC determination of CYP1A and CYP2C activities in bovine liver microsomes.

*Journal of Chromatography B* (submitted)

**a.4. CARLETTI M., CANTIELLO M., GIANTIN M., NEBBIA C., CANNIZZO F.T., BOLLO E., DACASTO M. (2007)**

Serum antioxidant enzyme activities and oxidative stress parameters as possible biomarkers of exposure in veal calves illegally treated with dexamethasone.

*Toxicology in vitro*, **21**(2), 277-283.

**a.5. CANTIELLO M., GIANTIN M., NEBBIA C., BOLLO E., LASSERRE F., MARTIN P., PINEAU T., DACASTO M. (2005):**

Sequencing and cloning of some relevant drug metabolism genes in cattle: The Programma Galileo 2003 Summary Report.

*Pharmacologyonline* **3**, 66 – 76

#### b. "Comunicazioni brevi"

**b.1. GIANTIN M., CARLETTI M., CAPOLONGO F., NEBBIA C., DACASTO M. (2006):**

Expression of liver cytochrome P450 drug metabolizing enzymes in different meat cattle breeds.

*Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **29** (Spl. 1), 117.

**b.2. GIANTIN M., CUNIBERTI B., RE G., DACASTO M. (2006):**

Cloning, partial sequencing and expression of cyclooxygenase isoforms in the common digital artery of the horse: an *in vitro* study.

*Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **29** (Spl. 1), 190-191.

**c. Riassunti di partecipazione a Congressi nazionali/internazionali**

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

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

*Proceedings of the 15<sup>th</sup> International Conference on Cytochrome P450 Biochemistry, Biophysics, Functional genomics*, Bled - Slovenia, June 17-21 2007, 121.

**c.2.** CAPOLONGO F., DE BONA C., **GIANTIN M.**, MERLANTI R., CANTIELLO M., NEBBIA C., MONTESISSA C., DACASTO M. (2006):

Effects of illicit drug treatments upon the cattle liver cytochrome P4503A (CYP3A) dependent hydroxylation of testosterone and protein expression.

*Atti del 16<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (MDO)*, Budapest, Hungary, September 3<sup>rd</sup>-7<sup>th</sup> 2006, 159.

**c.3.** CARLETTI M., CANTIELLO M., **GIANTIN M.**, NEBBIA C., CANNIZZO F.T., BOLLO E., DACASTO M. (2006):

Serum antioxidant enzyme activities and oxidative stress parameters as possible biomarkers of exposure in veal calves illegally treated with dexamethasone.

*Atti del 46<sup>th</sup> ETCS International Meeting – 3<sup>rd</sup> International Joint Meeting AICC – CELLTOX “In Vitro Cytotoxicity Mechanism”*, Verona, Italy March 26th – 28th 2006, 59.

**c.4.** CANTIELLO M., **GIANTIN M.**, NEBBIA C., BOLLO E., LASSERRE F., MARTIN P., PINEAU T., DACASTO M. (2005):

Sequencing and cloning of some drug metabolism genes in cattle: The Programma Galileo 2003 Summary Report.

*Atti del Convegno “Citocromo P450: aspetti farmacologici, tossicologici e ambientali”* Siena, Certosa di Pontignano, 12 - 13 settembre 2005,

**d. Altro**

**d.1.** CANTIELLO M., **GIANTIN M.**, LASSERRE F., MARTIN P., DACASTO M., PINEAU T. (2005):

*Bos taurus* cytochrome P450 family 4 subfamily A (CYP4A) mRNA, partial cds

GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), sequence ID DQ100360

**d.2.** CANTIELLO M., **GIANTIN M.**, LASSERRE F., MARTIN P., DACASTO M., PINEAU T. (2005):

*Bos taurus* retinoid X receptor alpha (RXRa) mRNA, partial cds

GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), sequence ID DQ100361

**d.3.** **GIANTIN M.**, CANTIELLO M., LASSERRE F., MARTIN P., PINEAU T., DACASTO M. (2005):

*Bos taurus* cytochrome P450 family 2 subfamily B (CYP2B) mRNA, partial cds

GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), sequence ID DQ087595

**d.4.** **GIANTIN M.**, CANTIELLO M., LASSERRE F., MARTIN P., PINEAU T., DACASTO M. (2005):

Bos taurus UDP glycosyltransferase 1 family polypeptide A4 (UGT1A4) mRNA, partial cds

GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), sequence ID DQ192584

**d.5. GIANTIN M., CANTIELLO M., LASSERRE F., MARTIN P., PINEAU T., DACASTO M. (2005):**

Bos taurus glucocorticoid receptor alpha (GR-A) mRNA, partial cds

GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), sequence ID DQ192585

**d.6. GIANTIN M., CANTIELLO M., LASSERRE F., MARTIN P., PINEAU T., DACASTO M. (2005):**

Bos taurus hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4A) mRNA, partial cds

GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), sequence ID DQ192586

**d.7. GIANTIN M., CUNIBERTI B., BARBERO R., RE G., ODORE R., BADINO P., DACASTO M. (2005):**

Equus caballus prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (Ptgs1) mRNA, partial cds

GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), sequence ID DQ246452

**d.8. GIANTIN M., CUNIBERTI B., BARBERO R., RE G., ODORE R., BADINO P., DACASTO M. (2006):**

Equus caballus prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2) mRNA, partial cds

GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), sequence ID DQ480158

**d.9. CANTIELLO M., MARTIN P.G.P., PINEAU T., GIANTIN M., DACASTO M., NEBBIA C. (2006):**

Bos taurus hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2 (HSD17B2), mRNA

GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), sequence ID NM\_001075726



## 14. RINGRAZIAMENTI

*In primis* un enorme grazie alla mia famiglia che mi ha supportato emotivamente nonché sopportato nei momenti più difficili di questo periodo, spesso caratterizzato da sbalzi di umore... Spero tanto che l'impegno investito abbia potuto regalarvi le soddisfazioni che meritate.

A mio nonno Ivaldo, "la mia Musa ispiratrice al maschile", nonché il mio più grande sostenitore: grazie per avermi guidato e sostenuto nelle mie scelte, per avermi suggerito la strada della Medicina Veterinaria, senza la quale non avrei potuto accedere al fantastico mondo della ricerca.

Al mio Supervisore, Prof. Mauro Dacasto: grazie per la fiducia che ha sempre avuto nei miei confronti fin dal primo giorno, per avermi dato la possibilità di lavorare in laboratorio, indicandomi la strada della biologia molecolare, per aver creduto nelle mie capacità, per aver potuto condividere le gioie ed i dolori della ricerca e per le chiacchierate scherzose (spero un giorno o l'altro però di poterle dare del tu...!).

A Rosa, la collega migliore che una persona possa desiderare, va un ringraziamento particolare per l'aiuto offertomi, la disponibilità, il sostegno nei momenti di crisi, la pazienza, i preziosi insegnamenti, nonché per avermi condotto per mano nella scoperta della *Real Time* PCR.

A Francesca, grazie per il supporto fin dal mio primo giorno di internato presso il laboratorio di Farmacologia e Tossicologia ma soprattutto per aver scoperto in me il "gene" della ricerca.

A Guglielmo e Claudia, miei compagni di avventura, grazie per il vostro aiuto e la vostra compagnia.

Alla Prof. Montesissa e a tutti i colleghi dell'Area di Farmacologia e Tossicologia, grazie per il sostegno, la collaborazione e per avermi dato la possibilità di lavorare con voi.

A tutte le tesiste del Prof. Dacasto, grazie per i bei momenti passati insieme e per il vostro prezioso aiuto.

Al Dr. Thierry Pineau, grazie per avermi accolto a braccia aperte, per avermi dato la possibilità di lavorare presso il Laboratorio di *Pharmacologie et Toxicologie* dell'I.N.R.A. di Toulouse, per avermi insegnato moltissimo e per avermi dedicato del tempo prezioso.

Ad Arnaud, mio carissimo amico nonché persona eccezionale, grazie per la simpatia, la disponibilità, l'aiuto ed il supporto offerti nel corso di tutto il mio soggiorno a Tolosa: ti auguro il meglio dalla vita.

A Pascal, Fred, Laila, Alex e Michela, cari amici e colleghi di Toulouse, grazie infinite per il vostro preziosissimo aiuto, per i vostri insegnamenti (anche della lingua francese), la vostra amicizia e disponibilità.

A tutti gli amici dell'I.N.R.A. di Toulouse, grazie per la vostra amicizia e per aver sopportato il mio terribile francese!

*Dulcis in fundo*, ciliegina sulla torta, grazie a Massy, il mio compagno di vita nonché prossimo futuro sposo, per l'appoggio, la dolcezza e l'amore dimostratomi, ma soprattutto per l'infinita pazienza: non esiste persona al mondo in grado di aspettare in silenzio, senza lamentele, e di sopportare le mie ire funeste (nei periodi difficili) così come hai fatto tu in tutti questi anni e per questo ti ammiro e ti ringrazio infinitamente.