



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI DI  
PADOVA**



**FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA**

**DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA, PATOLOGIA COMPARATA ED IGIENE VETERINARIA**

**CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA A CICLO UNICO IN MEDICINA VETERINARIA**

**TESI DI LAUREA**

**VALUTAZIONE IN CAMPO SULL'EFFICACIA DI ALCUNI  
CANDIDATI BIOMARCATORI DI TRATTAMENTO ILLECITO NEL  
VITELLONE DA CARNE**

**RELATORE: CH.MO PROF. MAURO DACASTO**

**CORRELATORI: DOTT.SSA ROSA MARIA LOPPARELLI**

**DOTT.SSA MERY GIANTIN**

**LAUREANDO: ALESSANDRO SADOCCO**

**ANNO ACCADEMICO 2010/2011**



# Indice

<i>Indice</i>	<i>iii</i>
<i>Ringraziamenti</i>	<i>v</i>
<i>Sommario</i>	<i>vii</i>
<b>1 Introduzione</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Promotori di crescita</b>	<b>2</b>
1.1.1 Ormoni sessuali	2
1.1.2 Tireostatici	4
1.1.3 $\beta$ -agonisti	5
1.1.4 Ormone della crescita	6
1.1.5 Corticosteroidi	6
<b>1.2 Legislazione europea e rapporti con i Paesi non UE</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Metodi ufficiali di controllo</b>	<b>10</b>
<b>1.4 Metodi innovativi di controllo: biomarcatori di effetto</b>	<b>13</b>
1.4.1 Sangue	14
1.4.2 Urine	16
1.4.3 Tessuti	16
1.4.4 Tecniche -omiche	18
1.4.5 Utilità della bioinformatica nell'approccio allo screening con le tecniche -omiche	20
<b>1.5 Validazione delle tecniche -omiche</b>	<b>21</b>
<b>2 Scopo della tesi</b>	<b>23</b>
<b>3 Materiali e metodi</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Animali dell'esperimento</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Estrazione RNA</b>	<b>27</b>
3.2.1 Controllo della qualità dell'RNA estratto	27
<b>3.3 Retrotrascrizione</b>	<b>32</b>
<b>3.4 Analisi qPCR</b>	<b>33</b>
3.4.1 Metodo di quantificazione dell'RNA – Sonde ad idrolisi	33
3.4.2 Progettazione dei saggi	35
3.4.3 Validazione dei saggi	39
3.4.4 Analisi dei campioni	42
<b>3.5 Elaborazione statistica</b>	<b>45</b>

<b>4</b>	<b><i>Risultati e discussione</i></b>	<b>49</b>
4.1	Estrazione RNA totale	49
4.2	Validazione dei saggi	55
4.3	Analisi statistica	65
<b>5</b>	<b><i>Valutazione economica</i></b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b><i>Conclusioni</i></b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b><i>Appendice</i></b>	<b>85</b>
	<b><i>Bibliografia</i></b>	<b>95</b>
	<b><i>Risorse informatiche</i></b>	<b>105</b>

## **Ringraziamenti**

*In questa sezione dedicata ai ringraziamenti voglio ringraziare innanzitutto il Prof. Mauro Dacasto che ha suscitato in me l'interesse per la ricerca e mi ha accolto all'interno del suo team facendomi apprezzare il metodo scientifico, anche grazie alla sua simpatia.*

*Un doveroso ringraziamento a Rosa, Mery, Vanessa, Marianna e Pietro: l'"-omic team" che mi ha guidato nella vita di laboratorio con immensa pazienza e serenità anche quando "pasticciavo".*

*Un ringraziamento particolare va alla mia famiglia, Iseo, Paola e Mauro per avermi indirizzato allo studio della Medicina Veterinaria e per avermi trasmesso la perseveranza nello studio e nel lavoro che mi ha permesso di arrivare a questa tappa importante.*

*Con questo lavoro di tesi si concludono i cinque anni di vita universitaria che hanno visto la costante presenza di Veronica, Daniele, Marta, Gregorio, Lucia, Giovanni, Elisa, Nicola: in questi anni mi avete aiutato, con i vostri consigli e la vostra amicizia, a rendere meno gravoso lo studio e a superare anche quei momenti di difficoltà e che da solo non avrei saputo gestire!*

*Come non ringraziare ancora Veronica, Giulia, Stefano, Francesco, Valentina, Martina, Alice, per aver alleggerito le giornate dei tirocini, nonché il Dott. Roberto, la Dott.ssa Anna, la Dott.ssa Lucia, il Dott. Fabio e Sabrina che accogliendomi presso la loro struttura per il periodo di tirocinio, mi hanno trasmesso la passione per la veterinaria.*

*E per finire un ringraziamento di cuore agli amici di sempre: Giovanni, Alessandro, Stefano, Mattia, Leonardo, Virginia e Stefania. Grazie per i bei momenti passati assieme e per i prossimi che passeremo! La vostra presenza è stata di fondamentale importanza!*



## Sommario

Nel presente lavoro di tesi viene valutata l'affidabilità dei profili di espressione genica misurati in fegato (CYP2B22, GSTA1, HSD11B1, CYP2E1, SULT1A1, RXRa, CYP3A) e testicolo (HSD3B, HSD17B3, CYP17, CYP3A, MR, GSTA1, HSD11B1, HSD11B2), come potenziali biomarcatori indiretti di trattamento illecito.

Lo studio di tali profili è stato applicato ad una popolazione di bovini sottoposti a regolare macellazione e ad un gruppo di animali di controllo, cui non era stato somministrato alcun promotore di crescita.

La classificazione dei soggetti in negativi, dubbi e sospetti, è stata effettuata con l'applicazione di tecniche biostatistiche quali *Hierarchical Clustering (HCL)* e *Principal Component Analysis (PCA)*.

**PAROLE CHIAVE:** bovini da carne, trattamenti illeciti, metodiche di screening, trascrittomiche, biomarcatori indiretti, monitoraggio, HCL, PCA



# 1 Introduzione

I promotori di crescita (*growth promoters, GP*) sono sostanze chimiche naturali o di sintesi che, somministrate agli animali di allevamento, ne aumentano il peso e possono modificare la composizione della carne prodotta (Courtheyn, et al., 2002; Sillence, 2004).

Nell'Unione Europea l'impiego dei GP è vietato (attualmente è in vigore la direttiva 96/22/CE, modificata dalla direttiva 2003/74/CE e recepita in Italia tramite il Decreto Legislativo n.158 del 16 marzo 2006, normative redatte sulla base dell'opinione dello *Scientific Committee on Veterinary Measure Relating to Public Health*); per contro, in taluni Paesi extracomunitari (come Australia e Stati Uniti) tale impiego è consentito, anzi incentivato, proprio poiché aiuta a migliorare l'indice di conversione alimentare (ICA) degli animali nonché il rapporto tra componente grassa/magra della carcassa(Sillence, 2004).

Un miglior ICA è visto di buon occhio dall'allevatore che, senza aumentare la quantità e la qualità del foraggio per il suo bestiame, riesce ad ottenere un quantitativo maggiore di carne, oltretutto rispondente alle caratteristiche attualmente richieste dal consumatore. Tutto questo si traduce in un maggiore profitto, a fronte di un piccolo investimento per l'acquisto del GP.

Un altro aspetto che viene sottolineato da chi è favorevole all'impiego dei GP è il minore impatto ambientale di un allevamento bovino in cui queste sostanze vengono impiegate: se è necessaria una minore quantità di alimento, si ridurranno le emissioni di anidride carbonica, metano ed azoto (frutto del normale processo digestivo dei ruminanti), così come le emissioni prodotte dalla coltivazione dei terreni per ottenere il foraggio necessario nonché la competizione alimentare che esercita il bestiame su alimenti che anche l'uomo assume (come ad esempio il mais)(Hunter, et al., 1993; Sillence, 2004).

Nel 1999, la Commissione Europea - Direzione generale per la protezione della salute dei consumatori (DG SANCO) è stata promotrice dello studio "*Assessment of potential risks to human health from hormone residues in bovine meat and meat products*", svolto dallo *Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health*, (DG SANCO, 1999), il cui scopo era valutare la reale pericolosità per l'uomo

derivante dell'assunzione indiretta di GP. Quanto emerso da questo studio sarà oggetto di trattazione nel paragrafo 1.1.

Da un sondaggio commissionato dall'*Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA)*, svolto nel 2010 su tutto il territorio europeo (Eurobarometro speciale 354), risulta che l'11% di cittadini europei ritiene il cibo una possibile causa di danni alla salute. Negli ultimi anni, tale dato è in continuo e costante aumento ed è altresì aumentata considerevolmente la percentuale di chi considera tale rischio "*molto probabile*". La preoccupazione più diffusa concerne l'eventuale presenza di residui di antibiotici e sostanze ad attività ormonale nella carne (30% della popolazione) nonché quella di pesticidi in frutta e verdura, di sostanze inquinanti nel pesce e di diossina nel maiale (TNS Opinion & Social - EFSA, 2010).

## **1.1 Promotori di crescita**

Qui di seguito verranno sommariamente descritti i principali GP utilizzati nei Paesi extracomunitari, specificando per ciascuno di essi i motivi di utilizzo, nonché i possibili effetti dannosi per la salute dell'uomo. Non vengono prese in considerazione le altre molecole (principalmente benzodiazepine e antinfiammatori non steroidei) solitamente impiegate prima o dopo il trasporto al macello per la riduzione dello stress.

### **1.1.1 Ormoni sessuali**

L'uso di ormoni sessuali in buiatria è consentito sotto stretto controllo del medico veterinario e nel rispetto dei tempi di sospensione; ad esempio, tali ormoni costituiscono il principio attivo di preparati farmacologici ad uso veterinario impiegati per la sincronizzazione degli estri. Ovviamente, viene a crearsi il presupposto di trattamento illecito quando codesti ormoni vengono impiegati per fini che esulano da una gestione zootecnica del ciclo estrale, o con posologie diverse da quelle previste.

Qui di seguito si riportano gli ormoni sessuali più comunemente impiegati a scopo illecito (Courtheyn, et al., 2002).

**17 $\beta$ -estradiolo** L'azione biologica principale di questo ormone, prodotto essenzialmente dal follicolo nelle vacche adulte, è quella di favorire l'anabolismo proteico attraverso l'attivazione di *pathways* metabolici diversi, favorendo conseguentemente la ritenzione di composti azotati (Bridges, et al., 2001). Gli estrogeni possono concorrere tanto alla fase di iniziazione di un processo neoplastico (in cui

avviene una modificazione delle caratteristiche di espressione genica delle cellule) che una promozione dello stesso, anche se è tuttora difficile stimare il rischio di insorgenza di una neoplasia a seguito di un'esposizione ad estrogeni (Regal, et al., 2011).

Ulteriori effetti collaterali possono verificarsi qualora piccole quantità di steroide vengano assunte da soggetti in fase di accrescimento: gli estrogeni sono fondamentali per un corretto sviluppo dell'apparato muscolo-scheletrico e riproduttivo tanto nelle femmine quanto nei maschi. Un'alterazione del naturale equilibrio endocrino può dare femminilizzazione nel maschio, danni alle articolazioni dovuti ad una ritardata chiusura delle metafisi, pubertà precoce nelle bambine e infertilità maschile (CONTAM Panel, 2007). Gli estrogeni sembrano importanti anche nello sviluppo del sistema immunitario e giocano un ruolo centrale nello sviluppo di alcune malattie immunomediate (DG SANCO, 1999).

**Testosterone** Ormone steroideo dotato di potente attività androgena, coinvolto nel mantenimento della funzionalità testicolare e nello sviluppo delle caratteristiche sessuali maschili secondarie. Il testosterone viene utilizzato a scopo illecito come anabolizzante, e spesso in associazione con estrogeni per potenziarne l'effetto (Becker, et al., 2011). Il corretto apporto di testosterone durante la pubertà è fondamentale per il corretto instaurarsi della spermatogenesi. Sulla prostata, il testosterone svolge un'azione trofica che può esitare nello sviluppo del carcinoma prostatico. Pertanto, il testosterone appartiene al gruppo dei cosiddetti "probabili cancerogeni" (IARC, 1987). Un continuo apporto di testosterone con la dieta provoca atrofia testicolare, con conseguente azoospermia (per blocco della secrezione di gonadotropine), incremento della massa ossea e muscolare (azione anabolizzante) e, in ragazze adolescenti, si possono osservare disfunzioni dell'apparato sessuale femminile (pseudoermafroditismo, mascolinizzazione e ovaie policistiche). Il testosterone non sembra svolgere attività immunomodulatrice (DG SANCO, 1999).

**Trembolone acetato** Analogo di sintesi del testosterone. Anch'esso ligando del recettore per gli androgeni (*androgen receptor, AR*). La sua eventuale azione cancerogena è tuttora dibattuta, poiché è stata confermata in modelli animali ma non ancora nell'uomo (IARC, 1987). Un suo metabolita, il 17 $\alpha$ -trembolone, può legarsi covalentemente ai tessuti, con conseguente possibile presenza di residui stabili. Si ritiene che il trembolone provochi atrofia testicolare, riduzione del peso di prostata e vescichette seminali e che induca un'alterazione della spermatogenesi. Nelle femmine

induce mascolinizzazione e alterazione del ciclo ovarico che possono essere tali da provocarne addirittura l'arresto (DG SANCO, 1999).

**Zeranolo** Composto ad attività estrogenica che derivante dallo *zearalenone*, una micotossina prodotta da un fungo del genere *Fusarium*. La somministrazione di zeranolo migliora l'ICA e l'incremento ponderale attraverso una riduzione dell'espressione delle gonadotropine endogene, dell'ormone luteinizzante e dell'ormone follicolo-stimolante. Da studi *in vitro* non sembra indurre genotossicità (DG SANCO, 1999).

**Melengestrol acetato (MGA)** Progestinico di sintesi utilizzato negli allevamenti da carne per la sua capacità di migliorare l'ICA e l'incremento ponderale. Viene altresì impiegato come inibitore delle manifestazioni estrali nelle manze. In virtù del trattamento, i follicoli non sono più in grado di ovulare, e la presenza di follicoli persistenti porta ad un innalzamento di 2-3 volte delle concentrazioni plasmatiche di estrogeni. Il melengestrol non sembra essere in grado di dare addotti al DNA (DG SANCO, 2002). Un ulteriore effetto negativo sulla salute umana è rappresentato dall'eventuale assunzione di una quantità di estrogeni pari al doppio o al triplo di quelli normalmente presenti nelle carni (DG SANCO, 1999).

### 1.1.2 Tireostatici

I tireostatici, attraverso un'inibizione della funzionalità della ghiandola tiroide e, conseguentemente, una riduzione della concentrazione di ormoni tiroidei, provocano un rallentamento del metabolismo basale, una riduzione della motilità intestinale e ritenzione idrica. L'aumento di peso che si ottiene è principalmente dovuto all'aumentata replezione intestinale e, in seconda istanza, alla ritenzione di acqua a livello intracellulare (Courtheyn, et al., 2002).

L'utilizzo illecito dei tireostatici non sembra suscitare particolare interesse: l'incremento di peso non è molto marcato e la carne proveniente da animali trattati non attira il consumatore poiché si presenta molto pallida (Courtheyn, et al., 2002); inoltre, l'allevatore può essere condannato sia per frode commerciale (viene venduta acqua al prezzo della carne, Art.515 del Codice Penale) che igienico-sanitaria (la carne contiene sostanze pericolose, Art. 440 del Codice Penale).

Molte sono le evidenze che suggeriscono come la presenza di tireostatici e loro metaboliti nelle carni possa comportare seri problemi di salute per il consumatore, particolarmente per la loro azione cancerogena e teratogena (Courtheyn, et al., 2002).

### 1.1.3 $\beta$ –agonisti

In medicina veterinaria, i  $\beta$ -agonisti vengono utilizzati come agenti broncodilatatori e tocolitici; tuttavia, se somministrati a dosi fino a dieci volte superiori rispetto a quelle terapeutiche si comportano da “agenti di ripartizione”, stimolando i recettori  $\beta$ -adrenergici (Courtheyn, et al., 2002). A livello muscolare, questi recettori stimolano la sintesi proteica e l’ipertrofia cellulare inibendo la proteolisi, mentre a livello del tessuto adiposo promuovono lipolisi. L’uso illecito di beta-agonisti permette all’allevatore di ridurre fino al 40 % la componente grassa della carcassa, aumentandone contestualmente la frazione proteica (Courtheyn, et al., 2002). In seguito all’inibizione degli enzimi proteolitici, i  $\beta$ -agonisti sono responsabili dell’aumento della resistenza al taglio della carne. Per questo motivo vengono illecitamente utilizzati solamente nella fase di finissaggio (in prossimità della macellazione), con evidenti problemi di natura sanitaria (Sillence, 2004). La somministrazione di  $\beta$ -agonisti può essere sospettata se, in sede di macellazione, un esame macroscopico pone in evidenza un appiattimento della cresta tracheale con un conseguente aumento di diametro dell’organo, nonché una riduzione della quantità di grasso sottocutaneo e perirenale nella carcassa (Biolatti, et al., 2003).

**Clenbuterolo** È il capostipite della famiglia dei  $\beta$ -agonisti. L’uso illegale di tale molecola nell’industria della produzione di carne ha prodotto molti casi di intossicazione, con sintomatologia caratterizzata da tremori, tachicardia, irritabilità e cefalea (Kuiper, et al., 1998). L’utilizzo illecito del clenbuterolo è stato apparentemente ridotto grazie alle misure di controllo adottate, ma nel mercato illegale sono reperibili composti ad azione simile che sfuggono ai controlli ufficiali e che possono pertanto rappresentare un problema per il consumatore (Courtheyn, et al., 2002).

**Ractopamina**  $\beta$ -agonista che viene solitamente somministrato con la dieta. Negli USA è autorizzata per l’uso nel suino, mentre è proibito l’impiego a livello comunitario. Di difficile identificazione (richiede un metodo specifico), provoca nel bovino una riduzione della marezza delle carni e, come il clenbuterolo, modula la lipolisi (Woerner, et al., 2011).

**Zilpaterolo**  $\beta$ -agonista regolarmente registrato come GP in Messico e Sud Africa. Migliora le *performance* di crescita e riduce la resistenza al taglio. Sfugge alle tecniche di screening basate su test immunologici (Woerner, et al., 2011).

#### **1.1.4 Ormone della crescita**

L'ormone della crescita (*Growth Hormone – GH*) è entrato a far parte delle possibili molecole utilizzabili a scopo illecito nella filiera del bovino da carne solamente nel 1995. Il principale motivo alla base dello scarso utilizzo era la scarsa disponibilità dell'ormone ma ora, consecutivamente allo sviluppo dell'ingegneria genetica, tale fatto non ha più molto valore (Woerner, et al., 2011).

Se utilizzato come GP, l'effetto anabolizzante è risultato essere meno evidente rispetto ad altre sostanze ormonali; inoltre, si riscontra una marcata riduzione del tessuto adiposo, con conseguente riduzione di peso della carcassa. Queste evidenze hanno fatto sì che nessun allevatore ne faccia ormai uso (Sillence, 2004).

#### **1.1.5 Corticosteroidi**

I corticosteroidi costituiscono un gruppo di farmaci comunemente utilizzati in terapia veterinaria. All'interno del gruppo dei corticosteroidi si distinguono due sottogruppi, i mineralcorticoidi ed i glucocorticoidi.

I mineralcorticoidi regolano il metabolismo idro-elettrolitico e, pertanto, non saranno oggetto di trattazione in codesta tesi.

I glucocorticoidi concorrono alla regolazione della gluconeogenesi, del metabolismo proteico e possono provocare immunodepressione. Vengono utilizzati come GP, a basse dosi in quanto:

- migliorano l'ICA;
- provocano ritenzione idrica nei tessuti;
- aumentano il contenuto di grasso della carcassa senza provocare peraltro marezza.

Spesso i glucocorticoidi si utilizzano in associazione con altre molecole più sopra descritte, in modo da massimizzare gli effetti e ridurre le dosi da somministrare.

Esempi di glucocorticoidi naturali sono **cortisolo** e **cortisone**, mentre **desametasone** e **prednisolone** rappresentano due dei glucocorticoidi di sintesi maggiormente utilizzati a scopo illecito e pertanto presenti sul mercato nero dei GP.

## **1.2 Legislazione europea e rapporti con i Paesi non UE**

Il primo divieto comunitario di utilizzo dei GP nell'allevamento zootecnico (direttiva 81/602/CEE) fu una decisione di natura squisitamente precauzionale, dettata dalla necessità di garantire una maggiore sicurezza dei prodotti di origine animale a seguito degli scandali avvenuti negli anni precedenti; in particolare, l'utilizzo a scopo anabolizzante di dietilstilbestrolo (un analogo sintetico del  $17\beta$ -estradiolo), che fu provato essere un potente cancerogeno (Bridges, et al., 2001).

La decisione presa dall'UE è stata più volte contestata dagli USA e dai Paesi in cui i trattamenti ormonali sono permessi, in quanto è vista come una misura restrittiva alla libera circolazione delle merci (Condon, 1998). Pur tuttavia, il dibattito circa la sicurezza dei GP utilizzati in USA è ancora aperto: un ottimo esempio è rappresentato dalla discussione sull'influenza che i residui di GP possono avere nella spermatogenesi dei figli di madri che, durante la gravidanza, hanno consumato carne di animali trattati con questi farmaci. Nel primo studio a riguardo (Swan, et al., 2007) è stato dimostrato come la scarsa qualità del seme degli americani possa essere attribuibile al consumo di carne di animali trattati con GP da parte delle madri durante la gravidanza. Successivamente, un secondo studio (Amann, et al., 2007) ha altresì dimostrato come il lavoro di Swann et al. del 2007 non fosse esente da errori scientifici e che fosse pertanto necessario considerare ulteriori aspetti riguardanti lo stile di vita delle madri e dei figli durante la fase evolutiva.

All'interno dell'area UE, nonostante il divieto di uso e commercializzazione di GP, è presente un mercato parallelo a quello ufficiale che rende disponibili tali sostanze. Un esempio esplicativo della presenza di questo traffico di sostanze vietate ci viene dall'Operazione "Somatos", condotta dal Nucleo Antisofisticazioni e Sanità (NAS) dell'Arma dei Carabinieri di Napoli, che dopo 3 anni (si è conclusa nel mese di Aprile 2009) ha portato al sequestro di migliaia di confezioni di medicinali illegali (Biasotto, et al., 2010). Inoltre, vengono continuamente riscontrati casi sospetti di trattamento grazie all'utilizzo delle nuove tecniche di indagine (Cocumelli, et al., 2008), alcune delle quali verranno trattate più estensivamente in seguito

**Tabella 1-1:** Normative promulgate dalla Comunità Europea per contrastare l'impiego illecito di GP nella produzione di alimenti di origine animale. Le norme sono riportate in ordine cronologico (da Noppe et al., 2008, mod.)

<i>Norma comunitaria</i>	<i>Effetto</i>
Direttiva 81/602/CEE	Viene vietato l'utilizzo di sostanze ad azione ormonale (17 $\beta$ -estradiolo, testosterone, progesterone, zeranolo, trembolone acetato e melengestrolo acetato) come GP.
Direttiva 88/146/CEE	Vieta la somministrazione, come GP, tanto di ormoni sintetici (trembolone acetato e zeranolo) che naturali (17 $\beta$ -estradiolo, progesterone e testosterone)
Direttiva 88/299/CEE	Disciplina il commercio di carne e prodotti a base di carne derivati da animali trattati a scopi terapeutici o per la sincronizzazione del ciclo estrale, con le sostanze riportate nella direttiva 88/146/CEE
Regolamento 2377/90/CE	Disciplina l'uso dei farmaci ad uso veterinario e stabilisce che debbono essere stabiliti i limiti massimi residuali (MRL) negli alimenti di origine animale per ogni sostanza utilizzata.
Direttiva 96/22/CE	Vieta l'utilizzo di sostanze ad azione tireostatica, estrogenica, androgenica e gestagena in allevamento ed in acquacoltura. Vieta l'importazione di carne proveniente da animali trattati allevati in Paesi terzi
Direttiva 96/23/CE	Disciplina gli interventi di controllo e monitoraggio volti a scovare la presenza di residui di farmaci, GP e contaminanti negli animali e nei prodotti da essi derivati.
Decisione 2002/657/CE	Regolamenta lo sviluppo delle tecniche analitiche e l'interpretazione dei risultati ottenuti, individuando criteri minimi di performance analitica e fornendo le istruzioni per la validazione delle relative metodiche.
Direttiva 2003/74/CE	Restringe i campi di applicazione del 17 $\beta$ -estradiolo, che in ogni caso deve essere somministrato sotto stretto controllo del medico veterinario

A livello comunitario ogni Stato membro, secondo la direttiva 96/23/CE, deve attuare un piano di monitoraggio che tenga conto dei risultati ottenuti nel corso dell'anno precedente (approccio definito come “approccio mirato”, dall'inglese *targeted approach*). Tali piani di monitoraggio (in Italia il Piano Nazionale Residui) non permettono di stabilire con certezza il rischio per il consumatore, ma coadiuvano gli Enti preposti al controllo. Nella Tabella 1–1 vengono cronologicamente riportate tutte le direttive, in materia di GP, promulgate dalla Comunità Europea

Gli esiti di analisi condotte presso le strutture autorizzate, a seguito di campionamenti mirati (European Union, 2010) hanno confermato che le molecole principalmente utilizzate nel nostro Paese come PC sono i **corticosteroidi**, ed in particolare (in ordine decrescente) il desametasone, il prednisolone ed il prednisone.

Il comitato scientifico (DG SANCO, 2002) riunitosi per valutare i potenziali effetti avversi dei residui di trattamenti con promotori di crescita nella carne bovina e nei prodotti a base di carne ha concluso che:

*“L’eccessiva assunzione di residui di promotori di crescita e dei loro metaboliti è un rischio che effettivamente corre il consumatore;*

*Con l’assunzione di tali sostanze si può incorrere in effetti avversi sullo sviluppo, sul sistema endocrino, immunitario, neurologico in particolare in bambini prepuberi;*

*Non può essere stabilita un’assunzione giornaliera ammissibile (ADI), per le sostanze valutate che vengono somministrate ai bovini a scopo di promotore di crescita.”*

L’attuale direttiva 2003/74/CE divide le molecole che possono risultare presenti nelle carni, in due categorie come presentato in Tabella 1–2.

**Tabella 1-2:** Allegato I al Decreto Legislativo 158/2006 "Attuazione della direttiva 2003/74/CE, concernente il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze beta-agoniste nelle produzioni animali". In Categoria A sono riportate tutte quelle sostanze ad effetto anabolizzante e quelle sostanze non autorizzate dalla legislazione europea o autorizzate ma somministrate in modo illegale. In Categoria B sono invece elencate quelle sostanze per cui sono stati determinati i limiti massimi residuali (LMR) o i limiti massimi di antiparassitari e di agenti contaminanti per l’ambiente, comprese le sostanze non registrate utilizzabili a fini veterinari.

<b><i>Categoria A – Sostanze ad effetto anabolizzante e sostanze non autorizzate</i></b>	<b><i>Categoria B – Medicinali veterinari e agenti contaminanti</i></b>
Stilbeni e derivati	Sostanze antibatteriche, compresi sulfamidici, chinoloni
Agenti antitiroidei	Altri prodotti medicinali veterinari: - Antelmintici - Coccidiostatici compresi nitroimidazoli - Carbammati e piretroidi - Tranquillanti - Antinfiammatori non steroidei - Altre sostanze ad azione farmacologica
Steroidi	
Lattoni dell’acido resorcilico (compreso zeranolo)	
β-agonisti	
Sostanze incluse nell’allegato IV del Reg. CEE n. 2377/90	Altre sostanze e agenti contaminanti l’ambiente: - Composti organo clorurati, compresi i PCB - Composti organo fosfati - Elementi chimici - Micotossine - Coloranti - Altri

Stante il fatto che i relativi controlli devono essere effettuati mantenendo al massimo l’effetto sorpresa, come precisato dalla normativa, gli obiettivi del campionamento variano in base alla categoria di appartenenza degli xenobiotici: per le sostanze appartenenti alla Categoria A si parla di indagini volte ad individuare una somministrazione illecita (di sostanze vietate) o abusiva di sostanze autorizzate; per quelle appartenenti alla Categoria B si tratta di indagini volte a dimostrare il rispetto dei

limiti massimi residuali stabiliti nel regolamento CEE n. 2377/90 e che non siano presenti contaminanti per l'ambiente in quantità eccessive.

### **1.3 Metodi ufficiali di controllo**

La direttiva 96/23/CE al capo IV "Controlli ufficiali" indica le modalità di attuazione del piano di sorveglianza e le azioni che l'autorità sanitaria deve intraprendere in seguito alla segnalazione di un sospetto di trattamento illecito.

Il piano di sorveglianza si basa su di una prima fase di screening ed una seconda da attuarsi solo sui campioni risultati "non conformi" alla direttiva comunitaria.

Nella decisione 657/2002/CE della Commissione del 12 agosto 2002 vengono definite le caratteristiche che devono avere le tecniche di screening per poter essere utilizzate: a) devono aver superato un accurato e documentabile processo di validazione; b) il tasso di falsi conformi (cioè di animali trattati con GP ma che sfuggono allo screening risultando conformi a quanto stabilito dalla legge) deve essere inferiore al 5%. In altre parole, le tecniche di screening devono possedere sensibilità e specificità elevate per poter ridurre il numero dei campioni che dovranno subire un'ulteriore analisi ma, allo stesso tempo, non devono escludere alcun soggetto illegalmente trattato.

Le metodiche di screening autorizzate a livello europeo sono il dosaggio radioimmunologico (Radio Immuno Assay, RIA) e l'analisi immunologica (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA) (Ministero della Salute, 2011). Entrambe queste metodiche sfruttano la reazione antigene – anticorpo per individuare e quantificare la presenza di determinate molecole. Il RIA, che utilizza molecole marcate con radioisotopi, quantifica le molecole sulla base della radioattività rilevata, poichè è direttamente proporzionale alla quantità di sostanza presente nel campione analizzato. Seppur dotata di elevata sensibilità e specificità, codesta metodica presenta alcuni svantaggi, essenzialmente riconducibili al costo delle apparecchiature e dei reagenti radiomarcati. Con la tecnica ELISA, la quantità di sostanza presente nel campione viene misurata colorimetricamente: infatti, ad ogni anticorpo viene legato un enzima (la perossidasi) che, in presenza di un particolare substrato, produce una molecola colorata. Ovviamente, maggiore è l'intensità della colorazione ottenuta, maggiore è la presenza della molecola riconosciuta dall'anticorpo.

L'articolo 11 della direttiva 96/23/CE precisa che i controlli devono “*rivelare la presenza di sostanze o prodotti vietati che potrebbero essere somministrati ad animali ai fini di ingrasso ovvero il trattamento illecito*”. Da questo paragrafo si evince che, per sanzionare l'allevatore, è necessaria identificazione pressoché certa della/delle molecola/e impiegate in modo illecito. Infatti (articolo 13), qualora si sospetti che un soggetto sia stato trattato, il controllo deve estendersi a tutti gli animali dello stesso allevamento, e a questi verrà effettuato un prelievo ufficiale; inoltre, devono essere eseguiti controlli in allevamento al fine di individuare la fonte della sostanza illecita (farmaci, alimenti e acqua di abbeverata).

Nella tabella 1 dell'allegato alla Decisione 2002/657/CE, che integra la Direttiva 96/23/CE riguardo alle *performance* delle metodiche analitiche e all'interpretazione dei risultati, sono riportate le tecniche di conferma ufficiali per svelare la presenza di residui delle sostanze indicate nell'allegato 1 della Direttiva 96/23/CE o eventuali contaminazioni. In particolare, nel comma successivo viene riportato come i metodi di conferma debbano essere in grado di fornire informazioni circa la struttura chimica dell'analita. Quindi, risulta fondamentale applicare in sequenza due tecniche di analisi per scongiurare l'ottenimento di risultati dubbi, dato che tale risultato deve essere in grado di sostenere un confronto giudiziario (De Brabander, et al., 2007).

Nel Piano Nazionale Residui (Ministero della Salute, 2011) si riporta che le tecniche di conferma utilizzabili sono la gas-cromatografia o la cromatografia liquida associate alla spettrometria di massa. La cromatografia permette la separazione delle molecole presenti nei campioni in base alle loro caratteristiche fisiche, mentre la spettrometria di massa permette l'identificazione della struttura molecolare e quindi l'individuazione di eventuali tracce lasciate dal trattamento.

Nel caso venga confermato il trattamento illecito, tutti gli animali, in conformità all'articolo 23 della direttiva 96/23/CE, devono essere abbattuti e le carcasse distrutte con le modalità proprie della categoria 1 individuata dal regolamento CE n.1774 del 2002.

De Brabander, in una sua recente pubblicazione (De Brabander, et al., 2007), ha discusso l'evoluzione delle tecniche analitiche dagli inizi del 1970 sino ad oggi. In questo arco temporale i limiti analitici (*Limit of Detection, LOD*) si sono ridotti di molto. All'epoca della direttiva 81/602/CEE la negatività poteva non essere indicativa

di una totale assenza di trattamento illecito qualora fossero presenti tracce in quantità inferiori al LOD, ma era l'unica prova che poteva essere utilizzata. Attualmente, si riescono ad identificare molecole in quantità ridotte tali da generare delle cosiddette “zone grigie” in cui alcune sostanze possono essere presenti fisiologicamente nell'organismo degli animali, essere assunte con i foraggi o provenire dal metabolismo batterico; pertanto, non essere indicatrici di trattamento illecito.

Conseguentemente all'odierna maggiore sensibilità delle analisi, ha assunto una più grande rilevanza la preparazione del campione che, se ottimale, è in grado di aumentare indirettamente la sensibilità dello strumento (De Brabander, et al., 2007). Pur tuttavia, occorre qui far presente che, sebbene i principi generali delle tecniche analitiche risultino gli stessi per tutte le molecole, ad ogni molecola corrisponde un particolare procedimento di preparazione del campione ed una peculiare combinazione di reagenti: pertanto, per effettuare un'analisi completa di un campione si potrebbe arrivare a dover addirittura effettuare tante analisi quante sono le molecole conosciute, a meno che non si sappia già quali siano i potenziali GP (residui) presenti e, quindi, quali molecole debbano essere ricercate.

Da quanto qui sopra riportato, risulta abbastanza evidente che le tecniche analitiche ufficiali possano non costituire il miglior strumento per individuare se gli animali sono stati trattati con sostanze illecite o meno, anche se sono le uniche metodiche che permettono l'identificazione precisa del GP utilizzato. Tra le problematiche riscontrate nell'ambito della ricerca di GP si possono annoverare le seguenti:

- l'utilizzo di cocktail di GP/farmaci, in cui ogni singolo composto viene utilizzato a basso dosaggio, ma il cui effetto viene magnificato dal sinergismo d'azione;
- le metodiche analitiche ufficiali non sono in grado di identificare le molecole di più recente introduzione nel cosiddetto “mercato nero” (Riedmaier, et al., 2009);
- alcuni trattamenti risultano rintracciabili solo per un brevissimo lasso di tempo; ad esempio, se vengono somministrati all'inizio del weekend, le eventuali tracce possono essere completamente scomparse il lunedì successivo;
- alcune molecole vengono intensivamente metabolizzate dall'organismo o dalla flora microbica, producendo una serie di metaboliti non tutti noti o per i quali non esistono tecniche in grado di quantificarli;
- la difficile distinzione tra una risposta fisiologica e quella che non lo è poiché dipendente dalla somministrazione di GP (Courtheyn, et al., 2002)

## **1.4 Metodi innovativi di controllo: biomarcatori di effetto**

Stante la difficoltà nell'attuare un piano di controllo utile a contrastare efficacemente l'impiego di GP nella filiera del bovino da carne e la crescente richiesta dei consumatori di maggiore sicurezza e qualità dei prodotti alimentari, la comunità scientifica ha cercato di affrontare il problema dei trattamenti illeciti da un altro punto di vista: stimare gli effetti "biologici" provocati dalla somministrazione di GP. Tali effetti possono attualmente essere misurati grazie all'individuazione di *biomarcatori*.

Per *biomarcatore* intendiamo qualsiasi misurazione, eseguibile tanto *in vivo* che *ex vivo*, in grado di stimare una deviazione dai parametri fisiologici; per *biomarcatore di esposizione* si intendono l'individuazione e la stima della quantità di uno xenobiotico, un suo metabolita o il prodotto dell'interazione di questi con altre molecole *target* dell'organismo; infine, ogniqualvolta si parla di *biomarcatore di effetto* si intende la stima di quelle alterazioni biochimiche o fisiologiche che possono conseguire all'assunzione di particolari sostanze (Nebbia, et al., 2010). Genericamente, nelle tecniche di analisi cosiddette indirette vengono utilizzati i biomarcatori di effetto, mentre in quelle dirette quelli di esposizione (Nebbia, et al., 2010).

L'uso di metodi indiretti comporta alcuni vantaggi/svantaggi (V/SV), che vengono di seguito sommariamente descritti.

La risposta che si ottiene è solamente indicativa di un'alterazione rispetto alla media della popolazione di riferimento a cui il soggetto indagato si reputa appartenere (Nebbia, et al., 2010). Assumendo che la scelta della popolazione di riferimento sia appropriata, le variazioni rispetto alla media potrebbero essere imputabili a diversi fattori oltre che al trattamento illecito, ad esempio la gestione degli alimenti per il bestiame, la presenza di inquinanti ambientali e di micotossine nei cereali (Brambilla, et al., 2005; Reiter, et al., 2007). La mancanza di specificità non rappresenta un aspetto negativo, poiché quest'analisi individuerrebbe non solo gli animali cui sono stati somministrati dolosamente sostanze vietate, ma anche quegli animali che sono allevati in situazioni non salubri tali da essere potenzialmente in grado di trasferire i contaminanti, eventualmente presenti nei foraggi, nei prodotti edibili (V/SV).

La popolazione bovina dimostra di possedere un'enorme variabilità fisiologica, legata in parte a sesso ed età, condizioni di allevamento ed alimentazione; queste tecniche indirette necessitano pertanto di una solida popolazione di riferimento, su cui

determinare i valori basali dei biomarcatori eventualmente individuati (Bergkvist, et al., 2010). Tale popolazione dovrebbe essere tanto ampia da consentire di esplorare tutta la variabilità fisiologica esprimibile dagli animali allevati, con la necessità di giungere anche a considerare una popolazione di riferimento per ogni singola razza allevata, diversificata anche in base al sesso e all'età. Si può pertanto supporre un sistema che consenta una continua implementazione della popolazione di riferimento, allo scopo di aumentare l'attendibilità dei risultati anche se ciò presuppone la conduzione di allevamenti in condizioni strettamente controllate e destinate precipuamente a questa finalità (SV).

I metodi indiretti permettono di valutare a costi relativamente contenuti un ingente numero di animali (Mooney, et al., 2009; Nebbia, et al., 2010; Girolami, et al., 2010) e consentono indirettamente di ridurre il numero di indagini svolte utilizzando i metodi analitici ufficiali (V).

Quello che segue è un elenco delle tecniche recentemente impiegate per la misurazione di biomarcatori di effetto, raggruppate a seconda della matrice utilizzata. Per ogni tecnica verrà fornita una breve spiegazione delle basi per cui l'analisi è stata proposta e una valutazione circa l'applicabilità in fase di screening.

#### **1.4.1 Sangue**

***Stress ossidativo*** L'insorgenza di una condizione di stress ossidativo può essere determinata stimando la presenza di specie reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species*, ROS) nonché la riduzione della capacità antiossidante del siero. È stato dimostrato che i GP possono determinare stress ossidativo attraverso la sintesi di ione superossido (Nebbia, et al., 2010), ma poiché la suddetta condizione può anche conseguire a variazioni fisio-patologiche individuali, si ritiene che questi test possano essere inseriti all'interno di una più ampia batteria di saggi (Nebbia, et al., 2010).

***Formula leucocitaria*** È risaputo che i corticosteroidi possono alterare la formula leucocitaria in quanto si tratta di immunosoppressori che agiscono sequestrando all'interno del circolo ematico i neutrofili. Due studi hanno dimostrato che trattamenti illeciti con corticosteroidi causano neutrofilia e aumento del rapporto neutrofili/linfociti (Marin, et al., 2008; Lopparelli, et al., 2011). In seguito a tali studi, si può dire che questi parametri potranno essere impiegati nella lotta contro la somministrazione di corticosteroidi come GP (Lopparelli, et al., 2011).

***Modulazione dei geni di neutrofili e linfociti*** Con le stesse motivazioni per cui si sono studiate le alterazioni della formula leucocitaria, si è intrapreso lo studio dell'espressione di alcuni geni che si presumeva potessero essere modulati dalla somministrazione di cortisonici (Lopparelli, et al., 2011). Da questo studio si è visto che le risposte che si possono ottenere variano in base alla popolazione cellulare maggiormente presente e al lasso di tempo che intercorre tra la somministrazione dei corticosteroidi e il prelievo ematico. La modulazione dell'espressione genica in neutrofili e linfociti (i geni studiati nei neutrofili vengono indotti, mentre nei leucociti rispondono tre geni su sei) potrà essere applicata come tecnica di screening una volta ampliato il pannello di geni analizzati (Lopparelli, et al., 2011).

***Modulazione dei recettori linfocitari*** In un esperimento controllato è stata studiata la modulazione dei recettori linfocitari. Gli animali oggetto di questo studio sono stati trattati estrogeni, corticosteroidi e  $\beta$ -agonisti e confrontati con un gruppo di animali non trattati. Da questo esperimento si è visto come il trattamento con estrogeni non vada ad influire in maniera significativa sulla popolazione di recettori  $\beta$ -adrenergici e come gli stessi subiscano una riduzione significativa in seguito all'esposizione a  $\beta$ -agonisti. I corticosteroidi sembrano invece ridurre gli effetti dei  $\beta$ -agonisti su codesti recettori, mentre sono gli unici che provocano una riduzione significativa del numero di recettori per i glucocorticoidi. Lo studio dei recettori linfocitari potrebbe essere incluso in una più ampia batteria di test per individuare i trattamenti illeciti effettuati con  $\beta$ -agonisti e glucocorticoidi (Odore, et al., 2006).

***Cortisolo ematico*** Il trattamento con corticosteroidi provoca una riduzione della funzionalità della ghiandola surrenale in seguito all'inibizione dell'asse ipotalamo ipofisario e quindi della produzione dell'ormone adrenocorticotropo. In seguito a somministrazione di corticosteroidi si ha una concentrazione di cortisolo ematico inferiore rispetto ai livelli fisiologici. Questo indicatore permane alterato a lungo permettendo l'identificazione del trattamento illecito anche se la somministrazione viene interrotta per un periodo prima della macellazione (Marin, et al., 2008). La quantificazione di questo ormone viene considerata un valido biomarcatore per identificare animali allevati contro la norma comunitaria (Vascellari, et al., 2008)

### 1.4.2 Urine

Un pre-requisito richiesto alle tecniche di screening è la facilità nel prelievo del campione; l'urina soddisfa in pieno tale esigenza, e può essere prelevata tanto in allevamento quanto in sede di macellazione.

L'urina è la matrice principale su cui viene valutata la presenza di GP (Ministero della Salute, 2008), anche se in taluni casi risulta essere inefficace; ad esempio, il trattamento illecito con prednisolone è di difficile individuazione in quanto le concentrazioni urinarie di questo farmaco sono estremamente basse durante il trattamento e scompaiono al momento della sospensione (Cannizzo, et al., 2011)..

**Rapporto 6 $\beta$ -idrossicortisolo/cortisolo** Il 6 $\beta$ -idrossicortisolo è un metabolita del cortisolo endogeno prodotto dal CYP3A, un enzima che viene tipicamente indotto in uomo e ratto in seguito alla somministrazione di corticosteroidi (anche se nel bovino ciò è solamente supposto e non ancora dimostrato) (Capolongo, et al., 2007). Un trattamento illecito a base di desametasone comporta una marcata riduzione dei livelli di cortisolo (Marin, et al., 2008), per cui il rapporto 6 $\beta$ -idrossicortisolo/cortisolo presenta dei valori dalle due alle cinque volte superiori rispetto a quanto ottenuto in animali di controllo (Capolongo, et al., 2007). L'esito di tale esperimento è stato confermato da un ulteriore studio, anche se occorrerebbe valutare in maniera più approfondita l'influenza che potrebbero avere eventuali contaminazioni batteriche sulla concentrazione delle molecole cercate (Ferranti, et al., 2011).

### 1.4.3 Tessuti

È noto come molti GP svolgano la propria azione attraverso l'interazione con una popolazione di recettori, la cui espressione costitutiva può variare a seconda del tessuto (Sauerwein, et al., 1989; Re, et al., 1995; Reiter, et al., 2007; De Maria, et al., 2009).

**Istologia** Nel Piano Nazionale Residui del 2008 (Ministero della Salute, 2008) l'esame istologico è stato ufficialmente introdotto tra i metodi di screening. Con l'esame istologico i campioni vengono distinti in due classi principali, "non trattati" e "sospetti trattati". Inoltre, per quest'ultima categoria viene anche indicato il GP di cui si sospetta l'utilizzo.

In generale, con l'esame istologico vengono poste in evidenza quelle alterazioni morfologiche che vengono provocate dai GP su precisi tessuti bersaglio (Biolatti, et al.,

2003). Nella Tabella 1–3 vengono riportate le alterazioni morfologiche più comunemente riscontrate a seguito dell’uso di GP.

**Tabella 1-3:** Alterazioni morfologiche più comunemente riscontrate con esame istologico ed in tessuti bersaglio a seguito dell’utilizzo di GP (Biolatti, et al., 2003, mod.).

Promotore di crescita	Alterazioni morfologiche
<b>Estrogeni</b>	<i>Maschio:</i> atrofia testicolare; iperplasia/metaplasia e fibrosi in prostata e ghiandole bulbo-uretrali; differenziazione della mammella
	<i>Femmine:</i> metaplasia della cervice e iperplasia/metaplasia e fibrosi della ghiandola vestibolare maggiore; ovaie cistiche o atrofiche; mucometra e differenziazione precoce della mammella in soggetti impuberi
<b>Androgeni</b>	<i>Maschio:</i> ipersecrezione, formazione di cisti e fibrosi alla prostata e alle ghiandole bulbo uretrali; atrofia testicolare
	<i>Femmina:</i> aumento di dimensioni del clitoride e separazione del prepuzio; ipersecrezione e formazione di cisti e fibrosi a livello della ghiandola vestibolare
<b>Tireostatici</b>	Iperplasia/atrofia della tiroide
<b>Corticosteroidi</b>	Atrofia e deplezione linfocitaria del timo; involuzione adiposa e fibrosi; ipertrofia della corticale del surrene
<b>β-agonisti</b>	Per questa categoria le alterazioni sono evidenti a livello macroscopico: rilassamento muscolatura tracheale e riduzione del grasso sottocutaneo e perirenale
<b>Combinazioni (cocktails)</b>	Combinazioni di effetti e attenuazione delle manifestazioni

Anche l’esame istologico presenta alcuni svantaggi:

- il campione deve essere immediatamente fissato in formalina onde evitare quei processi degenerativi che potrebbero rendere difficoltosa la lettura del preparato istologico;
- la lettura del preparato istologico non è automatizzabile e dipende molto dalle competenze del patologo: per questo motivo vengono periodicamente istituiti dei corsi di aggiornamento, nonché dei controlli di qualità del laboratorio (confronti con i centri di referenza, *ring test*);
- sono necessari degli standard istologici di riferimento, che permettano di distinguere ciò che è normale variabilità individuale e ciò che invece è frutto di illecito (Biolatti, et al., 2003), che tengano altresì conto delle diverse strategie nell’uso dei GP (come l’impiego di nuove molecole che provocano alterazioni morfologiche di minor rilevanza rispetto ai capostipiti delle singole classi di GP) (Castagnaro, et al., 2006).

Sono stati recentemente pubblicati alcuni lavori metodologici in cui l’efficacia dell’esame istologico è stata confrontata con altri metodi indiretti (Vascellari, et al., 2008; Cannizzo, et al., 2011).

#### 1.4.4 Tecniche –omiche

Vengono definite –omiche quelle metodiche che consistono nella valutazione globale ed istantanea, ottenibile attraverso l'utilizzo di tecniche complesse (tecniche *high-throughput*) e software bioinformatici, di tutto il pattern di geni, proteine e metaboliti presenti nell'individuo (trascrittomica, proteomica, metabolomica) (Riedmaier, et al., 2009).

**TRASCRIPTOMICA** Si ritiene che gran parte dei GP sia in grado di alterare in qualche misura l'espressione del genoma bovino (Girolami, et al., 2010). Le principali metodiche attualmente utilizzate per l'analisi del trascrittoma vengono qui di seguito sommariamente descritte. Vengono qui di seguito sommariamente presentate, includendo pregi e difetti, le principali metodiche attualmente utilizzate per l'analisi del trascrittoma.

**Microarray** Un microarray è costituito da un supporto rigido su cui vengono “stampate” delle microscopiche sonde di DNA che vanno a rilevare la presenza, quindi l'espressione, di particolari sequenze genetiche. Ogni microarray contiene moltissime di queste sonde e per questo motivo con un'unica analisi è possibile studiare l'espressione di un vasto numero di geni. Tale tecnica è stata recentemente impiegata per l'analisi di campioni di muscolo scheletrico ottenuto da animali trattati con desametasone o una combinazione di desametasone ed estradiolo. Questo lavoro ha dimostrato che la somministrazione di desametasone come unico GP può essere identificata con una certa sicurezza analizzando anche solo quattro geni candidati, mentre è necessaria l'analisi di più trascritti per discriminare gli animali trattati con la combinazione di desametasone ed estradiolo (Carraro, et al., 2009).

**Quantitative Real Time RT-PCR (qPCR)** La *qPCR* è considerata l'evoluzione della RT-PCR classica “*end point*”, da cui si distingue per il fatto che la quantificazione degli ampliconi non avviene una sola volta al termine di tutto il processo di amplificazione, ma ad ogni passaggio. Con questa tecnica è possibile identificare anche lievi alterazioni nei profili di espressione genica (Riedmaier, et al., 2009). Nel 2006 Toffolatti e collaboratori utilizzarono codesta tecnica per individuare dei biomarcatori di effetto, a partire da tessuto prostatico, indicativi dell'uso illecito di ormoni sessuali. In questo studio venne ottenuta un'accuratezza del 93% nel distinguere tra campioni conformi e non conformi alla legislazione europea. (Toffolatti, et al., 2006). Inoltre,

sono stati recentemente pubblicati lavori in cui la qPCR è stata utilizzata per individuare alterazioni trascrizionali a partire da una matrice “surrogato” per eccellenza quale il sangue (Riedmaier, et al., 2009; Lopparelli, et al., 2011). Tale tecnica è stata anche utilizzata con successo nel fegato: undici geni su un totale di diciotto hanno palesato perturbazioni significative del profilo di espressione in vitelloni trattati con protocolli illeciti distinti (Giantin, et al., 2010). Il testicolo è l’organo preposto alla steroidogenesi, e modulazioni delle quantità di mRNA di trascritti coinvolti in tale processo biochimico sono state recentemente riscontrate in vitelloni trattati con combinazioni diverse di GP (Lopparelli, et al., 2010; Lopparelli, et al., 2011).

**PROTEOMICA** Il primo lavoro di proteomica applicato al fegato è stato eseguito su vitelli a carne bianca trattati con 17 $\beta$ -estradiolo, clenbuterolo e desametasone. Sono stati ottenuti risultati soddisfacenti seppure da validare (Gardini, et al., 2006). Infatti, i risultati ottenuti sono poi stati confermati in un successivo lavoro di validazione, condotto su un numero ristretto di campioni prelevati al macello su base casuale (Nebbia, et al., 2008). Un altro lavoro, condotto sul muscolo scheletrico, ha dimostrato la validità della proteomica nell’identificare correttamente animali trattati con desametasone o desametasone e  $\beta$ -agonisti; l’approccio risulta più problematico nel caso di trattamento con desametasone ed estrogeni (Stella, et al., 2011).

Per l’identificazione di potenziali biomarcatori nel campo della proteomica si ricorre all’utilizzo sequenziale della *elettroforesi bidimensionale* e della *spettrometria di massa*, anche se la prima di queste può essere usata anche da sola (Stella, et al., 2011). Con l’elettroforesi si separano le proteine estratte dalla matrice in base alle caratteristiche chimico-fisiche, mentre con la spettrometria di massa se ne effettua l’identificazione; alternativamente, è possibile utilizzare i *protein microarrays*, i quali consentono la quantificazione delle varie proteine basandosi sull’interazione tra le proteine del campione e le proteine-sonda “stampate” sul microarray (Riedmaier, et al., 2009). Altra tecnica utilizzata in pratica è l’*immunoblotting* (Nebbia, et al., 2008) Quest’ultima consiste in una separazione elettroforetica delle proteine e nel successivo riconoscimento e quantificazione della proteina target per mezzo di una reazione antigene – anticorpo, similmente a quanto riportato per la tecnica ELISA.

**METABOLOMICA** La metabolomica “fotografa” la presenza di nutrienti e metaboliti in un campione biologico al momento del prelievo. È stato accertato che la somministrazione di  $\beta$ -agonisti provoca un innalzamento della concentrazione

plasmatica di acidi grassi non esterificati e di glucosio (Blum, et al., 1988). Con un approccio metabolomico, Scarth ha posto in evidenza variazioni nella concentrazione di steroidi sessuali endogeni conseguentemente alla somministrazione illecita di tali sostanze (Scarth, et al., 2011). Noppe ha proposto un'analisi multiresiduale in grado di discriminare tra tracce di zeranolo dovute a trattamento illecito o a contaminazione delle derrate alimentari con la micotossina (Noppe, et al., 2008).

#### **1.4.5 Utilità della bioinformatica nell'approccio allo screening con le tecniche -omiche**

Un aspetto particolarmente critico dell'applicazione delle tecniche -omiche, è la corretta valutazione del dato biologico attraverso l'utilizzo di un adeguato metodo statistico.

Nell'ambito dei GP, sta assumendo una sempre maggiore rilevanza il possesso di dati riferibili ad una popolazione di bovini che sia non solo numericamente tale da essere considerata una popolazione di riferimento, ma che tenga conto delle differenze di razza, sesso, età, tipo di allevamento e di alimentazione e di ogni altro aspetto che possa comportare la presenza di una variabilità non attribuibile al trattamento illecito.

Per gestire l'enorme mole di dati ottenibile e creare così una classificazione dei campioni analizzati idealmente in due soli gruppi (conformi e non) bisogna poi fare uso di strumenti informatici appositamente elaborati. Gli strumenti suggeriti dalla letteratura sono essenzialmente due: l'analisi delle componenti principali (*Principal Component Analysis, PCA*) e la determinazione gerarchica dei gruppi (*Hierarchical Cluster Analysis, HCL*). Entrambe le tecniche puntano alla creazione di gruppi di soggetti in base alle somiglianze che presentano nei risultati ottenuti dalle analisi -omiche.

**PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA)** La PCA è una tecnica statistica che viene utilizzata quando si possiedono dati multivariati, cioè costituiti da più misurazioni (proprio come quelli ottenuti da un'analisi di espressione genica). La PCA individua, una volta riconosciuto l'orientamento principale della nuvola di campioni (o di ciò che è utile ai fini del risultato) delle "componenti principali" ortogonali tra di loro.

Utilizzando le componenti principali (*Principal Components, PC*) vengono generati dei grafici da cui è possibile ottenere, se viene confermata l'ipotesi oggetto di studio,

una separazione della nuvola dei campioni in due o più gruppi qualora siano presenti dei fattori di interferenza (Shi, et al., 2010).

**HIERARCHICAL CLUSTER ANALYSIS (HCL)** La HCL è una tecnica di *clustering*, cioè una tecnica che permette non solo il raggruppamento e la selezione di elementi omogenei sulla base di un'analisi multivariata degli stessi, ma anche l'individuazione di una *gerarchia* tra i gruppi, stabilendo una correlazione tra gli stessi. Il risultato di un clustering gerarchico è un dendrogramma in cui campioni simili, se lo studio è stato condotto nella maniera ottimale, vengono raggruppati tra di loro (Bergkvist, et al., 2010).

Nel paragrafo 3.5 del capitolo Materiali e metodi, verranno presentati dettagliatamente i punti critici da osservare per la corretta impostazione dell'analisi.

### **1.5 Validazione delle tecniche -omiche**

Un primo esempio di validazione delle tecniche -omiche dedicate al riconoscimento dei trattamenti illeciti con GP, ci è stato proposto da Nebbia (Nebbia, et al., 2008). Potenziali biomarcatori precedentemente individuati (Gardini, et al., 2006) sono stati applicati ad un ristretto numero di campioni di fegato prelevati durante una regolare macellazione; consecutivamente alle analisi, sono stati individuati animali che presentavano profili proteomici sovrapponibili a quelli ottenuti negli animali trattati durante la fase sperimentale (Nebbia, et al., 2008). Studio analogo è quello già più sopra citato e condotto da Scarth e collaboratori (2011). In questo studio sono stati utilizzati campioni di urina provenienti da animali allevati nelle stalle di facoltà universitarie od istituti di ricerca inglesi (campioni di controllo) e campioni prelevati da animali avviati alla regolare macellazione. Per quanto riguarda la genomica, non siamo a conoscenza di studi di effettuati su campioni di monitoraggio; tutti i lavori sono stati condotti su animali allevati in condizioni controllate.



## 2 Scopo della tesi

La presenza di residui di GP nei prodotti edibili ha suscitato la preoccupazione dei consumatori; per questo, fin dal 1981 sono stati vietati i trattamenti con GP, poiché è stato dimostrato l'effetto dannoso che provoca una continua esposizione a tali residui (IARC, 1987; DG SANCO, 1999; CONTAM Panel, 2007). L'utilizzo di GP nell'allevamento del bovino da carne è una pratica illecita tuttora perpetrata; anzi, c'è un continuo evolversi dei protocolli di somministrazione e delle molecole utilizzate per sfuggire alle attività di controllo messe in atto dagli organi di controllo (Biasotto, et al., 2010). Per contrastare tale problema, si stanno sviluppando delle tecniche -omiche in grado di affiancare l'esame istologico nello screening (Nebbia, et al., 2010).

Nel presente lavoro di tesi è stata valutata l'affidabilità dei profili di espressione genica tessuto-specifici come potenziali biomarcatori indiretti di trattamenti illeciti nella filiera del bovino da carne, applicandoli ad una popolazione di bovini sottoposti a regolare macellazione.

In precedenti progetti svolti in collaborazione o per conto di Regione Veneto, Ministero della salute ed Istituto Zooprofilattico delle Venezie (Dacasto, et al., 2009; Zancanella, et al., 2009; Giantin, et al., 2010; Lopparelli, et al., 2011; Lopparelli, et al., 2011) il gruppo di lavoro presso i cui laboratori ho svolto la parte sperimentale della presente tesi ha individuato un set di geni-candidati tessuto-specifici (fegato e testicolo) nell'ambito di esperimenti controllati utilizzando una metodica di qPCR.

Nel corso della presente tesi, un certo qual numero di quei geni candidati, scelto appositamente, è stato utilizzato per verificare la loro attendibilità su un campione conoscitivo di animali i cui profili di espressione sono stati confrontati con animali sicuramente non trattati e costituiti da campioni di controllo provenienti da precedenti esperimenti pilota.

Utilizzando un approccio bioinformatico in grado di lavorare con un'elevata numerosità di dati, sono poi stati effettuati confronti tra i dati di espressione genica ottenuti da entrambe le tipologie di campioni.

Infine, verrà fornita una valutazione economica sull'effettiva utilità della trascrittomiche come metodica di screening.



## 3 Materiali e metodi

### 3.1 Animali dell'esperimento

Progressivo	Campione	Partita	Sesso
1	21	5	M
2	22		M
3	28	7	M
4	29		M
5	30		M
6	31		M
7	36	9	M
8	37		M
9	38		M
10	39		M
11	<b>45</b>	11	<b>F</b>
12	<b>46</b>	12	<b>F</b>
13	<b>48</b>		<b>F</b>
14	49	13	M
15	50		M
16	51		M
17	52		M
18	246		M
19	247		M
20	54	14	M
21	56		M
22	57		M
23	248		M
24	<b>250</b>		<b>F</b>
25	58	15	M
26	60		M
27	61		M
28	<b>64</b>	17	<b>F</b>
29	<b>65</b>		<b>F</b>
30	260		M
31	261		M
32	<b>66</b>		<b>F</b>
33	263	18	M
34	264		M
35	265		M
36	266		M
37	73	22	M
38	74	24	M
39	75		M
40	76		M
41	77	25	M
42	78		M
43	79		M
44	81	26	M
45	82		M
46	<b>137</b>	42	<b>F</b>
47	<b>138</b>		<b>F</b>
48	<b>139</b>		<b>F</b>
49	168	53	M
50	174		M
51	175		M
52	176		M
53	<b>236</b>	10	<b>F</b>
54	268	19	M
55	269		M
56	270		M
57	301	27	M
58	323	32	M
59	<b>373</b>	45	<b>F</b>
<b>Totale animali</b>		<b>59</b>	
<b>Totale maschi</b>		<b>47</b>	
<b>Totale femmine</b>		<b>12</b>	

**Tabella 3-1:** Tabella di identificazione dei campioni di monitoraggio. I campioni sono raggruppati per partita di appartenenza. La razza e l'età non sono state indicate poiché tutti i soggetti sono degli incroci di razze francesi appartenenti alla categoria di vitelloni (animali con età compresa tra i 18 e i 24 mesi).

Gli animali oggetto di studio erano vitelloni sottoposti a regolare macellazione, ottenuti nell'ambito di un piano di monitoraggio attuato dalla Regione del Veneto (Regione del Veneto, 2008). Il numero di animali da campionare è stato definito utilizzando la formula di Cannon & Roe considerando la numerosità della partita; tali indicazioni sono peraltro riportate nella "Tabella di numerosità campionaria" presente nel Piano Nazionale per la ricerca dei Residui negli animali e nei prodotti di origine animale dell'anno 2008 (Ministero della Salute, 2008). Da ogni animale sono state prelevate delle aliquote di fegato e, per i maschi interi, di testicolo.

Poiché ritenuto utile ai fini dell'analisi, I campioni sono stati raggruppati sulla base dell'appartenenza ad una partita (vedi Tabella 3-1), così da distinguere tra gli animali che hanno condiviso lo stesso ambiente, lo stesso regime alimentare e gli stessi trattamenti farmacologici.

Progressivo	Controllo	Caratteristiche degli animali
1	K TO 1	Vitelloni di razza Frisona
2	K TO 2	
3	K TO 3	
4	K TO 4	
5	K TO 5	
6	K TO 6	
7	K TO 7	
8	K TO 8	
9	K TO 9	
10	K TO 10	
11	K TO 11	
12	K TO 12	
13	K TO 13	
<b>Totale</b>		<b>13</b>
14	K 1 PD	Vitelloni di razza Marchigiana
15	K 2 PD	
16	K 3 PD	
17	K 4 PD	
18	K 5 PD	
19	K 6 PD	
20	K 7 PD	
21	K 8 PD	
22	K 9 PD	
<b>Totale</b>		<b>9</b>
23	K 7 DE	Vitelloni di incroci di razze francesi da carne
24	K 8 DE	
25	K 9 DE	
26	K 10 DE	
27	K 11 DE	
28	K 12 DE	
29	K 23 DE	
30	K 24 DE	
<b>Totale</b>		<b>8</b>
31	K 11	Vitelloni di razza Valdostana
32	K 75	
33	K 105	
34	K 428	
35	K 759	
36	K 869	
<b>Totale</b>		<b>6</b>
37	K 0 b	Vitelloni di incroci di razze da carne
38	K 00 b	
39	K 1 b	
40	K 2 b	
41	K 3 b	
42	K 4 b	
43	K 5 b	
44	K 6 b	
<b>Totale</b>		<b>8</b>
<b>Totale controlli</b>		<b>44</b>

**Tabella 3-2:** Tabella di identificazione dei campioni di controllo provenienti dai vari esperimenti. I campioni sono raggruppati in base all'esperimento in cui sono stati utilizzati. Per ogni esperimento vengono riportate le caratteristiche principali degli animali. Gli animali di controllo sono tutti maschi.

Per confrontare i dati ottenuti dall'analisi dei campioni di monitoraggio, sono state recuperate (vedi Tabella 3-2) aliquote di tessuti appartenenti ad animali di controllo e provenienti da precedenti esperimenti pilota sui GP. Codesti animali non avevano subito alcun trattamento farmacologico né anabolizzante. Chiaramente, così facendo si sono introdotti fattori di variabilità quali la razza nonché il diverso ambiente di allevamento.

Le aliquote di tessuto (piccole porzioni dell'ordine di 100-500 mg), ottenute secondo una procedura di campionamento standardizzata (al fine di evitare una possibile variabilità istologica), sono state subitaneamente poste in microtubi contenenti *RNAlater*® (Ambion, Inc.) e successivamente conservate a -80°C fino al momento dell'analisi. Così facendo, l'RNA viene preservato indefinitamente dall'azione litica degli enzimi tissutali e dalle RNasi ubiquitarie (Life Technologies Corporation, 2010).

## 3.2 Estrazione RNA

Al momento dell'utilizzo, i campioni sono stati scongelati immergendoli in ghiaccio fondente, al fine di ridurre lo shock termico da scongelamento, e successivamente processati secondo il protocollo (vedi riquadro) che prevede l'utilizzo del *TRIzol*® Reagent (Invitrogen Corp.).

### PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE RNA TOTALE DA CAMPIONI DI TESSUTO

#### Reagenti

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

#### Procedimento

1. Preparare un numero di microtubi da 2ml con tappo a vite corrispondenti ai campioni da precessare. Siglarli opportunamente e porli in ghiaccio per permetterne il raffreddamento.
2. Aggiungere 1 ml di TRIzol ® freddo
3. Scongela il campione in ghiaccio e successivamente pesarne 100 mg circa cominciando dai controlli per prevenire eventuali contaminazioni
4. Per facilitare la lisi cellulare, sminuzzare il tessuto con le forbicine, inserire 50 mg di *silica beads* e omogeneizzare (*RiboLyser*, Hybaid, 2 cicli di 15 secondi a velocità 5), raffreddando il campione
5. Centrifugare a 13000 rpm per 10' a 4°C e recuperare la fase acquosa contenente l'RNA
6. Aggiungere 500 µL di isopropanolo al tubo contenente l'RNA e agitare, poi incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.
7. Centrifugare a 13000 rpm per 10' a 4°C ed eliminare il surnatante
8. Effettuare 2 lavaggi con etanolo al 70% aggiungendo 1 mL alla volta e centrifugando a 13000 rpm per 5' a 4°C. Al termine del secondo ciclo eliminare l'etanolo
9. Risospendere il pellet in H<sub>2</sub>O DEPC (che non contiene contaminanti e RNAasi) ed incubare a temperatura ambiente per 5', poi attendere la completa risospensione in ghiaccio fondente.

**Avvertenze:** tutte le fasi in cui sono presenti TRIzol® e cloroformio vanno effettuate sotto cappa chimica.

Durante le fasi precedenti l'immersione del campione nel *TRIzol*® Reagent, tutti gli strumenti e le superfici che potevano entrare in contatto con la matrice, sono state accuratamente lavate con i comuni detergenti, nuovamente trattate con alcool denaturato e infine con *RNaseZap*® Solution (Ambion, Inc.) come indicato nelle istruzioni, in modo da preservare i campioni da contaminazioni e degradazione da RNasi.

### 3.2.1 Controllo della qualità dell'RNA estratto

È noto che la qualità dell'RNA incide sulla *performance* della PCR (Fleige, et al., 2006). Per questo motivo è fondamentale che l'acido nucleico estratto sia di buona qualità. La qualità dell'RNA, indipendentemente dalla matrice e dalla tecnica di estrazione, viene valutata in base all'integrità e alla purezza. La quantità è invece un indice della *performance* dell'estrazione e non ha alcuna correlazione con la qualità in

senso stretto, poiché potrebbero verificarsi casi in cui si estrae molto RNA ma questo è degradato o contaminato. I criteri utili da considerare per la valutazione dell'RNA sono stati raccolti nella Tabella 3-3.

**Tabella 3-3** Criteri da considerare durante la valutazione dell'RNA (Fleige, et al., 2006, mod.) e punti su cui intervenire in caso di parametri non soddisfacenti.

Criterio da considerare	Valore ottimale	Punto di controllo
<b>Proteine</b>	Assenti	Estrazione
<b>DNA genomico</b>	Assente	Estrazione
<b>Degradazione (Rapporto 28S/18S)</b>	Tra 1.5 e 2	Conservazione / Estrazione
<b>Inibitori enzimatici RT e PCR</b>	Assenti	Estrazione
<b>Nucleasi</b>	Assenti	Estrazione / Conservazione

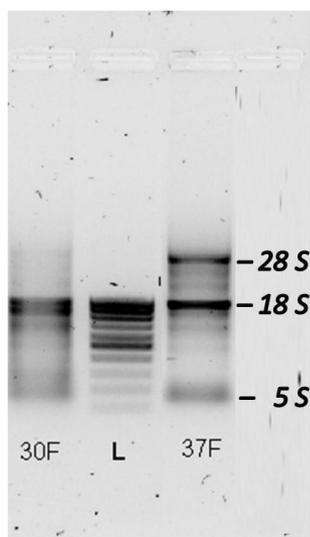
L'integrità dell'RNA estratto è fondamentale per garantire la buona riuscita delle successive fasi di analisi.

Per valutare l'integrità degli acidi nucleici si può ricorrere all'elettroforesi su gel di agarosio 1% dell'estratto.

#### PROTOCOLLO DI ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO

1. Preparare un gel di agarosio all'1%
2. Aggiungere 1µl di colorante di caricamento (SSCP loading dye) a 5µl di campione di RNA risospeso
3. Portare a 70°C per 5' in modo da facilitare la denaturazione operata dal colorante
4. Raffreddare il campione per altri 5' in ghiaccio
5. Caricare i 6µl nei pozzetti ricavati nel gel di agarosio
6. Sottoporre una corrente elettroforetica di 100V per 20' (camera elettrolitica RUN ONE electrophoresis cell, EMBI TEC, USA)

**Avvertenze:** ridurre al minimo l'esposizione alla luce del campione e del colorante.



**Figura 3-1:** Nella figura vengono indicate le posizioni delle bande di RNA. In alto sono presenti i pozzetti di caricamento dell'RNA. Date le maggiori dimensioni, la prima banda che viene a formarsi è quella formata dai frammenti di 5kb, quindi la 28S. Più sotto troviamo la banda 18S e infine dovrebbe essere appena visibile la banda 5S. Per la figura è stato scelto un campione in cui la banda 28S è pressoché assente e un campione in cui sono ben visibili tutte e tre le bande. In mezzo è presente il ladder (L) che crea la scala di riferimento.

La degradazione dell'RNA viene valutata in base alla presenza e ai rapporti tra le due bande di circa 5kb e 2kb, denominate rispettivamente 28S e 18S, più una terza banda chiamata 5S (S = Svedberg, unità di misura della velocità di sedimentazione della varie frazioni subcellulari durante centrifugazione). La banda 28S è costituita da frammenti

che hanno un maggiore ingombro rispetto alla banda 18S, quindi un RNA poco degradato dovrebbe dare una banda 28S di intensità circa doppia rispetto alla banda 18S, cioè con un rapporto  $^{28S}/_{18S}$  compreso tra 1,8 e 2 (Fleige, et al., 2006). La banda 5S dovrebbe essere poco visibile perché costituita da RNA transfer, una molecola di piccole dimensioni (tRNA, rRNA, 5S, siRNA). Quando la banda 5S è molto marcata e si ha una scarsa rifrangenza delle altre due bande si sospetta una degradazione dell'RNA, con la produzione di frammenti che migrano insieme all'RNA di piccole dimensioni.

La lettura del gel a fine corsa è stata effettuata con il sistema Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad Laboratories, Inc.), di cui un esempio in Figura 3-1.

Il gel di agarosio permette solamente di ottenere informazioni circa l'integrità del filamento di nucleotidi. Per stimare la quantità di acido nucleico estratto nonché l'eventuale di contaminanti, il campione è stato sottoposto ad analisi spettrofotometrica utilizzando il NanoDrop® *ND-1000* (NanoDrop Technologies). Lo spettrofotometro emette luce ultravioletta a differenti lunghezze d'onda. Questo fascio attraversa il campione e poi viene rilevato da un lettore ottico. Lo strumento è in grado di tracciare un grafico indicando, per ciascuna lunghezza d'onda, quanta è stata l'assorbanza (*A*) del campione, cioè quanta della luce emessa è stata "sottratta" al lettore. Ad ogni sostanza corrisponde uno specifico spettro di assorbimento, per cui è possibile determinare quale sia la sostanza presente nel campione e, grazie al concetto di assorbanza, la sua concentrazione.

Le sostanze da tenere in considerazione sono: gli acidi nucleici; le proteine e gli inibitori della PCR.

Gli **acidi nucleici** (*A* = 260 nm) sono il frutto della fase di estrazione. Non è possibile distinguere se si tratta di RNA o di DNA perché entrambi assorbono la luce ultravioletta alla stessa lunghezza d'onda. Per distinguerli si deve quindi ricorrere all'analisi del gel di elettroforesi: la presenza di DNA è dichiarata dalla presenza di una banda più alta rispetto a quella del 28S-RNA (di maggior peso molecolare).

La presenza di **proteine** (*A* = 280 nm) è indice di errata manipolazione del campione durante le fasi di estrazione. Una contaminazione da proteine porta a sospettare la presenza di DNA, dato che nelle fasi di purificazione, DNA e proteine sono contenuti nella stessa fase liquida (Life Technologies Corporation, 2010).

**Fenolo, cloroformio, isopropanolo** ( $A = 230$  nm e 280 nm) sono alcuni dei contaminanti che, conseguentemente ad un lavaggio non accuratamente eseguito, possono finire nell'RNA estratto. Questi contaminanti si comportano da inibitori della PCR e come tali vanno a ridurre l'efficienza della reazione rendendo l'esito dell'analisi meno affidabile.

#### PROTOCOLLO LETTURA ALLO SPETTROFOTOMETRO NANODROP

1. Inizializzare lo strumento effettuando la lettura del *Blank* con acqua milliQ (1  $\mu$ l)
2. Caricare sul sistema ottico 1  $\mu$ l di soluzione del campione di interesse, dopo aver settato lo strumento per la lettura dell'RNA
3. Effettuare la misurazione e assorbire il campione con della carta in modo da liberare il sistema ottico
4. Procedere con l'analisi di un altro campione

**Avvertenze:** in caso di rilevamento di un campione particolarmente concentrato (valore superiore a 2  $\mu$ g/ $\mu$ L), prima della successiva misurazione è buona norma effettuare un bianco, caricando sul sistema ottico 1  $\mu$ l di acqua, sulla quale effettuare una misurazione intermedia. Questo per evitare letture alterate dei campioni successivi

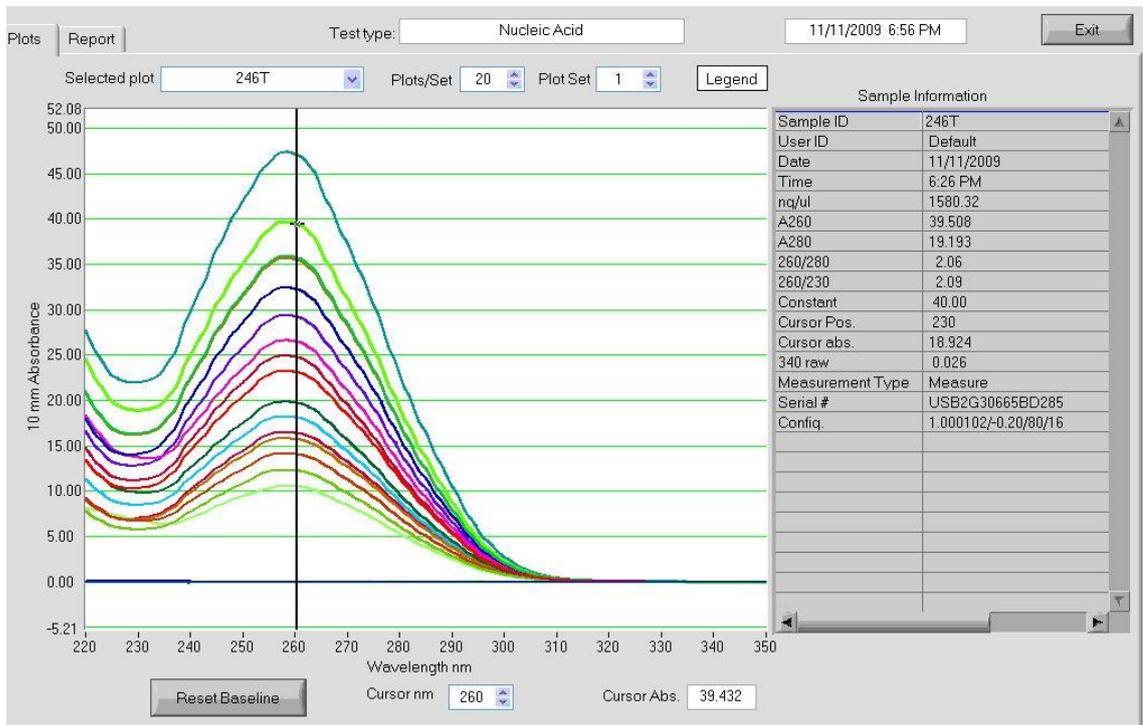
Per giudicare un RNA “di buona qualità” si valuta convenzionalmente il rapporto esistente tra le assorbanze a 230, 260 e 280 nm (Thermo Scientific, 2009). I valori ideali sono:

<b>A260 / 280</b>	Circa <b>2,0</b>
<b>A260 / 230</b>	Compreso tra <b>2,0</b> e <b>2,2</b>

In Figura 3–2 è riportata una tipica schermata ottenibile utilizzando lo spettrofotometro di cui sopra. Il grafico rappresenta le curve di assorbanza della luce UV relative ai campioni analizzati. Nella tabella a destra vengono riportati i valori di ciascun campione ed i rapporti tra le assorbanze.

Esistono nuove tecniche che permettono una più precisa determinazione della qualità dell'RNA (come l'Agilent 2100 Bioanalyzer® che valuta l'integrità dell'RNA attraverso il RIN, *RNA Integrity Number*, ed effettua la quantificazione), solitamente applicate a campioni destinati all'analisi in microarray, visti i maggiori costi di esercizio.

**Figura 3-2:** Schermata prodotta dallo spettrofotometro durante una sessione di analisi. Il cursore è posto sulla lunghezza d'onda di assorbimento degli acidi nucleici. Da notare l'assenza di picchi a 230 e 280nm indice pulizia del campione.



### 3.3 Retrotrascrizione

La retrotrascrizione (RT) è una tappa fondamentale per lo studio del trascrittoma attraverso metodiche di real-time PCR. Con la retrotrascrizione, operata da una *trascrittasi inversa*, si ottiene il cDNA (DNA complementare), a partire dall'mRNA (RNA messaggero) estratto dai campioni. Il cDNA contiene tutte le regioni codificanti dell'acido nucleico (*esoni*), mentre sono assenti le regioni silenti e promotoriali (*introni*). Il cDNA così ottenuto sarà poi amplificato con PCR per permetterne la quantificazione.

Per la retrotrascrizione è stato utilizzato il kit *High Capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems), ed il protocollo di retrotrascrizione viene qui di seguito riportato

#### PROTOCOLLO DI RETROTRASCRIZIONE DELL'RNA TOTALE

1. Lasciare scongelare i reagenti e l'RNA in ghiaccio. L'enzima non necessita di scongelamento, quindi lasciare a -20°C fino al momento di usarlo
2. Portare tutti i pool di RNA ad una concentrazione di 0,1 µg/µl
3. Preparare la mix di reazione 2X nel seguente modo, così da ottenere un volume finale per pozzetto di 10µl.

Reagenti	Volume (µl)
Tampone RT 10X	2.0
dNTPs mix 25X	0.8
Random Primer RT 10X	2.0
<i>Multiscribe<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase</i> 50 U/µL	1.0
Acqua	4.2

4. Distribuire in ogni pozzetto 10 µl di mix e 10 µl di RNA 0,1 µg/µl
5. Allestire un controllo negativo (RT-) in cui vengono inseriti tutti i componenti tranne l'enzima
6. Sigillare la piastra per evitare contaminazione ed evaporazione del campione
7. Impostare il termociclatore ad effettuare un protocollo termico di 10' a 25°C e ulteriori 120' a 37°C. A termine la piastra va raffreddata a 4°C
8. Preparare una diluizione 1:10 del cDNA per le successive analisi
9. Riporre il cDNA diluito e indiluito a -80°C per evitarne la degradazione.

### 3.4 Analisi qPCR

La *Polymerase Chain Reaction* (reazione a catena della polimerasi, PCR) è una tecnica di biologia molecolare che permette di amplificare dei frammenti di DNA di cui siano note le sequenze iniziali e terminali. Su queste ultime si sintetizzano oligonucleotidi (*primer*) complementari alla sequenza di cDNA, che formeranno il “binario” di DNA a doppio filamento. Questo tratto fungerà da innesco per il complesso enzimatico che, utilizzando i nucleotidi presenti in soluzione, produrrà la sequenza di DNA di interesse a partire dal DNA-stampo fornito. L'enzima coinvolto è la *Taq Polimerasi*, che altro non è che la DNA polimerasi modificata del batterio termofilo *Thermophilus aquaticus*, in grado di resistere alle alte temperature. La resistenza alla variazione di temperature è fondamentale, poiché il processo di amplificazione funziona solo attraverso continui cambiamenti di temperatura che distruggono le polimerasi dei mammiferi. Ad ogni ciclo, se non altro teoricamente, si raddoppia la quantità di questi tratti di interesse (*ampliconi*). Lo strumento con cui effettuare reazioni di PCR è il termociclatore, che innalzando e abbassando la temperatura permette un cambiamento conformazionale della molecola di DNA e della polimerasi.

Classicamente, si distinguono tre fasi:

- *Denaturazione*      separazione della doppia catena di DNA
- *Annealing*            appaiamento dei *primers*
- *Allungamento*      fase di attività della polimerasi.

La qPCR si basa sullo stesso meccanismo di amplificazione della PCR tradizionale, ma dopo ogni fase di *allungamento* il termociclatore effettua una lettura del livello di fluorescenza del campione in modo da quantificare gli ampliconi realmente presenti.

#### 3.4.1 Metodo di quantificazione dell'RNA – Sonde ad idrolisi

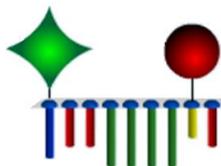
Tra le varie possibilità di quantificare l'espressione delle sequenze d'interesse, è stato scelto l'uso dell'*Universal ProbeLibrary*® (UPL), un set di sonde ad idrolisi prodotto da Roche Diagnostics Co. che accorpa i vantaggi dell'uso delle sonde ad idrolisi e la semplicità del *SYBR*® *Green* (Roche Applied Science, 2009).

Le **sonde ad idrolisi**, note come *Dual Labelled Fluorescent Probes* (DLFP), sono degli oligonucleotidi che presentano all'estremità 5' un fluoroforo e all'estremità 3' un *quencher* (letteralmente, estintore), ossia una molecola che quando è posta in prossimità del fluoroforo è in grado di captarne l'emissione luminosa (Sigma-Aldrich Co., 2008).

Per questo motivo quando la sonda è integra, il sistema non rileva alcuna fluorescenza. Le sequenze oligonucleotidiche delle sonde si appaiano al cDNA durante la fase di *annealing* come avviene per i *primers*. Sfruttando l'attività 5' → 3' esonucleasica della *Taq polimerasi*, durante la fase di allungamento, si ha l'idrolisi della sonda e quindi la liberazione in soluzione del fluoroforo e del *quencher*. Il *quencher* libero in soluzione non è in grado di schermare la fluorescenza del fluoroforo che quindi viene rilevata dal lettore. Ad ogni ciclo si avrà un aumento della fluorescenza rilevata che fornirà una stima indiretta della quantità di ampliconi presenti.

Il **SYBR® Green** è un agente intercalante che si lega al DNA a doppio filamento. L'interazione del colorante con il DNA fa sì che, in seguito a stimolazione, il colorante emetta luce. Il colorante si lega a qualsiasi tratto di DNA a doppio filamento presente nella soluzione e quindi risulta difficile essere sicuri che la fluorescenza rilevata sia dovuta all'amplificazione della sequenza desiderata o ad appaiamenti casuali di tratti di DNA monofilamento. Per effettuare questa distinzione è necessario effettuare un'analisi della curva di *melting* (curva di dissociazione) (Sigma-Aldrich Co., 2008), la cui spiegazione esula dallo scopo di questa tesi.

Le **sonde UPL** sfruttano lo stesso meccanismo di funzionamento delle tradizionali sonde a idrolisi, ma hanno il vantaggio di non dover essere sintetizzate *ex novo* ogni volta che si deve progettare un saggio, poiché già disponibili in kit, per cui seguendo il procedimento descritto più avanti (paragrafo 3.4.2) è possibile individuare la sonda ideale. A differenza delle tradizionali sonde ad idrolisi, le UPL presentano delle brevi sequenze della lunghezza massima di nove nucleotidi. L'intento del produttore era quello di produrre un set ristretto di sonde che, progettate su sequenza altamente ripetute all'interno del genoma, permettano di identificare qualsiasi segmento di DNA, sia esso animale o vegetale (Roche Diagnostics Co., 2011).



**Figura 3-3:** Rappresentazione schematica di una sonda UPL. Notare la sequenze di soli 8 - 9 nucleotidi e la presenza di un fluoroforo (verde) e del quencher (rosso) (da Roche Diagnostics Co., 2011, mod.).

Per individuare quali sequenze fossero più ripetute all'interno del DNA, sono state analizzate le sequenze altamente conservate di uomo e specie da laboratorio come ratto, topo e *Drosophila*, e poi sono state controllate per altre specie animali e vegetali. Poiché il bovino non è stato incluso in questo confronto, è necessario effettuare un'attenta analisi della funzionalità.

Il kit è costituito da 165 sonde ad idrolisi che, essendo molto corte, avrebbero una termodinamica completamente differente rispetto ai primer e agli ampliconi. Per porre rimedio a questo problema, le sonde UPL sono sintetizzate con degli analoghi del DNA (gli LNA, *Locked Nucleic Acids*) che presentano una conformazione bloccata da un ponte metilico tra l'atomo di ossigeno in 2' e l'atomo di carbonio in 4'.

Questa particolare conformazione aumenta la capacità di adesione delle basi, aumentandone la stabilità termica, e irrigidisce la struttura della sonda, incrementandone la capacità discriminatoria.

### 3.4.2 Progettazione dei saggi

La selezione dei saggi da analizzare è stata effettuata sulla base dei risultati ottenuti in precedenti esperimenti controllati, con i quali si sono valutate le modulazioni di espressione genica in seguito a trattamenti con desametasone per via orale o intramuscolo, oppure con desametasone per via orale e 17 $\beta$ -estradiolo intramuscolo. Per la selezione dei geni che verranno analizzati su campioni di fegato, è stato utilizzato il lavoro di Giantin (Giantin, et al., 2010). I saggi impiegati nel testicolo sono stati ricavati dagli esperimenti svolti da Lopparelli (Lopparelli, et al., 2011).

I geni di cui è stata valutata l'espressione sono riportati in tabella 3-4 e 3-5.

**Tabella 3-4:** Elenco dei geni che verranno analizzati all'intero di questo lavoro di tesi per quanto riguarda la matrice fegato e delle rispettive funzioni fisiologiche svolte negli organismi. Le informazioni sono state recuperate da Gene (NCBI - National Center for Biotechnology Information, 2011).

<i>Gene</i>	<i>Sigla ufficiale</i>	<i>Attività svolta nell'organismo</i>
<i><math>\beta</math>-actina</i>	<b>ACTB</b>	Costituisce il citoscheletro, quindi è responsabile dell'integrità cellulare (gene <i>housekeeping</i> )
<i>Recettore X dei retinoidi, <math>\alpha</math></i>	<b>RXR<math>\alpha</math></b>	Regolatore di trascrizione dei recettori per gli ormoni steroidei e tiroidei
<i>Citocromo P450 2B22</i>	<b>CYP2B22</b>	I citocromi P450 sono una superfamiglia di enzimi responsabili della metabolizzazione e nella sintesi di colesterolo, steroidi e lipidi indipendentemente che l'origine sia endogena o esogena L'espressione di questi tre polipeptidi è quella che risulta maggiormente alterata dai trattamenti illeciti
<i>Citocromo P450 2E1</i>	<b>CYP2E1</b>	
<i>Citocromo P450 3A</i>	<b>CYP3A</b>	
<i>Glutazione sulfotransferasi <math>\alpha</math> 1</i>	<b>GSTA1</b>	Enzima coinvolto nella detossificazione di qualsiasi molecola mediante la coniugazione con il glutatione
<i>Sulfotransferasi 1A1</i>	<b>SULT1A1</b>	Catalizza la solfatazione di molti ormoni e dei composti esogeni
<i>Idrossisteroide (11<math>\beta</math>) deidrogenasi 1</i>	<b>HSD11B1</b>	Enzima che catalizza la conversione del cortisolo nel metabolita inattivo cortisone

**Tabella 3-5:** Elenco dei geni che verranno analizzati all'intero di questo lavoro di tesi per quanto riguarda la matrice testicolo e delle rispettive funzioni fisiologiche svolte negli organismi. Le informazioni sono state recuperate da Gene (NCBI - National Center for Biotechnology Information, 2011).

<i>Gene</i>	<i>Sigla ufficiale</i>	<i>Attività svolta nell'organismo</i>
<i><math>\beta</math>-actina</i>	<b>ACTB</b>	Costituisce il citoscheletro, quindi è responsabile dell'integrità cellulare ( <i>gene housekeeping</i> )
<i>3<math>\beta</math>-idrossisteroide deidrogenasi 1</i>	<b>HSD3B1</b>	Enzima coinvolto nella steroidogenesi testicolare: catalizza la conversione del deidroepiandrosterone in androstenedione.
<i>17<math>\beta</math>-idrossisteroide deidrogenasi 3</i>	<b>HSD17B3</b>	Espresso prevalentemente a livello testicolare, catalizza la conversione dell'androstenedione in testosterone
<i>Citocromo P450 c17</i>	<b>CYP17</b>	I citocromi P450 sono una superfamiglia di enzimi responsabili della metabolizzazione e nella sintesi di colesterolo, steroidi e lipidi indipendentemente che l'origine sia endogena o esogena L'espressione di questi tre polipeptidi è quella che risulta maggiormente alterata dai trattamenti illeciti. La carenza di CYP17 porta ad una condizione di pseudoermafroditismo e iperplasia surrenalica.
<i>Citocromo P450 3A</i>	<b>CYP3A</b>	
<i>Recettore dei mineralcorticoidi</i>	<b>MR</b>	Recettore che media l'azione dell'aldosterone sul bilancio elettrolitico attivando la trascrizione dei geni preposti.
<i>Glutazione sulfotransferasi <math>\alpha</math> 1</i>	<b>GSTA1</b>	Enzima coinvolto nella detossificazione di qualsiasi molecola mediante la coniugazione con il glutatione
<i>11<math>\beta</math>-idrossisteroide deidrogenasi 1</i>	<b>HSD11B1</b>	Enzima che catalizza la conversione del cortisolo nel metabolita inattivo cortisone
<i>11<math>\beta</math>-idrossisteroide deidrogenasi 2</i>	<b>HSD11B2</b>	Enzima che catalizza la conversione del cortisolo nel metabolita inattivo cortisone. Protegge le cellule testicolari dagli effetti pro-apoptici del cortisolo.

Per poter progettare i saggi di PCR è necessario conoscere la sequenza nucleotidica del gene considerato. Tale sequenza è reperibile su un database (*GenBank*) del *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, disponibile presso la *U.S. National Library of Medicine* e consultabile attraverso un qualsiasi browser al sito: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>.

Sulle sequenze indicate in Tabella 3–6 sono stati prodotti i *primer* facendo attenzione a considerare delle regioni del genoma gene-specifiche e cercando di rispettare alcune condizioni quali:

- ✓ progettare almeno uno dei *primer* in modo che a metà circa della sua lunghezza ci fosse una giunzione esone – esone. Questo per evitare l'amplificazione di DNA genomico che interferirebbe con i risultati dell'analisi

- ✓ fare in modo che la lunghezza dell'amplicone, mantenuta intorno ai 100 nucleotidi per una maggiore efficienza di amplificazione, non differisca eccessivamente tra i vari saggi in modo da mantenere per tutti i geni le stesse impostazioni del termociclatore ed avere efficienze confrontabili

Per la progettazione dei saggi abbiamo utilizzato il software *open source ProbeFinder version: 2.45* di Roche Applied Science, disponibile sul sito <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp>. Questo software è studiato per progettare saggi qPCR per uomo e specie animali di laboratorio, ma permette di progettare saggi sul genoma di qualsiasi organismo (Roche Applied Science, 2009). Il software è stato ottimizzato per lavorare al meglio con le sonde UPL senza che vi sia la necessità di ulteriori aggiustamenti.

Una volta inserita la sequenza del gene di interesse, il software individua una serie di saggi associando ai segmenti riconosciuti dalle sonde una coppia di primers. Dato che si volevano saggi progettati su giunzioni esone – esone, sono state recuperate le informazioni circa la posizione ipotetica delle giunzioni dal sito *Ensembl*: un progetto congiunto tra *l'European Bioinformatics Institute – European Molecular Biology Laboratory* e il *Wellcome Trust Sanger Institute* che si propone di mantenere costantemente aggiornate le sequenze del genoma degli eucarioti. La sezione riguardante il bovino, oggetto della presente tesi, è stata recuperata presso il sito [http://www.ensembl.org/Bos\\_taurus/Info/Index](http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index). A questo punto il software restituisce come risultato una lista di saggi in ordine di efficienza basandosi sui parametri termodinamici ideali per le sonde UPL.

Successivamente è stata eseguita una verifica dei saggi proposti attraverso un'analisi bioinformatica, chiamata *In silico PCR* attraverso il software fornito dal *Center for Biomolecular Science & Engineering of the University of California, Santa Cruz*, disponibile presso <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>. Questo programma permette di verificare, una volta specificato il genoma della specie d'interesse, se c'è il rischio di avere amplificazione di DNA genomico o se è possibile la presenza di trascritti simili o di pseudogeni nell'intero genoma dell'animale della specie di interesse, che potrebbero interferire con l'analisi. Questo passaggio è stato necessario in quanto l'intero genoma del bovino non era disponibile nelle banche dati di *ProbeFinder*.

Per alcuni saggi, il sistema sopra descritto non ha fornito risultati soddisfacenti e quindi è stato necessario elaborare manualmente dei *primer*, utilizzando il software

*Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), che fossero in grado di soddisfare tutte le condizioni necessarie. La lunghezza ottimale dei *primers* deve essere di venti nucleotidi, e la *melting temperature* (temperatura alla quale il 50% dei primer in soluzione è appaiata) attorno a 60°C (Roche Applied Science, 2009). In questo caso sono state eseguite le analisi termodinamiche utilizzando il software *OligoAnalyzer 3.1* (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/default.aspx>) della *Integrated DNA Technologies*, rispettando i parametri consigliati da *ProbeFinder*. Con il software *OligoAnalyzer* sono stati esclusi i primer che formano strutture secondarie come gli *hairpin* (letteralmente “forcine”: un monofilamento di nucleotidi si piega in un punto della sua sequenza ed i nucleotidi si appaiano a formare un doppio filamento) o, eventualmente, formano *omo-dimeri* (appaiamenti tra primer identici), o degli *etero-dimeri* (appaiamenti tra i due primer della coppia).

Per i geni che appartengono a delle famiglie geniche (in particolare i citocromi P450), per evitare l’identificazione di sequenze al di fuori di quella d’interesse, è stato necessario effettuare un allineamento con *MultAlin* (Corpet, 1988).

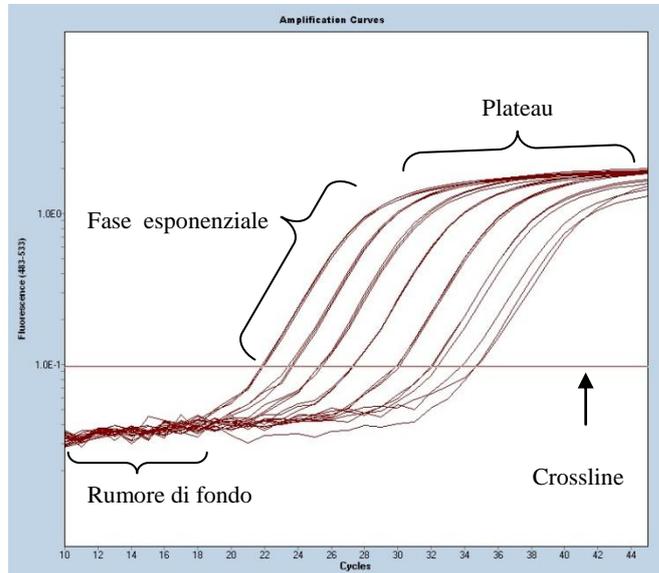
La Tabella 3–6 riporta i saggi che sono stati elaborati con la procedura descritta precedentemente.

**Tabella 3-6:** La tabella mostra il codice identificativo della sequenza disponibile in GenBank (ID sequenza), il codice della sonda utilizzata (UPL), la coppia di primer sintetizzata per l’esecuzione della PCR, la lunghezza dell’amplicone (bp) e la base di inizio e fine dell’amplicone (Posizione).

Gene	ID sequenza	UPL	Primer Forward	Primer Reverse	bp	Posizione
ACTB	NM_173979.3	#115	caaggccaacctgagaa	gtacatggcaggggtgtg	63	428 - 491
RXRa	XM_881943	#27	acatgcagatggacaagacg	agagccccttgagtcgg	76	955 - 1031
CYP2B2	NM_001075173	#97	ttcctgaggggatgtgt	ggtggccagagagaatcg	75	185 - 260
CYP2E1	NM_174530	#81	ttcctgctggagtgctc	gcaaagccgacgacaac	65	491 - 559
GSTA1	NM_001078149	#106	ttccctctgctaaaggcccta	cttctctggctgccagg	114	588 - 672
SULT1A1	NM_177521	#38	cggctcctcaagacacactt	gagacggccacatccttg	106	344 - 450
CYP3A	NM_174531.2	#154	aggagtccgtctctgaaagg	acctcatgccaatgcaattt	104	1383 - 1487
HSD11B1	NM_001123032.1	#8	ggcctcatcgacacagaca	ggcacattctccttgag	80	703 - 783
HSD3B1	NM_174343.2	#130	tgaactcaatgtgaaaggtaccagc	gtgataaagaccggtacgc	74	396 - 470
HSD17B3	NM_001076439.1	#47	acaggattcaatgtcgtgct	cctatcgtcagctcaatcctcg	82	269 - 351
CYP17	NM_174304.1	#2	tgtgaatgaaatccttgaaaa	tgtgcagcaagttagtatgg	68	771 - 839
MR	NM_001191349.1	#146	ccttcgaggaatacacgtaa	gaggccatccttggaaatc	64	2594 - 2658
HSD11B2	NM_174642	#42	cctggggtgtcaaggtca	cacgtcctcactgactgtcttg	65	852 - 917

### 3.4.3 Validazione dei saggi

**Figura 3-4:** Esempio di una lettura di fluorescenza di una piastra allestita per elaborare una curva standard utilizzando delle diluizioni scalari di cDNA. Da notare che all'aumentare della diluizione aumenta il  $C_p$  e il fascio dei triplicati perde di compattezza (aumenta l'errore). Il  $C_p$  viene ricavato dall'intersezione tra *crossline* e curva di fluorescenza.



Utilizzando le sonde UPL, abbiamo deciso di utilizzare tutto il pacchetto offerto da Roche® *Diagnostics* in modo tale da utilizzare il sistema al massimo delle sue potenzialità. Abbiamo effettuato le misurazioni utilizzando il termociclatore *LightCycler® 480* e il software annesso versione 1.5.0. Per le mix di reazione abbiamo utilizzato il kit *LightCycler® 480 Probes*

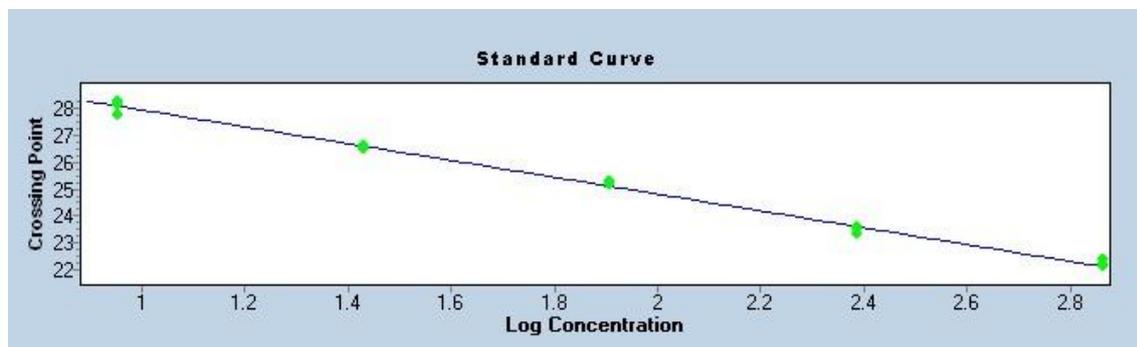
*Master* che è stato utilizzato secondo le indicazioni fornite dal produttore (Roche Diagnostics GmbH, 2008).

La qPCR è una tecnica estremamente sensibile che ne permette la quantificazione in maniera estremamente precisa, e per questo motivo ogni singolo saggio deve essere “validato”, cioè deve essere settato in modo tale da garantire le migliori condizioni di specificità ed efficienza possibili (Wong, et al., 2005).

Per fare questo abbiamo utilizzato un *pool* di DNA complementare (cDNA) ottenuto a partire da campioni tanto di monitoraggio quanto di controllo. Mantenendo costante il pool di cDNA e variando le concentrazioni di *primers* e sonde abbiamo individuato quali fossero le combinazioni ottimali ricercando i *crossing points* ( $C_p$ , vedi oltre) più precoci e le curve con aspetto di crescita esponenziale. Il  $C_p$  indica lo stadio in cui la fluorescenza prodotta dall'amplificato viene ad essere distinta dalla fluorescenza di fondo; è cioè il punto di intersezione tra la curva di amplificazione e la *crossing line*, una retta che deve essere posizionata al livello di fluorescenza il più basso possibile, che individua il segnale aspecifico da sottrarre alla fluorescenza (vedi esempio in Figura 3–4). Il valore del  $C_p$  è inversamente proporzionale alla concentrazione di cDNA target nel campione. Una volta stabilita la composizione delle mix di reazione, sempre utilizzando lo stesso pool, ma in diluizioni scalari, sono state tracciate le *curve standard*.

Le *curve standard* permettono di elaborare una retta di regressione lineare che mette in relazione il  $C_p$  alla concentrazione iniziale di cDNA nel campione permettendone la quantificazione in fase di analisi. Attraverso le curva standard si ottengono anche informazioni quali l'efficienza della reazione che idealmente dovrebbe essere prossima a 2 (pari al 100%) e l'errore, cioè l'accuratezza della misurazione del  $C_p$  dei replicati rispetto al valore atteso dalla retta di regressione, che deve essere inferiore a 0,2 (Roche Diagnostics GmbH, 2008). Un esempio di curva standard è riportato in Figura 3-5.

**Figura 3-5:** Esempio di una curva standard. I pallini verdi indicano i  $C_p$  ottenuti dalle diluizioni seriali del pool di cDNA. In blu è rappresentata la retta di regressione lineare che permette la quantificazione del cDNA sulla base del  $C_p$  ottenuto. Questa è la curva standard di un saggio con un'efficienza pari a 2,09 per  $C_p$  compresi tra 22,22 e 28,06.



L'efficienza ottenuta con le curve standard non può essere estesa a qualsiasi  $C_p$  rilevato, ma si limita al *range* entro cui tale efficienza viene determinata. Per questo motivo si parla di *range dinamico*, cioè di un intervallo di concentrazioni di cDNA entro cui il saggio risulta attendibile. All'interno del *range dinamico* esiste una relazione lineare tra la fluorescenza rilevata e la concentrazione dell'analita nel campione al tempo zero.

Per analizzare il dato ottenuto nel corso delle analisi ed ottenere i  $C_p$  con cui disegnare le curve standard, il sistema Roche® prevede due modalità: il metodo del massimo della derivata seconda e il metodo “*Fit points*”.

Dalla matematica ricordiamo che la derivata prima di una funzione serve ad individuare in quali intervalli la funzione in esame è crescente o decrescente e a determinarne i valori di massimo e minimo. La derivata seconda viene impiegata per determinare i punti di flesso e per individuare se la funzione sia concava o convessa.

Impiegando l'algoritmo che prevede l'utilizzo del primo metodo, il software identifica la “funzione” che disegna la curva di fluorescenza, campione per campione, e ne effettua uno studio in modo che il  $C_p$  venga individuato con il punto in cui la crescita esponenziale di fluorescenza sia massima. In altre parole, poiché la fluorescenza

aumenta enormemente nella fase iniziale della crescita esponenziale, viene a crearsi un massimo in derivata seconda e questo punto viene preso come Cp del campione. Questo è un metodo automatico di identificazione del valore di Cp, che si presta ottimamente all'interpretazione dei dati di fluorescenza acquisiti in saggi che si adattano bene alle impostazioni parametriche medie fissate dal software Roche (in termini di qualità dell'RNA, di funzionalità degli oligonucleotidi e delle sonde, etc.).

In questo lavoro è stato scelto il metodo *fit point* dove è stato determinato il *first cycle* per togliere del rumore di fondo, mentre l'altezza della *crossline* è stata determinata in automatico moltiplicando la deviazione standard del rumore di fondo per 12 (Roche Diagnostics GmbH, 2008).

**Tabella 3-7:** Sono riportate le concentrazioni ottimali di *primer* e sonde. Per ogni gene è indicato il metodo di analisi e i valori impostati manualmente (*first cycle*) per ottenere delle curve standard con efficienza più possibile prossima a 2 (pari al 100%). *Range* indica l'intervallo di Cp entro cui l'amplificazione ha un'efficienza pari a quella calcolata e quindi è possibile quantificare le quantità di cDNA iniziale.

SAGGI FEGATO	Concentrazione ottimale reagenti [nM]			ANALISI			Range	
GENE	Forward	Reverse	Sonde	Metodo	First Cycle	Efficienza	min	max
ACTB	300	300	200	Fit point	11 (BG12-16)	1.874	16.37	23.61
RXRa	600	300	100	Fit point	10 (BG11-15)	2.09	22.22	28.06
CYP2B22	600	600	200	Fitpoint	23 (BG24-28)	2,094	34.37	40.15
CYP2E1	600	300	200	Fit point	9 (BG10-14)	1.884	17.11	25.60
GSTA1	600	600	100	Fit point	12 (BG13-17)	1.995	25.77	19.28
SULT1A1	300	300	100	Fit point	4 (BG5-9)	1.988	19.73	29.42
CYP3A	300	300	100	Fit point	11 (BG12-16)	1.993	22.79	31.03
HSD11B1	600	300	100	Fit point	17 (BG18-22)	1.928	21.99	30.30

SAGGI TESTICOLO	Concentrazione ottimale reagenti [nM]			ANALISI			Range	
GENE	Forward	Reverse	Sonde	Metodo	First Cycle	Efficienza	min	max
ACTB	300	300	100	Fit point	9 (BG10-14)	1.973	18.51	26.52
HSD3B1	600	300	200	Fit point	10 (BG11-15)	1.999	27.03	33.75
HSD17B3	300	600	200	Fit point	10 (BG11-15)	1.999	26.94	34.91
CYP17	300	300	100	Fit point	5 (BG6-10)	1.967	23.63	30.85
CYP3A	300	300	100	Fit point	3 (BG4-8)	1.997	22.79	31.03
MR	300	600	200	Fit point	14 (BG15-19)	2.051	24.79	32.39
GSTA1	600	600	100	Fit point	5 (BG6-10)	1.993	21.42	28.11
HSD11B1	600	600	200	Fit point	14 (BG15-19)	2.005	34.23	39.82
HSD11B2	600	600	200	Fit point	6 (BG7-11)	2.082	31.42	35.98

Una volta determinata, saggio per saggio e tessuto per tessuto, la *crossline* effettiva, il software determina i punti che corrispondono alla fase di massima crescita esponenziale della curva di amplificazione (i *fit points*), come nel metodo precedente. Il sistema consente di utilizzare una determinazione automatica oppure soggettiva della

*threshold* (il *cut-off* di intensità di fluorescenza che consente di discriminare il segnale aspecifico da quello specifico). In questo studio è stata utilizzata per tutti i casi l'impostazione automatica, che calcola l'altezza ideale cui deve essere impostata la *threshold*, tale da minimizzare l'errore associato all'analisi.

#### **3.4.4 Analisi dei campioni**

Con i rapporti ottimali tra *primers* e sonde ottenuti dalla validazione dei saggi ed utilizzando la *LightCycler® 480 Probes Master*, una miscela contenente l'enzima e i nucleotidi in un buffer prodotta da Roche Diagnostics, sono state eseguite le analisi. Per estrapolare i valori di  $C_p$  sono stati utilizzati gli stessi parametri impiegati per ottenere le rispettive curve standard. La preparazione delle mix di reazione è avvenuta mantenendo tutti i reagenti in ghiaccio al fine di ridurre la degradazione del sistema enzimatico e ottimizzare la funzionalità complessiva del preparato. La mix di reazione è stata caricata nelle piastre a 96 pozzetti. Successivamente, sono stati inseriti i campioni facendo attenzione ad evitare la contaminazione tra di essi. Allo scopo di confermare l'effettiva assenza di contaminazioni in ogni piastra, oltre ai campioni di analisi, è stato inserito un controllo negativo, cioè una comune mix di reazione comprensiva di tutti i reagenti, con acqua al posto del cDNA. In caso di contaminazione, il cDNA verrebbe a trovarsi all'interno di questo pozzetto risultando in un'amplificazione rinvenibile alle analisi. In questo caso tutta la piastra perde di validità e il saggio è da ripetere. Assieme al controllo negativo, viene inserito anche il controllo positivo. Con questo, si vuole verificare il corretto funzionamento di tutti i componenti per garantire l'ottimale esecuzione dell'analisi. Per far questo si inserisce il cDNA del pool utilizzato per la realizzazione delle curve standard come fosse un campione qualsiasi e ci si aspetta che il  $C_p$  sia sovrapponibile a quanto rilevato in precedenza, a parità di condizioni di reazione. Un altro controllo, che però viene fatto solamente nella fase di validazione del saggio è il cosiddetto *RT minus*; in un pozzetto contenente tutti i reagenti di PCR viene inserito un "campione" costituito da RNA non retrotrascritto. Qualora venga rilevata un'amplificazione, questa sarà da attribuire solamente all'amplificazione di DNA genomico da parte del saggio, rendendo necessaria una nuova fase di progettazione. In pratica una piastra è da considerarsi riuscita quando il controllo positivo produce una curva di amplificazione paragonabile a quella prodotta in corso di validazione, mentre *RT minus* e il controllo negativo risultano totalmente privi di un segnale di amplificazione.

Per ottenere dei risultati attendibili, e poter effettuare delle correlazioni, tutte le analisi riguardanti lo stesso gene andrebbero eseguite contemporaneamente all'interno dello stesso sistema di analisi, poiché la diversa efficienza di retrotrascrizione, gli sbalzi termici, l'esposizione alla luce e altri fattori sono in grado di alterare la funzionalità del sistema. Questo è praticamente impossibile dato l'esiguo numero di pozzetti in confronto all'enorme potenziale del sistema di analisi. Per questo, ogni gruppo di campioni appartenente allo stesso lotto di retrotrascrizione viene amplificato insieme ad un *calibratore*: un campione di riferimento grazie a cui verranno normalizzate le differenze tra piastre diverse dello stesso saggio, dovute al tempo e all'operatore, ottenute in analisi successive.

#### **3.4.4.1 Normalizzazione dei risultati**

Un passaggio fondamentale nell'analisi dei campioni è la normalizzazione dei risultati (Wong, et al., 2005).

La *normalizzazione* permette di correlare la differente espressione del gene di interesse sulla base di un gene essere espresso in misura costante (la sua espressione non varia in seguito alla somministrazione di GP) nel tessuto esaminato, eliminando la variabilità legata alla differente concentrazione di cDNA analizzato. Nell'analisi dei trattamenti illeciti con GP, tale gene è rappresentato dalla  $\beta$ -actina (Lopparelli, et al., 2010).

La quantità di RNA che viene estratto da ogni aliquota di tessuto è variabile in funzione di:

- composizione istologica dell'aliquota
- efficienza di estrazione (variazioni dei tempi di contatto anche minimi alterano l'effettiva estrazione di materiale genetico)
- fasi di purificazione (ad ogni lavaggio c'è perdita di mRNA),

Non bisogna dimenticare che non sempre si ha la stessa efficienza di retrotrascrizione e di amplificazione; così come la degradazione del campione che è in grado di "ridurre" artificialmente la quantità di RNA presente.

#### **3.4.4.2 Quantificazione relativa**

Il presupposto su cui si basa la quantificazione in qRT-PCR entro il range dinamico specifico di ogni saggio allo studio, è dato dal fatto che il numero di cicli di

amplificazione necessari a rendere rilevabile la sequenza genica ricercata sia inversamente proporzionale alla quantità della sequenza stessa presente all'inizio dell'analisi. La quantità di cDNA (o RNA) viene estrapolata dalla curva standard che viene creata per ogni saggio.

Con la curva standard è possibile fare due tipi di quantificazione: con la *quantificazione assoluta* viene determinato esattamente il numero di sequenze di cDNA target che erano presenti al momento dell'analisi nel campione; mentre con la *quantificazione relativa*, adottata nel presente lavoro, si esprime un risultato in termini relativi assumendo come mantenuta l'espressione del calibratore.

Per effettuare questi due tipi di quantificazione i campioni standard che costituiscono la curva hanno una diversa origine: per la quantificazione assoluta devono essere dei campioni a concentrazione assoluta nota, mentre per la quantificazione relativa si utilizzano delle diluizioni seriali di un campione iniziale autoprodotta. Infatti, nella quantificazione relativa interessano maggiormente i rapporti di concentrazione reciproci che il contenuto assoluto di analita.

Il metodo più utilizzato per effettuare la quantificazione relativa è quello di Livak (Livak, et al., 2001). Con tale metodo si determina dapprima il differenziale di espressione del gene *target* nel campione *unknown* rispetto all'espressione del gene di riferimento (*reference*) mediante la formula:

$$\Delta C_p = C_p^{gene\ target} - C_p^{gene\ reference}$$

In questo modo, supponendo costante l'espressione del gene *reference*, si opera una normalizzazione rispetto agli errori connessi alle fasi dell'analisi che si concludono con l'amplificazione (campionamento, manipolazione, conservazione, pipettaggio, estrazione, retrotrascrizione, ecc.), che possono contribuire alla differenza osservata in termini di  $C_p$  tra i vari campioni, indipendentemente dalla reale differenza di espressione del gene oggetto di studio.

Successivamente si normalizza la variabilità, dovuta alla differente efficienza di amplificazione riscontrabile in campioni dello stesso studio analizzati in piastre diverse (ad esempio la variabilità prodotta da errori di caricamento, dalla conservazione del materiale analizzato, dall'uso di reagenti appartenenti a lotti diversi) grazie all'utilizzo

del campione calibratore di cui si è già discusso altrove in questo capitolo, secondo l'equazione:

$$\Delta\Delta Cp = \Delta Cp^{campione} - \Delta Cp^{calibratore}$$

dove il Cp del calibratore viene determinato allo stesso modo del Cp di un campione.

Postulando che l'efficienza sia il più possibile vicino a 2 (quindi al 100%) e quindi ad ognuno degli  $n$  cicli di amplificazione si abbia un raddoppio del contenuto iniziale dell'analita cercato, abbiamo che:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

dove RQ è il coefficiente di espressione del gene target.

L'analisi statistica che segue è applicata ai valori di coefficiente di espressione ottenuti applicando questo algoritmo.

### **3.5 Elaborazione statistica**

I risultati forniti dalla quantificazione relativa, possono suggerirci solamente un'idea delle alterazioni dell'espressione genica dovute alla somministrazione illecita dei GP, considerando un solo gene alla volta. In questo lavoro è stato utilizzato un approccio da studio di espressione che invece di limitarsi a ciò, ha voluto considerare contemporaneamente tutte le variabili.

Per riuscire a lavorare con un numero così elevato di variabili non è più sufficiente l'utilizzo di grafici basati sul sistema cartesiano, dato che in questo modo possono essere rappresentate solamente tre variabili.

Poiché ci troviamo a lavorare con dei dati multivariati, è fondamentale ricorrere alle analisi statistiche multivariate.

Le analisi statistiche multivariate maggiormente utilizzate in letteratura sono l'analisi delle componenti principali (*Principal Component Analysis, PCA*) e la determinazione gerarchica dei gruppi (*Hierarchical Cluster Analysis, HCL*) (Riedmaier, et al., 2009).

La PCA è una tecnica di analisi dei dati multivariati che permette di identificare gli schemi che riassumono la variabilità dei dati e poi crea una rappresentazione in modo da evidenziare le similitudini e le differenze che intercorrono tra essi. Questo è reso possibile dal fatto che la variabilità viene ridotta a due sole dimensioni ma senza che ci sia un'importante perdita di informazioni. Questa tecnica di analisi si basa su tre momenti che vengono di seguito sintetizzati (Smith, 2002).

Innanzitutto è necessario ridurre gli effetti provocati dalle distanze alla distribuzione spaziale dei dati. Per far questo si effettua una *standardizzazione* dei dati calcolando la media per ogni dimensione (in questo lavoro ogni saggio costituisce una dimensione nello spazio) e sottraendola ad ogni dato: si produce così una matrice con media pari a zero che corrisponde ad una nuvola disposta attorno all'origine del sistema multidimensionale.

A questo punto viene calcolata la covarianza che fornisce una misura di quanto le variabili siano dipendenti e su questa vengono calcolati *eigenvectors* (o autovettori) e *eigenvalues* (autovalori). Gli autovettori ci danno delle informazioni circa gli schemi presenti all'interno della variabilità dei dati e da questi vengono ricavate le *componenti principali* (PC). Le PC non presentano tutte la stessa importanza, ma la significatività viene attribuita sulla base degli autovalori, dove un autovalore è lo scalare (cioè un numero reale non sensibile alle dimensioni dello spazio e al sistema di riferimento) per cui viene moltiplicato il vettore in modo da ottenere autovettore. Non si entra nell'algebra sottostante alla determinazione di autovettori ed autovalori poiché non è funzionale allo scopo della tesi.

Ora i dati vengono espressi sulla base delle relazioni che intercorrono tra essi e, utilizzando le prime due PC individuate, viene prodotto un grafico di facile interpretazione (Smith, 2002). L'output dell'analisi è, infatti, un grafico bidimensionale in cui i campioni sono rappresentati da punti.

L'HCL invece è una modalità di confronto tra osservazioni diverse delle variabili, fondata su una rappresentazione dei dati a gruppi (*cluster*) in cui i membri appartenenti ad uno stesso *cluster* sono più simili tra loro rispetto ai membri che costituiscono *cluster* diversi. Da notare che si ottiene sempre la classificazione più significativa possibile senza dover operare alcuna classificazione *a priori* (StatSoft, 2011). Un'analisi di HCL produce un dendrogramma in cui i campioni simili sono vicini e la somiglianza tra i vari gruppi viene valutata sulla base della lunghezza dei bracci del grafico.

Per creare i *cluster* è necessario che i dati abbiano una distribuzione normale e che sia presente una relazione qualsiasi che consenta di individuare delle aree di maggior addensamento dei dati stessi, cioè che non ci sia una dispersione casuale dei dati. Esistono due tipi di *clustering*: il *bottom-up clustering* e il *top-down clustering*.

Il *top-down clustering* chiamato anche *divisive clustering* considera inizialmente tutti i dati come facenti parte di un unico grande cluster da cui, per tentativi ed errori, vengono prodotti dei cluster di dimensioni sempre minori fino ad ottenere dei cluster composti da un singolo membro.

Il *bottom-up clustering* noto anche come *agglomerative clustering* parte dalla situazione opposta rispetto al precedente: inizialmente ogni dato viene considerato come un gruppo a se stante e successivamente unito, tramite un processo iterativo per tentativi, ad altri gruppi fino a formare un unico grande gruppo. Questo secondo è quello che viene maggiormente utilizzato (Manning, et al., 2008) ed è quello che verrà applicato in questo lavoro.

La Tabella 3–7 riporta delle indicazioni per l’utilizzo dei vari algoritmi di *clustering* proposti dal software di analisi statistica verrà utilizzato.

In Tabella 3–8 vengono riportati alcuni degli algoritmi, offerti dal *software* di analisi statistica, per la misura della distanza presente tra i vari gruppi. La selezione è stata fatta basandosi sulla maggiore diffusione di questi algoritmi (StatSoft, 2011).

**Tabella 3-7:** Indicazioni circa il funzionamento dei vari algoritmi di clustering proposti dal software GenEx e le relative applicazioni (Bergkvist, et al., 2010; StatSoft, 2011, mod.).

<b>Metodi di clustering</b>	<b>Funzionamento</b>
<b>Single linkage</b>	La distanza tra due gruppi è determinata dalla distanza dei due membri più vicini. Tende a formare una sorta di catena che unisce tutti i membri. Utile quando i dati hanno una disposizione irregolare
<b>Complete linkage</b>	La distanza tra due gruppi è determinata dalla distanza tra i due membri più distanti. Crea gruppi molto piccoli. Utile quando è già presente una separazione tra i membri
<b>Average linkage</b>	La distanza è la media delle distanze di ogni membro dei gruppi: è la via di mezzo tra i precedenti
<b>Ward’s algorithm</b>	A differenza di tutti gli altri, questo metodo crea i gruppi analizzando la varianza. Si ritiene che questo sia un metodo molto efficace. Tende a creare dei gruppi di ridotte dimensioni.

**Tabella 3-8:** Indicazioni circa il funzionamento di alcuni degli algoritmi, proposti dal software GenEx, che vengono utilizzati per quantificare la distanza tra i vari gruppi generati dagli algoritmi di clustering (Bergkvist, et al., 2010; StatSoft, 2011, mod.).

<b>Misura della distanza</b>	<b>Funzionamento</b>
<b>Euclidean</b>	Il metodo più utilizzato: la distanza è definita geometricamente. Dipende dalla scala dei valori di espressione genica
<b>Euclidean squared</b>	Come il precedente ma la distanza dei soggetti più lontani viene accentuata
<b>Manhattan</b>	Calcola la media delle distanze nello spazio. A differenza dell'Euclidean, l'effetto degli outliers viene ridotto
<b>Pearson correlation</b>	Evidenzia le variazioni tra i vettori di espressione e rileva sia le correlazioni positive che quelle negative

Molti programmi di statistica permettono di fare questo tipo di analisi, in questo studio si è optato per il software di analisi *GenEx*® (GenEx Enterprise, versione 5.2.7.44, MultiD Analysis AB, ©2010) sviluppato appositamente per essere integrato nei laboratori dove si fa qPCR (Bergkvist, et al., 2010).

Come si può vedere (Tabella 3-7 e 3-8) esistono diverse possibilità per attuare l'analisi HCL e PCA ma la scelta di un metodo rispetto ad un altro non deve essere tale da alterare completamente la classificazione dei campioni, infatti, bisogna cercare di non scegliere una combinazione sulla base dei risultati che si vogliono ottenere (Bergkvist, et al., 2010).

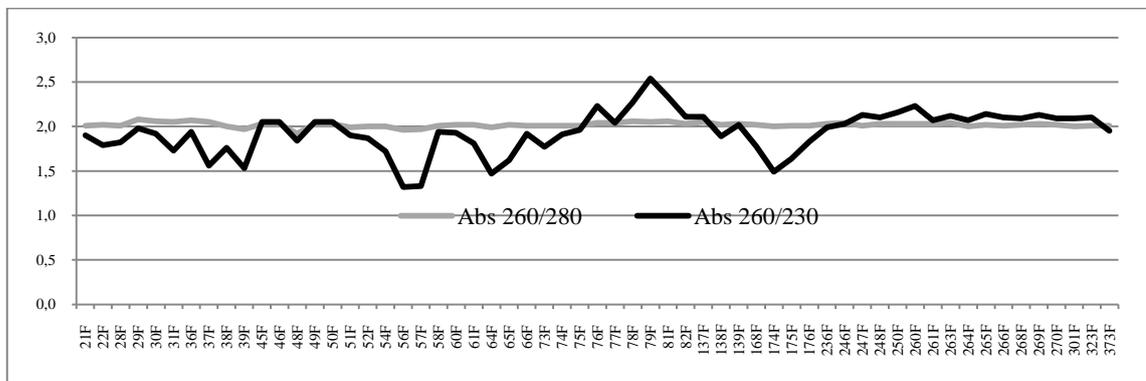
Questi concetti permetteranno di effettuare le considerazioni presentate nella discussione dei risultati.

## 4 Risultati e discussione

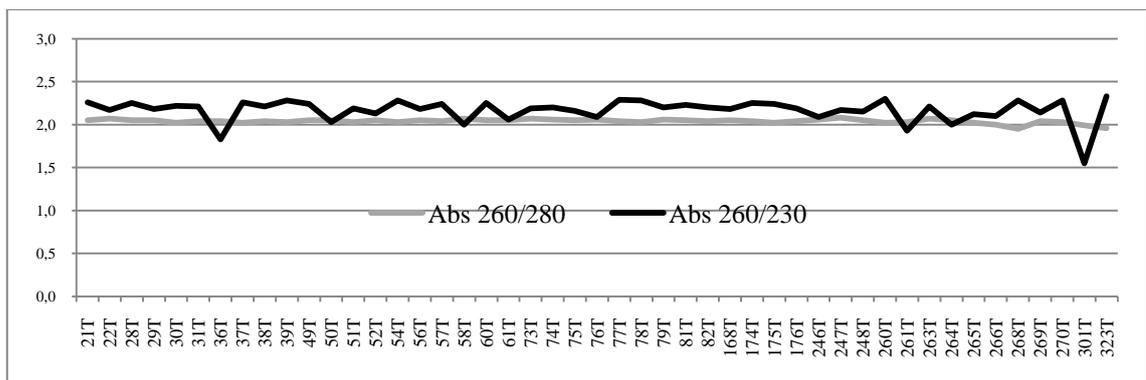
### 4.1 Estrazione RNA totale

L'estrazione dell'RNA totale non ha presentato problemi di basse rese, in quanto si sono sempre ottenute delle buone concentrazioni con entrambe le matrici utilizzate (Tabella 4-1). Nella stessa tabella sono stati riportati anche gli indici di purezza. Qui di seguito si riportano alcuni grafici relativi ai campioni analizzati (compresi i campioni di controllo) in cui si visualizzano i rapporti 260/280 e 260/230.

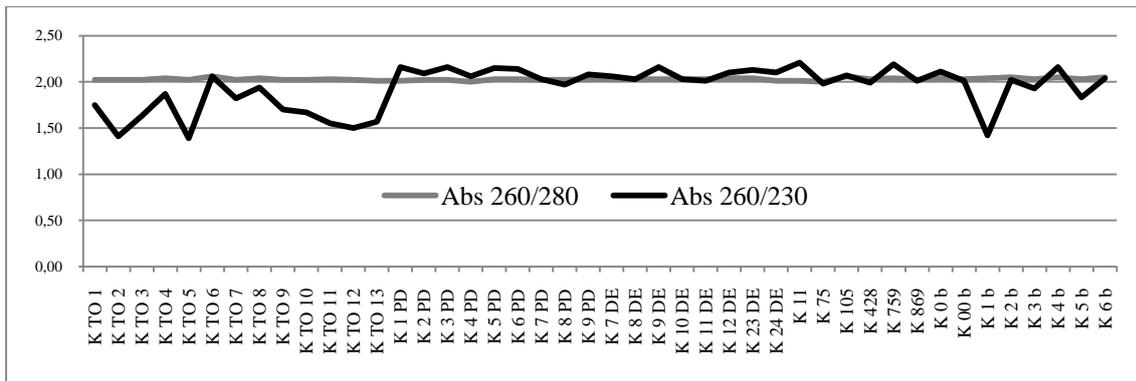
**Figura 4-1:** Grafico dei rapporti delle assorbanze rispettivamente A260/280 e A 260/230 degli estratti totali di RNA relativi ai campioni di fegato.



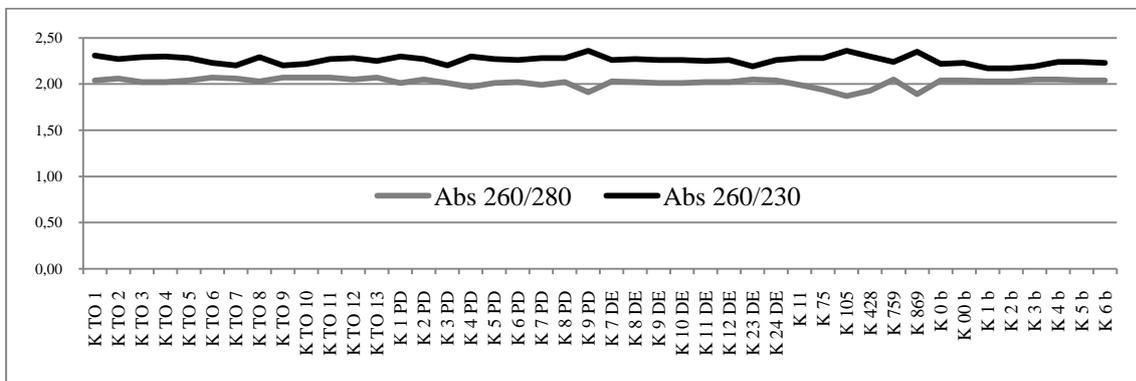
**Figura 4-2:** Grafico dei rapporti delle assorbanze rispettivamente A260/280 e A 260/230 degli estratti totali di RNA relativi ai campioni di testicolo.



**Figura 4-3:** Grafico dei rapporti delle assorbanze rispettivamente A260/280 e A 260/230 degli estratti totali di RNA relativi ai controlli di fegato.



**Figura 4-4:** Grafico dei rapporti delle assorbanze rispettivamente A260/280 e A 260/230 degli estratti totali di RNA relativi ai controlli di testicolo.



Il rapporto Abs 260/280, che indica l'assenza di contaminazioni proteiche e in parte anche da reagenti utilizzati per l'estrazione (che hanno due picchi di assorbimento a 230 nm e a 280 nm), mostra per entrambi i tessuti valori pari a circa 2 con variazioni accettabili. Diverso è il discorso per quanto riguarda il rapporto A260/230. Dai grafici si evince che, in particolar modo per il fegato (Figura 4-1), i campioni si discostano dal *range* ideale. La possibile contaminazione da reagenti può tuttavia essere esclusa, poiché il rapporto A260/280 non risulta alterato (Thermo Scientific, 2009).

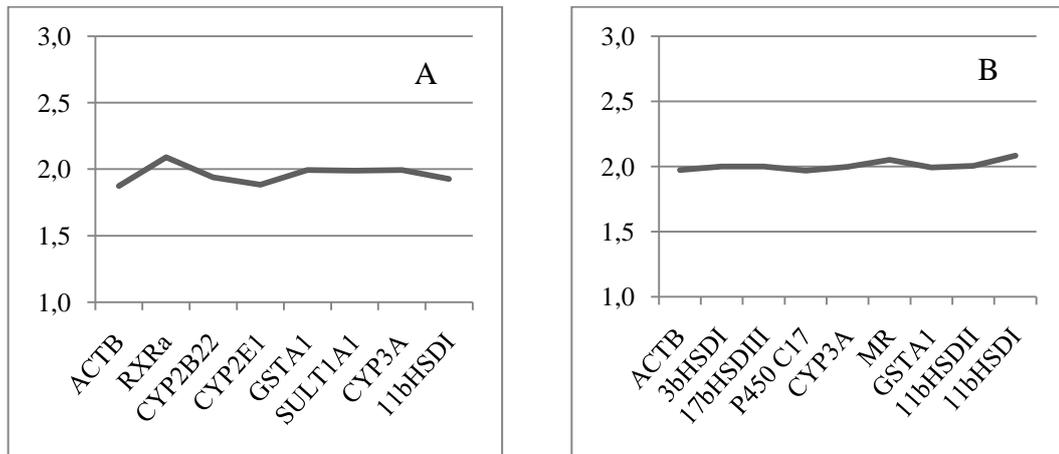
Nei grafici riportati nella Figura 4-5A e B vengono riportate, per ciascun tessuto, le efficienze di amplificazione dei saggi di qRT-PCR. Poiché l'efficienza ottenuta è sempre risultata essere prossima al 100%, si può ragionevolmente supporre che i valori di assorbanza ottenuti possano essere dovuti alla presenza di altri fattori di contaminazione preesistenti nel campione (ad esempio contaminazioni da *RNA later*) o, eventualmente, alla natura stessa del tessuto. In ogni caso l'efficacia dell'analisi non viene pregiudicata.

ID	Sesso	Fegato			Testicolo		
		Concentrazione RNA totale [ng/μl]	A260/280	A260/230	Concentrazione RNA totale [ng/μl]	A260/280	A260/230
21	M	1427.94	2.01	1.90	1252.17	2.05	2.26
22	M	1283.49	2.02	1.79	1261.99	2.07	2.17
28	M	1486.04	2.01	1.82	1069.63	2.05	2.25
29	M	1006.84	2.08	1.98	839.28	2.05	2.18
30	M	1314.45	2.06	1.92	878.14	2.02	2.22
31	M	976.24	2.05	1.73	1110.93	2.04	2.21
36	M	1126.48	2.07	1.94	620.17	2.04	1.83
37	M	1189.22	2.05	1.56	1043.09	2.02	2.26
38	M	806.73	2.00	1.76	1120.78	2.04	2.21
39	M	799.74	1.97	1.53	1191.68	2.03	2.28
45	F	1079.03	2.03	2.05			
46	F	1142.89	2.03	2.05			
48	F	1113.12	1.92	1.84			
49	M	1735.24	2.03	2.05	1893.81	2.05	2.24
50	M	984.33	2.03	2.05	1744.33	2.05	2.03
51	M	713.03	1.99	1.90	931.88	2.03	2.19
52	M	1072.17	2.00	1.87	1389.24	2.05	2.13
54	M	1227.13	2.00	1.72	1267.93	2.03	2.28
56	M	1189.4	1.96	1.32	1347.01	2.05	2.18
57	M	1219.19	1.97	1.33	1068.23	2.04	2.24
58	M	1055.16	2.01	1.94	1200.77	2.07	2
60	M	1039.44	2.02	1.93	1755.18	2.05	2.25
61	M	1016.72	2.02	1.81	1124.94	2.05	2.06
64	F	1018.91	1.99	1.47			
65	F	1561.34	2.02	1.62			
66	F	839.41	2.01	1.92			
73	M	936.97	2.01	1.77	1156.04	2.07	2.19
74	M	951.91	2.01	1.91	1363.39	2.06	2.2
75	M	959.33	2.01	1.96	1286.84	2.05	2.16
76	M	980.07	2.04	2.23	1205.27	2.06	2.09
77	M	1455.11	2.04	2.04	1336.70	2.04	2.29
78	M	1305.15	2.06	2.27	1194.75	2.03	2.28
79	M	717.72	2.05	2.54	1525.97	2.06	2.2
81	M	1148.55	2.06	2.33	1272.17	2.05	2.23
82	M	1350.72	2.03	2.11	1121.69	2.04	2.2
137	F	1323.20	2.05	2.11			
138	F	1403.55	2.02	1.89			
139	F	1378.60	2.03	2.02			
168	M	1296.65	2.02	1.78	1988.13	2.05	2.18
174	M	1257.55	2.00	1.49	1275.43	2.04	2.25
175	M	1538.78	2.01	1.64	923.95	2.02	2.24
176	M	1236.67	2.01	1.83	1419.75	2.04	2.19
236	F	924.16	2.03	1.99			
246	M	1196.76	2.04	2.03	1580.32	2.06	2.09
247	M	1074.30	2.01	2.13	901.54	2.08	2.17
248	M	1472.58	2.03	2.10	1883.71	2.05	2.15
250	F	1178.78	2.03	2.16			
260	M	1003.43	2.03	2.23	1289.95	2.02	2.3
261	M	1225.57	2.03	2.07	1058.63	2.03	1.93
263	M	1264.30	2.04	2.12	990.22	2.07	2.21
264	M	692.86	2.00	2.07	789.15	2.05	2
265	M	1143.80	2.02	2.14	489.45	2.02	2.12
266	M	845.27	2.01	2.10	562.10	2	2.1
268	M	995.32	2.02	2.09	628.10	1.95	2.28
269	M	1088.96	2.03	2.13	724.03	2.04	2.14
270	M	885.57	2.02	2.09	1169.12	2.03	2.28
301	M	654.49	2.00	2.09	421.28	1.99	1.55
323	M	922.92	2.01	2.10	654.99	1.96	2.33
373	F	913.27	2.01	1.95			
<b>Totale maschi</b>			<b>47</b>			<b>47</b>	
<b>Totale femmine</b>			<b>12</b>			<b>--</b>	
<b>Totale</b>			<b>59</b>			<b>47</b>	

ID	Sesso	Fegato			Testicolo		
		Concentrazione RNA totale [ng/μl]	A260/280	A260/230	Concentrazione RNA totale [ng/μl]	A260/280	A260/230
K TO 1	M	1199.63	2.02	1.75	874.25	2.04	2.31
K TO 2	M	1328.15	2.02	1.41	1139.06	2.06	2.27
K TO 3	M	1249.92	2.02	1.63	904.3	2.02	2.29
K TO 4	M	1139.79	2.04	1.87	823.28	2.02	2.3
K TO 5	M	1156.78	2.02	1.39	864.62	2.04	2.28
K TO 6	M	542.2	2.06	2.06	714.26	2.07	2.23
K TO 7	M	956.59	2.02	1.82	842.33	2.06	2.2
K TO 8	M	1097.79	2.04	1.94	939.17	2.03	2.29
K TO 9	M	1063.53	2.02	1.70	902.14	2.07	2.2
K TO 10	M	1134.98	2.02	1.67	834.42	2.07	2.22
K TO 11	M	914.81	2.03	1.55	1207.44	2.07	2.27
K TO 12	M	1208.91	2.02	1.5	888.32	2.05	2.28
K TO 13	M	1238.89	2.01	1.57	1066.75	2.07	2.25
K 1 PD	M	678.49	2.01	2.16	584.37	2.01	2.3
K 2 PD	M	1145.43	2.02	2.09	922.67	2.05	2.27
K 3 PD	M	876.89	2.02	2.16	808.29	2.01	2.2
K 4 PD	M	998.88	2.00	2.06	618.05	1.97	2.3
K 5 PD	M	1055.77	2.03	2.15	687.3	2.01	2.27
K 6 PD	M	1224.74	2.03	2.14	644.83	2.02	2.26
K 7 PD	M	891.74	2.02	2.03	577.18	1.99	2.28
K 8 PD	M	994.02	2.02	1.97	653.29	2.02	2.28
K 9 PD	M	1077.5	2.03	2.08	304.03	1.91	2.36
K 7 DE	M	1547.18	2.03	2.06	788.09	2.03	2.26
K 8 DE	M	1259.05	2.03	2.03	796.63	2.02	2.27
K 9 DE	M	1026.26	2.03	2.16	730.41	2.01	2.26
K 10 DE	M	1068.99	2.03	2.03	622.71	2.01	2.26
K 11 DE	M	1147.89	2.03	2.01	788	2.02	2.25
K 12 DE	M	1272.16	2.04	2.10	781.46	2.02	2.26
K 23 DE	M	1189.43	2.04	2.13	321.55	2.05	2.19
K 24 DE	M	884.33	2.01	2.10	1020.01	2.04	2.26
K 11	M	984.68	2.01	2.21	586.37	1.99	2.28
K 75	M	1243.51	2.00	1.98	543.29	1.94	2.28
K 105	M	1168.97	2.06	2.07	378.36	1.87	2.36
K 428	M	1104.76	2.03	1.99	582.4	1.93	2.3
K 759	M	1102.83	2.04	2.19	1100.89	2.05	2.24
K 869	M	1016.63	2.02	2.01	390.5	1.89	2.35
K 0 b	M	1122.86	2.04	2.11	878.07	2.04	2.22
K 00 b	M	951.61	2.03	2.01	850.07	2.04	2.23
K 1 b	M	912.03	2.04	1.42	927.53	2.03	2.17
K 2 b	M	948.77	2.05	2.02	906.83	2.03	2.17
K 3 b	M	1165.37	2.03	1.93	1067.35	2.05	2.19
K 4 b	M	1061.18	2.05	2.16	1197.16	2.05	2.24
K 5 b	M	1238.46	2.03	1.83	1189.39	2.04	2.24
K 6 b	M	1325.32	2.05	2.04	1179.19	2.04	2.23
<b>Totale</b>			<b>44</b>			<b>44</b>	

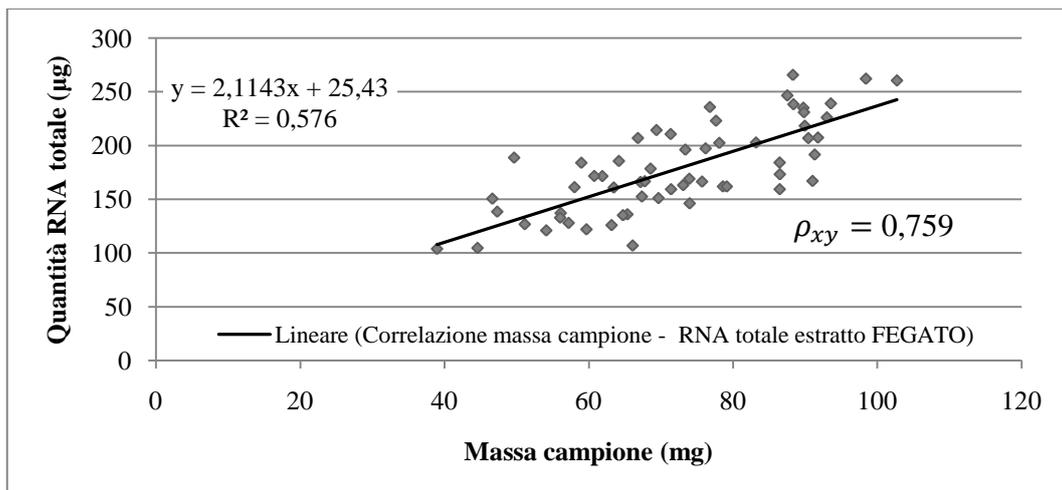
**Tabella 4-1:** Caratteristiche quali-quantitative degli estratti di RNA dei campioni analizzati (sia di fegato che di testicolo) ottenute dalla lettura con spettrofotometro Nanodrop: concentrazione del campione (RNA [ng/μl]) e indici di purezza (rapporti tra le assorbanze A260/280 e A260/230).

**Figura 4-5:** Efficienza di amplificazione, per ogni saggio, ottenuta dalle curve standard eseguite sul campione rappresentativo di fegato (A) e sul testicolo (B) durante la fase validazione dei saggi utilizzati nello studio di espressione genica.



L'applicazione dell'indice di correlazione di Pearson, definito come covarianza di due variabili divisa per il prodotto delle deviazioni standard ( $\rho_{xy} = \frac{\sigma_{xy}}{\sigma_x \sigma_y}$ ), ha portato a dire che in entrambi i tessuti le variabili peso del campione e quantità di RNA totale estratto sono direttamente correlate ( $\rho_{xy} > 0$ ) e nello specifico che nel fegato la correlazione è forte ( $\rho_{xy} > 0,7$ ), mentre nel testicolo è debole ( $0,3 < \rho_{xy} < 0,7$ ) (Wikipedia, 2011). Gli indici sono riportati nei rispettivi grafici (Figura 4-6 e 4-7).

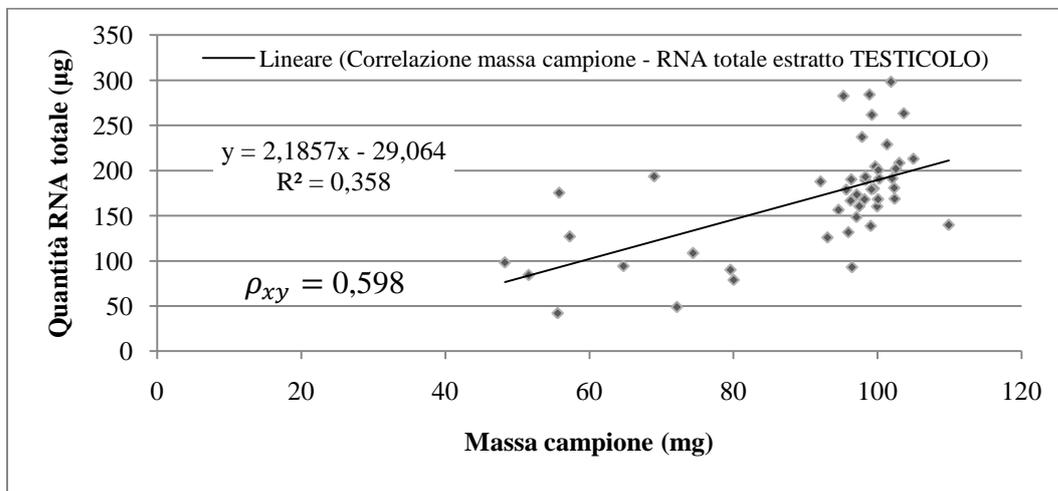
**Figura 4-6:** Correlazione tra massa del campione utilizzata in estrazione (mg) e la quantità totale di RNA ottenuta dai campioni di fegato (µg). Nel fegato queste due variabili presentano una correlazione positiva forte.



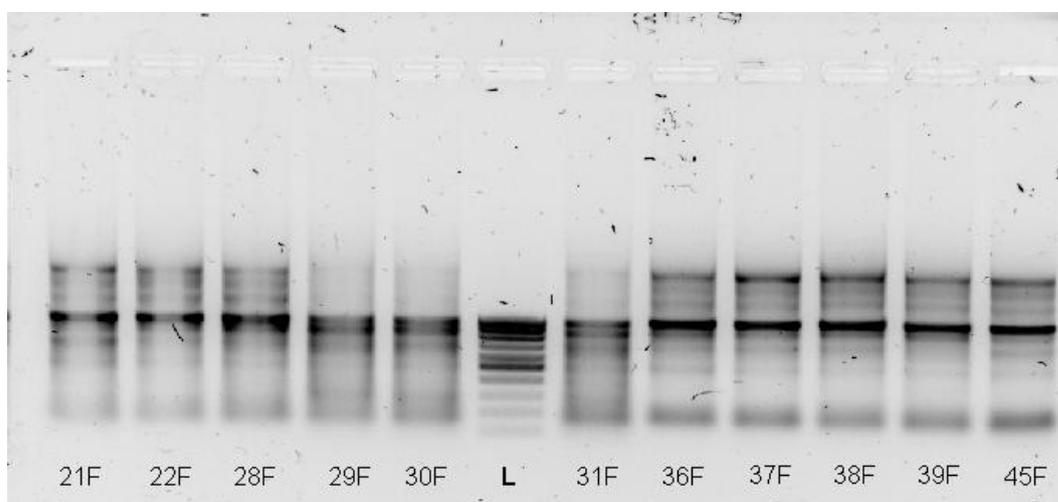
La maggiore dispersione dei campioni di testicolo (Figura 4-7) può essere dovuta alla differente composizione istologica del campione pur avendo cercato di standardizzare le modalità di prelievo, come indicato al capitolo 3. Inoltre a differenza

dei campioni dell'altro tessuto, si sono dovuti utilizzare campioni di massa inferiore, ma si è conservata la proporzionalità tra massa del campione e quantità di RNA totale estratto.

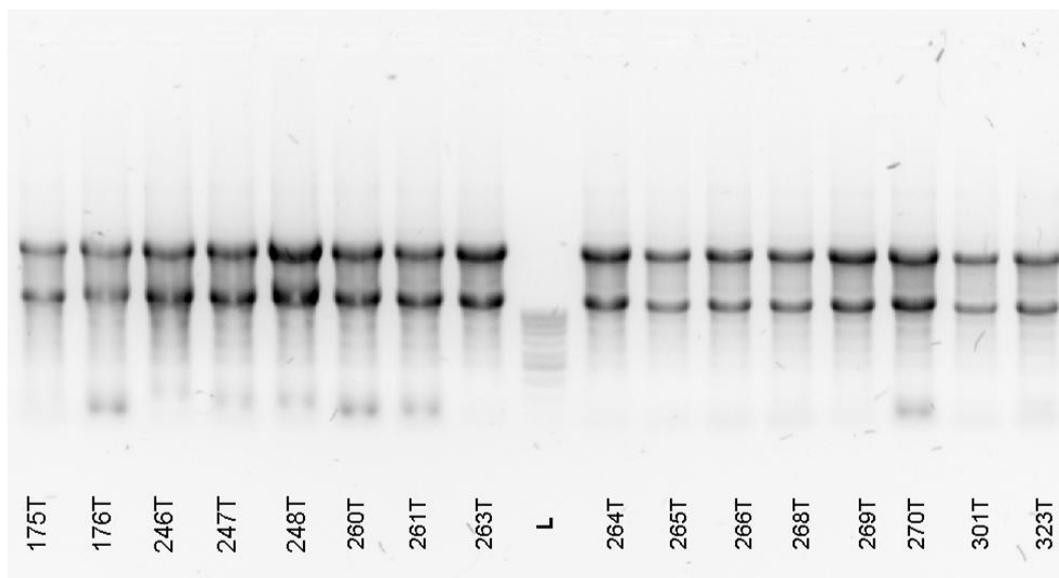
**Figura 4-7:** Correlazione tra massa del campione utilizzata in estrazione (mg) e la quantità totale di RNA ottenuta dai campioni di testicolo (µg). Nel testicolo queste due variabili presentano una correlazione positiva debole.



L'elettroforesi in gel di agarosio 1% (di cui un esempio viene riportato nelle Figure 4-8 e 4-9) ha confermato l'ottenimento di un estratto molto concentrato, che non presenta bande ascrivibili a DNA genomico e mostra una buona rifrangenza delle bande 28S e 18S, anche se non tutti i campioni hanno mostrato un rapporto ottimale tra queste ultime. La presenza di una piccola banda 5S e gli evidenti segni di *scaling* sono da attribuirsi principalmente all'elevata concentrazione dell'estratto ottenuto. Ci si è trovati, pertanto, nelle migliori condizioni per poter proseguire nell'analisi; tuttavia, anche in caso di qualità non ottimale dell'estratto è possibile ovviare a questa lacuna (Schoor, et al., 2003; Fleige, et al., 2006), e ottenere dei saggi efficienti



**Figura 4-8:** Elettroforesi in agarosio 1% (ottenuta con l'acquisitore di immagini Gel Doc™ XR+, Bio-Rad Laboratories, Inc.) di alcuni estratti di RNA totale da campioni di fegato.



**Figura 4-9:** Elettroforesi in agarosio 1% (ottenuta con l'acquisitore di immagini Gel Doc™ XR+, Bio-Rad Laboratories, Inc.) di alcuni estratti di RNA totale da campioni di testicolo.

In ogni caso, l'importanza di avere un RNA che sia integro aumenta con l'aumentare della lunghezza degli ampliconi che si vogliono ottenere: con ampliconi di circa 100 bp l'esito dell'amplificazione è indipendente dall'integrità del filamento (Fleige, et al., 2006). Poiché nemmeno l'efficienza della PCR viene meno in presenza di un RNA frammentato, si può affermare quindi che anche un RNA parzialmente degradato può essere utilizzato per ottenere risultati affidabili, a patto che si rispettino le condizioni precedentemente elencate e se si evitano gli sbalzi termici.

## 4.2 Validazione dei saggi

Nella fase iniziale dello studio, sono state allestite piastre di prova in cui il *pool* di cDNA è stato analizzato con quattro combinazioni di concentrazioni (nM) di *primer forward* e *reverse* (300 – 300; 300 – 600; 600 – 300; 600 – 600) e due concentrazioni di sonde (100 e 200 nM), al fine di ottimizzare l'efficienza dei saggi. Una volta ottenuti i Cp, sono state selezionate le combinazioni che producevano il Cp più anticipato e su queste sono state effettuate ulteriori analisi. Le combinazioni utilizzate sono riportate in Tabella 3–7.

Durante la progettazione dei saggi, è risultata particolarmente problematica la situazione relativa ad un gene: il citocromo P450 3A28 (CYP3A28), omologo del CYP3A4 in uomo, che rappresenta l'isoforma principalmente coinvolta nel metabolismo epatico degli xenobiotici. In particolare, è risultato difficile disegnare un

saggio specifico in grado di discriminare le diverse isoforme di CYP3A, poiché queste differiscono nella sequenza per pochi nucleotidi ed informazioni precise riguardo il bovino non sono ancora disponibili. Poiché non è stato possibile elaborare un saggio di qPCR efficiente e che fosse realmente discriminante (venivano disattesi alcuni prerequisiti fondamentali quali l'esclusione di DNA genomico e la lunghezza di circa 100 bp degli ampliconi), è stato progettato un saggio denominato "CYP3A" che identifica variazioni nei profili di espressione delle principali isoforme di CYP3A, in particolare CYP3A4, 3A5 E 3A7. Essendo quest'ultimo un saggio diverso rispetto a quelli eseguiti precedentemente, non è stato possibile confrontare i dati qui ottenuti con quelli presenti in letteratura. È tuttavia presumibile le isoforme diverse dal CYP3A4 abbiano scarsa o nulla influenza sulla magnitudo dei dati ottenuti, stante la maggior rilevanza del CYP3A4 nel metabolismo degli xenobiotici (You, 2004).

Successivamente alle operazioni descritte al paragrafo 3.4.3, si ottengono i valori di Cp dell'analisi e su questi vengono applicate le normalizzazioni, secondo quanto descritto al paragrafo 3.4.4.1 che portano ad ottenere i valori di RQ riportati in appendice. In tabella 4-2 e 4-3 sono state calcolate le medie e le deviazioni standard degli RQ considerando gli animali raggruppati sulla base dell'appartenenza allo stesso gruppo di allevamento (partita, per i campioni, o esperimento, per i controlli).

**Tabella 4-2:** Medie e deviazioni standard considerando ogni partita per ogni saggio del fegato. La media del gruppo e la relativa deviazione standard sono calcolate sugli RQ.  
 Legenda: Grp = partita; ID = codice campione; S = sesso.

FEGATO			2B22		GSTA1		11bHSD1		CYP2E1		SULT1A1		RXRa		CYP3A		
Grp	ID	S	RQ		RQ		RQ		RQ		RQ		RQ		RQ		
5	21	M	0.751	0.376	0.570	15.475	2.713	2.455	1.117	0.675	10.56	6.288	5.169	3.411	2.621	1.612	Media
	22	M	0.001	0.531	30.379	21.078	2.196	0.366	0.232	0.626	2.02	6.035	1.653	2.487	0.603	1.427	Dev. St
7	28	M	0.003	0.268	37.014	35.845	2.603	2.604	0.087	0.780	3.23	3.889	2.603	2.226	0.889	0.690	Media
	29	M	1.029	0.508	46.366	15.002	4.485	1.362	1.177	0.553	5.30	2.059	2.471	0.520	0.901	0.282	Dev. St
	30	M	0.039		45.728		2.021		1.270		5.76		2.370		0.674		
	31	M	0.001		14.271		1.306		0.584		1.28		1.459		0.297		
9	36	M	0.000	0.193	4.028	36.134	0.807	1.604	0.637	0.733	3.23	2.588	1.636	1.627	2.428	1.781	Media
	37	M	0.093	0.253	63.779	24.576	0.787	0.972	0.519	0.287	0.80	1.236	0.601	0.725	0.259	1.409	Dev. St
	38	M	0.565		40.224		2.751		1.157		2.77		2.173		3.411		
	39	M	0.114		36.504		2.071		0.620		3.56		2.099		1.028		
11	45	F	1.474	1.474	29.041	29.041	1.636	1.636	1.320	1.320	2.43	2.428	1.133	1.133	0.518	0.518	
12	46	F	0.176	0.300	33.942	103.794	1.759	2.172	2.370	3.682	1.86	4.068	1.324	2.747	0.451	3.194	Media
	48	F	0.425	0.176	173.645	98.785	2.585	0.584	4.993	1.855	6.28	3.123	4.170	2.012	5.938	3.880	Dev. St
13	49	M	0.642	0.140	18.189	36.786	1.688	1.680	1.747	0.934	2.35	2.508	0.898	1.379	1.986	1.270	Media
	50	M	0.008	0.250	32.000	26.492	1.125	0.324	1.102	0.592	2.14	0.692	0.835	0.548	1.778	0.579	Dev. St
	51	M	0.003		66.028		1.542		1.010		2.61		1.061		0.358		
	52	M	0.004		0.486		2.000		0.145		2.04		2.250		1.310		
	246	M	0.105		36.127		1.979		0.355		3.85		1.641		1.028		
	247	M	0.079		67.884		1.747		1.244		2.05		1.586		1.157		
14	54	M	0.041	0.543	48.671	33.312	3.399	2.533	0.017	0.463	3.49	2.642	2.505	2.313	1.986	1.864	Media
	56	M	1.674	0.714	31.450	15.961	3.797	1.174	0.086	0.614	2.58	1.137	2.594	1.240	0.717	0.680	Dev. St
	57	M	0.172		47.340		2.858		0.013		4.01		4.127		2.497		
	248	M	0.824		9.448		1.157		0.824		1.22		1.434		1.919		
	250	F	0.004		29.651		1.454		1.376		1.91		0.908		2.204		

FEGATO			2B22		GSTA1		11bHSD1		CYP2E1		SULT1A1		RXRa		CYP3A		
Grp	ID	S	RQ		RQ		RQ		RQ		RQ		RQ		RQ		
15	58	M	0.001	0.001	152.747	75.260	1.459	1.645	0.151	0.148	2.72	4.767	1.772	1.053	1.395	2.708	Media
	60	M	0.000	0.000	50.563	68.560	1.828	0.184	0.206	0.060	9.06	3.722	0.737	0.624	4.823	1.850	Dev. St
	61	M	0.000		22.471		1.647		0.086		2.51		0.651		1.905		
17	64	F	0.061	1.859	20.606	17.932	3.021	2.132	3.519	2.189	6.39	4.276	2.918	1.985	2.713	1.789	Media
	65	F	0.078	3.578	34.297	12.786	2.888	1.079	3.482	1.636	6.50	2.683	1.866	0.679	0.785	1.286	Dev. St
	260	M	0.070		4.272		0.685		0.119		0.92		1.288		0.586		
	261	M	7.225		12.553		1.932		1.636		3.29		1.866		3.074		
18	66	F	0.270	0.186	18.063	13.696	2.523	1.288	2.630	0.712	2.03	2.823	1.490	1.454	0.895	1.245	Media
	263	M	0.010	0.254	16.056	6.498	1.091	0.741	0.462	1.094	1.98	0.837	1.886	0.548	1.693	0.378	Dev. St
	264	M	0.054		9.815		0.898		0.004		2.76		1.500		1.050		
	265	M	0.000		20.182		1.333		0.434		3.80		1.860		0.973		
	266	M	0.597		4.362		0.597		0.031		3.54		0.534		1.613		
22	73	M	0.100	0.471	38.720	74.811	1.784	1.778	0.730	0.709	1.54	3.574	0.874	1.447	6.498	3.098	Media
24	74	M	0.002	1.018	2.114	114.241	0.683	1.073	0.371	0.551	0.86	3.649	0.763	0.859	0.441	1.364	Dev. St
	75	M	0.013		41.643		1.815		0.398		3.78		1.670		2.378		
	76	M	1.771		216.767		2.828		1.338		8.11		2.479		3.074		
25	77	M	0.001	0.162	21.185	29.786	2.166	1.535	0.292	0.612	1.40	1.697	2.007	1.308	1.064	3.213	Media
	78	M	0.154	0.166	36.504	7.831	0.774	0.705	1.050	0.392	1.46	0.460	1.050	0.612	7.621	3.818	Dev. St
	79	M	0.331		31.669		1.664		0.495		2.23		0.868		0.953		
26	81	M	0.262	0.237	8.664	26.189	2.648	1.931	0.200	0.715	3.62	2.615	1.821	1.570	2.603	2.322	Media
	82	M	0.213	0.035	43.713	24.784	1.214	1.014	1.231	0.729	1.61	1.417	1.320	0.355	2.042	0.396	Dev. St
42	137	F	1.545	0.826	11.713	35.817	1.110	1.269	2.204	2.492	1.77	2.446	0.966	0.948	1.959	1.874	Media
	138	F	0.106	1.018	59.921	34.089	1.429	0.226	2.780	0.407	3.13	0.963	0.930	0.026	1.790	0.119	Dev. St

FEGATO			2B22		GSTA1		11bHSD1		CYP2E1		SULT1A1		RXRa		CYP3A		
Grp	ID	S	RQ		RQ		RQ		RQ		RQ		RQ		RQ		
<b>43</b>	139	F	3.916	3.916	165.421	165.421	2.346	2.346	2.732	2.732	4.11	4.112	1.404	1.404	3.031	3.031	
	168	M	0.001	0.026	134.364	55.186	0.758	1.626	3.010	2.292	2.06	2.864	1.079	1.674	0.543	2.595	Media
<b>53</b>	174	M	0.005	0.045	12.424	54.282	1.479	0.783	2.471	0.640	3.33	0.591	2.181	0.530	4.823	1.815	Dev. St
	175	M	0.005		43.261		1.608		1.469		3.28		1.380		3.095		
	176	M	0.094		30.696		2.657		2.219		2.79		2.056		1.919		
<b>10</b>	236	F	0.235	0.235	29.857	29.857	0.732	0.732	2.028	2.028	1.36	1.357	0.914	0.914	5.169	5.169	
	268	M	0.414	0.312	20.112	16.137	1.275	1.473	0.158	0.533	3.01	1.924	0.616	1.277	2.990	1.223	Media
<b>19</b>	269	M	0.340	0.119	1.390	13.216	0.505	1.081	0.111	0.690	0.76	1.127	0.465	1.279	0.248	1.532	Dev. St
	270	M	0.182		26.909		2.639		1.329		2.00		2.751		0.432		
<b>27</b>	301	M	1.513	1.513	39.947	39.947	1.197	1.197	0.184	0.184	1.96	1.959	1.257	1.257	2.071	2.071	
<b>32</b>	323	M	0.561	0.561	17.328	17.328	0.963	0.963	0.037	0.037	1.70	1.699	1.297	1.297	1.057	1.057	
<b>45</b>	373	F	1.286	1.286	32.223	32.223	1.181	1.181	1.986	1.986	2.25	2.250	1.790	1.790	2.297	2.297	
	K TO 1	M	0.046	0.297	1.266	1.718	0.927	0.942	0.079	0.275	1.39	1.581	0.841	1.026	1.376	1.192	Media
	K TO 2	M	0.471	0.311	0.664	1.409	1.385	0.282	0.295	0.203	2.30	0.457	0.774	0.290	1.094	0.311	Dev. St
	K TO 3	M	0.054		1.414		0.959		0.354		1.40		1.558		1.110		
	K TO 4	M	0.001		2.395		0.543		0.268		1.48		1.014		1.072		
	K TO 5	M	0.004		2.099		1.283		0.206		1.58		0.953		1.548		
	K TO 6	M	0.785		1.464		0.914		0.060		1.64		1.206		1.087		
	K TO 7	M	0.117		1.495		0.895		0.398		1.46		1.385		1.000		
	K TO 8	M	0.462		0.693		0.779		0.209		1.56		0.853		1.516		
	K TO 9	M	0.000		1.474		0.901		0.871		1.44		1.087		1.181		
	K TO 10	M	0.070		1.395		0.669		0.173		1.29		0.812		1.214		
	K TO 11	M	0.392		1.028		1.021		0.179		1.04		0.693		0.920		
	K TO 12	M	0.815		0.847		0.559		0.212		1.22		0.717		0.582		
	K TO 13	M	0.642		6.105		1.414		0.275		2.75		1.444		1.803		

ViteLLoni di razza Frisona

FEGATO			2B22		GSTA1		11bHSD1		CYP2E1		SULT1A1		RXRa		CYP3A		
Grp	ID	S	RQ		RQ		RQ		RQ		RQ		RQ		RQ		
Vitelloni di razza Marchigiana	K 1 PD	M	3.458	0.970	0.859	0.798	0.532	0.668	0.209	0.280	1.56	1.088	0.807	0.705	1.292	0.961	Media
	K 2 PD	M	0.050	1.234	0.503	0.351	0.435	0.228	0.187	0.223	0.57	0.470	0.603	0.187	0.366	0.391	Dev. St
	K 3 PD	M	0.090		1.110		1.110		0.551		1.31		0.732		1.165		
	K 4 PD	M	0.043		0.395		0.493		0.104		0.59		0.448		0.429		
	K 5 PD	M	0.275		1.320		0.895		0.001		1.97		0.901		1.444		
	K 6 PD	M	2.532		1.248		0.841		0.420		1.25		1.050		1.310		
	K 7 PD	M	0.883		0.521		0.518		0.013		0.84		0.624		1.057		
	K 8 PD	M	1.165		0.693		0.555		0.543		0.83		0.607		0.883		
	K 9 PD	M	0.232		0.532		0.637		0.486		0.87		0.574		0.702		
Vitelloni incroci di razze francesi da carne	K 7 DE	M	1.125	1.537	0.674	1.701	0.908	1.135	0.432	0.523	0.74	1.153	0.511	1.343	0.616	1.376	Media
	K 8 DE	M	2.713	1.469	2.676	0.744	1.057	0.337	0.768	0.411	1.23	0.272	1.853	0.510	0.933	0.571	Dev. St
	K 9 DE	M	1.320		1.257		0.871		0.590		0.95		1.223		1.329		
	K 10 DE	M	2.071		2.888		0.933		0.074		1.29		1.932		2.158		
	K 11 DE	M	0.310		1.569		1.526		0.321		1.53		1.366		2.099		
	K 12 DE	M	4.377		1.705		1.569		1.395		1.30		1.329		1.117		
	K 23 DE	M	0.304		1.636		1.485		0.356		1.33		1.765		1.765		
	K 24 DE	M	0.077		1.206		0.732		0.245		0.85		0.768		0.986		
Vitelloni di razza Valdostana	K 11	M	0.131	0.184	1.495	0.985	0.979	0.862	0.164	0.345	1.21	1.035	0.973	1.036	1.087	0.956	Media
	K 75	M	0.444	0.163	1.548	0.560	1.240	0.469	1.434	0.536	1.46	0.596	1.682	0.634	1.424	0.508	Dev. St
	K 105	M	0.079		0.371		0.511		0.103		0.75		0.607		0.543		
	K 428	M	0.071		0.758		0.683		0.165		0.54		0.674		0.678		
	K 759	M	0.048		0.351		0.252		0.027		0.34		0.351		0.369		
	K 869	M	0.328		1.385		1.505		0.178		1.91		1.932		1.636		
Vitelloni di incroci di razze da carne	K 0 b	M	0.340	0.335	0.722	0.927	0.829	0.859	0.319	0.958	1.32	1.145	1.357	1.374	1.765	1.500	Media
	K 00 b	M	0.018	0.398	0.574	0.346	0.829	0.276	0.940	0.352	1.35	0.398	1.717	0.330	1.157	0.543	Dev. St
	K 1 b	M	0.088		0.824		0.853		1.181		1.32		1.526		2.129		
	K 2 b	M	0.024		0.959		0.853		1.414		1.25		1.693		1.569		
	K 3 b	M	0.444		1.717		1.357		0.973		1.77		1.474		1.803		
	K 4 b	M	0.138		0.737		0.620		0.768		0.66		1.464		1.173		
	K 5 b	M	1.227		0.914		1.087		1.310		0.93		0.959		1.945		
	K 6 b	M	0.399		0.966		0.441		0.763		0.57		0.801		0.460		

**Tabella 4-3** Medie e deviazioni standard considerando ogni partita per ogni saggio del testicolo. La media del gruppo e la relativa deviazione standard sono calcolate sugli RQ.  
 Legenda: Grp = partita; ID = codice campione; S = sesso.

TESTICOLO		HSD3B		HSD17B3		CYP 17		CYP 3A		MR		GSTA1		HSD11B1		HSD11B2		
Grp	ID	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	
5	21	0.865	0.883	1.434	1.475	0.578	0.516	3.580	2.915	0.959	1.012	1.165	0.977	0.529	0.477	0.993	0.970	Media
	22	0.901	0.026	1.516	0.058	0.454	0.088	2.250	0.940	1.064	0.074	0.790	0.265	0.426	0.072	0.946	0.033	Dev. St
7	28	0.595	0.560	0.559	0.708	0.361	0.453	2.514	1.916	0.722	0.532	0.859	1.475	0.727	0.443	0.339	0.306	Media
	29	0.737	0.182	0.901	0.352	0.603	0.135	1.778	0.444	0.476	0.175	2.204	0.847	0.164	0.283	0.299	0.029	Dev. St
	30	0.603		1.079		0.319		1.919		0.611		2.204		0.238		0.314		
	31	0.306		0.291		0.529		1.454		0.316		0.633		0.644		0.270		
9	36	0.595	1.303	0.774	0.952	0.451	0.894	2.000	4.114	0.586	0.601	1.000	1.601	0.212	0.354	0.599	0.440	Media
	37	0.829	1.116	1.257	0.242	0.586	0.444	12.295	5.506	0.669	0.051	1.526	0.448	0.429	0.127	0.285	0.128	Dev. St
	38	0.818		1.035		1.173		0.321		0.603		1.879		0.488		0.432		
	39	2.969		0.742		1.366		1.840		0.547		2.000		0.287		0.444		
13	49	1.434	1.634	1.329	1.102	1.157	1.657	9.918	3.681	2.144	1.151	1.338	1.484	0.371	0.590	0.712	0.441	Media
	50	1.853	0.839	0.889	0.348	1.266	1.226	1.558	3.291	1.042	0.513	1.141	0.788	1.444	0.438	0.678	0.208	Dev. St
	51	0.540		0.785		0.595		3.605		0.712		0.616		0.551		0.262		
	52	1.007		0.768		0.540		4.028		1.189		1.007		0.564		0.356		
	246	2.042		1.636		3.138		0.774		0.979		2.789		0.213		0.418		
	247	2.928		1.206		3.249		2.204		0.841		2.014		0.395		0.222		
14	54	0.551	1.119	0.796	0.608	0.683	0.665	3.706	2.343	0.707	0.748	0.607	0.805	0.354	0.337	0.281	0.321	Media
	56	0.901	0.809	0.629	0.326	1.057	0.284	2.751	1.532	1.035	0.243	0.959	0.229	0.379	0.087	0.451	0.089	Dev. St
	57	0.712		0.865		0.507		2.770		0.448		0.611		0.405		0.253		
	248	2.313		0.142		0.415		0.144		0.801		1.042		0.211		0.297		
15	58	1.035	0.917	0.829	1.318	0.801	0.602	4.112	2.978	1.042	0.747	0.603	1.103	0.428	0.402	0.486	0.475	Media
	60	0.914	0.117	1.454	0.437	0.497	0.173	3.031	1.162	0.688	0.271	1.526	0.467	0.330	0.063	0.582	0.114	Dev. St
	61	0.801		1.670		0.507		1.790		0.511		1.181		0.448		0.356		
17	260	1.485	1.883	1.000	1.564	0.883	1.215	2.532	2.308	1.072	1.068	2.042	1.904	0.277	0.379	0.398	0.567	Media
	261	2.282	0.564	2.129	0.798	1.548	0.470	2.085	0.316	1.064	0.005	1.765	0.196	0.481	0.144	0.737	0.240	Dev. St
18	263	0.927	1.631	1.173	1.462	0.818	1.208	1.636	1.694	1.357	0.868	1.266	1.172	0.717	0.551	0.570	0.543	Media
	264	3.605	1.328	1.602	0.614	3.010	1.212	0.940	0.652	1.057	0.412	1.803	0.476	0.557	0.119	0.801	0.191	Dev. St
	265	1.214		0.824		0.570		1.670		0.486		0.737		0.459		0.374		
	266	0.779		2.250		0.432		2.532		0.570		0.883		0.473		0.426		
19	268	0.979	1.337	1.495	1.464	0.620	1.148	1.087	1.005	0.559	0.658	1.214	2.556	0.993	0.816	0.595	0.555	Media
	269	1.516	0.310	1.959	0.510	0.959	0.644	1.087	0.142	0.683	0.089	3.182	1.163	0.755	0.156	0.543	0.035	Dev. St
	270	1.516		0.940		1.866		0.841		0.732		3.272		0.700		0.529		

Grp	TESTICOLO	HSD3B		HSD17B3		CYP 17		CYP 3A		MR		GSTA1		HSD11B1		HSD11B2		
	ID	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ		
22	73	1.636	1.636	0.669	0.669	1.021	1.021	4.691	4.691	0.986	0.986	1.803	1.803	0.574	0.574	0.441	0.441	
	74	1.613	1.532	1.102	0.902	0.865	0.697	7.674	3.960	0.871	0.674	1.717	1.553	0.595	0.501	0.590	0.377	Media
24	75	1.301	0.203	0.758	0.179	0.651	0.150	3.074	3.360	0.486	0.192	0.785	0.701	0.639	0.202	0.274	0.185	Dev. St
	76	1.682		0.847		0.574		1.133		0.664		2.158		0.270		0.268		
25	77	0.371	0.589	0.543	0.926	0.198	0.396	0.570	0.900	0.607	0.872	0.182	0.959	0.599	0.667	0.409	0.741	Media
	78	0.712	0.189	0.986	0.356	0.555	0.182	1.064	0.285	0.707	0.375	1.347	0.673	0.476	0.233	1.223	0.427	Dev. St
	79	0.683		1.248		0.435		1.064		1.301		1.347		0.927		0.590		
26	81	1.395	1.245	1.125	0.911	0.829	0.832	1.919	1.291	0.993	0.843	1.079	1.519	1.035	0.579	0.590	0.474	Media
	82	1.094	0.212	0.697	0.302	0.835	0.004	0.664	0.887	0.693	0.213	1.959	0.622	0.123	0.645	0.358	0.164	Dev. St
27	301	0.812	0.812	1.338	1.338	0.332	0.332	0.398	0.398	0.877	0.877	2.028	2.028	0.429	0.429	0.480	0.480	
32	323	0.732	0.732	1.165	1.165	1.110	1.110	0.669	0.669	0.543	0.543	0.877	0.877	0.415	0.415	0.339	0.339	
53	168	2.770	1.452	1.693	1.046	2.329	1.275	3.555	2.003	1.189	0.882	3.074	1.335	1.173	0.755	0.753	0.602	Media
	174	1.117	0.890	0.818	0.433	1.558	0.841	1.717	1.205	0.966	0.261	0.940	1.192	0.518	0.287	0.637	0.118	Dev. St
	175	1.102		0.796		0.480		0.642		0.801		0.966		0.662		0.521		
	176	0.818		0.877		0.732		2.099		0.570		0.361		0.667		0.497		
Vitelloni di razza Frisona	K TO 1	1.219	1.085	1.749	1.949	0.092	1.095	0.057	1.327	0.047	0.759	0.131	1.590	0.083	1.034	0.047	0.852	Media
	K TO 2	0.676	0.442	1.939	0.912	4.042	1.432	4.643	1.736	3.376	0.982	5.717	2.052	3.366	1.116	2.716	1.090	Dev. St
	K TO 3	2.093		4.776		0.686		0.715		0.399		0.777		0.704		0.550		
	K TO 4	0.602		0.992		0.562		0.476		0.521		1.063		0.495		0.475		
	K TO 5	1.667		2.185		0.510		0.654		0.503		1.063		1.254		0.491		
	K TO 6	0.930		1.772		2.839		2.576		1.521		4.517		2.089		2.248		
	K TO 7	1.510		1.938		0.076		0.116		0.071		0.159		0.114		0.092		
	K TO 8	0.609		1.992		0.956		2.165		0.898		1.129		1.782		0.761		
	K TO 9	0.804		1.137		0.142		0.180		0.073		0.159		0.122		0.072		
	K TO 10	0.977		1.642		3.695		4.978		1.940		5.083		2.728		3.136		
	K TO 11	0.859		1.921		0.221		0.232		0.215		0.250		0.321		0.205		
	K TO 12	1.110		1.603		0.194		0.165		0.153		0.240		0.176		0.155		
	K TO 13	1.048		1.690		0.222		0.289		0.150		0.378		0.204		0.129		
Vitelloni di razza Marchigiana	K 1 PD	1.019	0.770	2.200	1.351	0.147	0.969	0.429	1.383	0.181	0.482	0.332	0.864	0.212	0.609	0.120	0.489	Media
	K 2 PD	0.662	0.412	1.858	0.704	0.239	1.439	0.150	1.839	0.131	0.562	0.187	1.329	0.163	0.905	0.130	0.545	Dev. St
	K 3 PD	0.594		1.100		0.052		0.138		0.113		0.171		0.039		0.116		
	K 4 PD	0.516		1.031		0.108		0.131		0.084		0.010		0.066		0.091		
	K 5 PD	0.819		1.358		1.743		2.464		1.538		4.173		2.713		1.215		
	K 6 PD	1.062		1.354		0.184		0.606		0.102		0.153		0.054		0.159		
	K 7 PD	0.292		0.378		4.427		5.050		0.851		1.501		1.313		1.428		
	K 8 PD	0.358		0.479		1.461		3.474		1.195		0.937		0.850		0.949		
	K 9 PD	1.609		2.405		0.363		0.004		0.141		0.313		0.074		0.193		

Grp	TESTICOLO	HSD3B		HSD17B3		CYP 17		CYP 3A		MR		GSTA1		HSD11B1		HSD11B2		
	ID	RQ		RQ		RQ		RQ		RQ		RQ		RQ		RQ		
Vitelloni incroci di razze francesi da carne	K 7 DE	0.497	0.584	0.500	0.793	0.511	0.990	0.625	1.609	0.296	1.003	0.559	1.023	0.316	0.539	0.329	1.104	Media
	K 8 DE	1.118	0.296	0.620	0.338	2.605	1.102	3.098	2.213	3.163	1.158	2.910	1.151	1.387	0.464	2.527	1.210	Dev. St
	K 9 DE	0.410		1.144		0.146		0.464		0.436		0.195		0.244		0.533		
	K 10 DE	0.537		0.630		0.203		0.276		0.162		0.519		0.534		0.171		
	K 11 DE	0.919		0.952		0.207		0.243		0.184		0.206		0.070		0.213		
	K 12 DE	0.197		0.269		0.181		0.170		0.161		0.131		0.083		0.149		
	K 23 DE	0.429		1.007		1.366		1.485		1.301		0.889		0.692		1.720		
	K 24 DE	0.568		1.226		2.701		6.514		2.319		2.777		0.988		3.187		
Vitelloni di razza Valdostana	K 11	0.435	0.646	2.188	1.528	0.135	0.621	0.650	1.120	0.363	0.626	0.323	0.933	0.330	0.687	0.315	0.615	Media
	K 75	0.267	0.320	0.431	0.680	0.838	0.911	2.419	1.166	0.826	0.736	0.969	1.392	1.351	0.639	1.114	0.662	Dev. St
	K 105	0.539		1.364		0.033		0.075		0.086		0.059		0.088		0.073		
	K 428	1.050		2.299		0.143		0.457		0.218		0.076		0.314		0.261		
	K 759	0.564		1.304		0.195		0.342		0.227		0.481		0.406		0.192		
	K 869	1.024		1.585		2.386		2.778		2.034		3.692		1.633		1.734		
Vitelloni di incroci di razze da carne	K 0 b	5.177	4.559	0.015	0.049	3.121	2.458	0.004	0.004	0.250	0.189	3.057	2.459	0.081	0.168	0.679	0.527	Media
	K 00 b	10.424	3.287	0.014	0.086	1.446	3.002	0.002	0.004	0.060	0.152	1.066	2.801	0.045	0.202	0.222	0.466	Dev. St
	K 1 b	5.727		0.041		0.208		0.001		0.039		0.400		0.029		0.061		
	K 2 b	0.785		0.027		0.184		0.001		0.074		0.393		0.017		0.137		
	K 3 b	7.587		0.010		4.902		0.005		0.252		5.911		0.331		1.274		
	K 4 b	2.177		0.011		8.648		0.013		0.504		7.528		0.603		1.139		
	K 5 b	2.590		0.261		0.545		0.003		0.186		0.694		0.103		0.206		
K 6 b	2.004		0.014		0.608		0.004		0.145		0.621		0.132		0.497			



### 4.3 *Analisi statistica*

I dati di RQ ottenuti (vedi paragrafo 3.4.4) sono stati analizzati impiegando un software appositamente progettato. Il software utilizzato è stato *GenEx*® (GenEx Enterprise, versione 5.2.7.44, MultiD Analysis AB, ©2010). Questo software permette di applicare differenti algoritmi di analisi statistica al fine di evidenziare le relazioni che intercorrono tra le espressioni geniche dei vari campioni.

Sin da subito è apparsa evidente la necessità di eliminare le dodici femmine presenti nel gruppo dei campioni di monitoraggio, poiché l'analisi veniva profondamente alterata da differenze legate al sesso; inoltre, nel gruppo di controllo erano presenti solo maschi. Pertanto, qualora si volesse applicare tale sistema di analisi anche a soggetti di sesso femminile e castrati, sarà necessario implementare il gruppo di controllo inserendo individui sicuramente non trattati ed aventi queste caratteristiche.

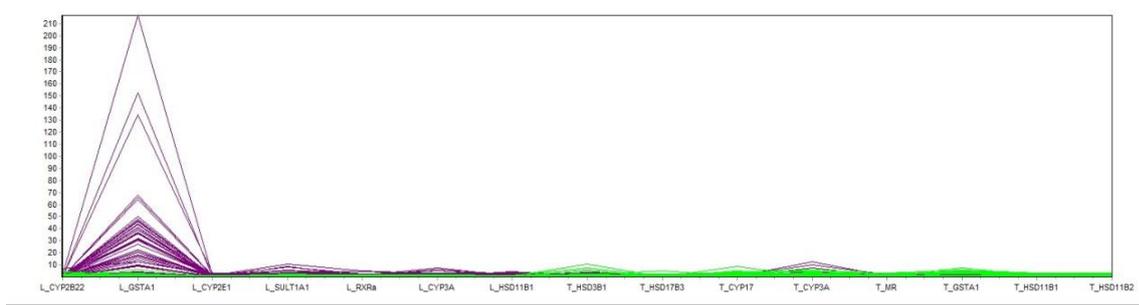
Secondo quanto indicato dal tutorial del software, prima di procedere nelle analisi statistiche, è bene effettuare alcune operazioni sui dati che permettono di definire le varie relazioni che intercorrono tra di essi (Bergkvist, et al., 2010). Per fare questo tipo di osservazioni, *GenEx*® mette a disposizione due tipologie di analisi, oltre alla possibilità di non fare alcuna modifica.

Senza effettuare alcuna rielaborazione dei dati, si visualizzano principalmente le somiglianze di espressione dei vari geni per ogni saggio (Figura 4–10). Inoltre, per rimuovere l'effetto derivante dall'entità dell'espressione genica e, quindi, ridurre il peso di quei geni costitutivamente molto espressi, è utile centrare i dati sulla media (*mean center*). La nuova matrice di dati viene calcolata sottraendo la media ad ogni valore. In questo modo viene evidenziata l'entità della variazione rispetto all'espressione assoluta di RNA (Figura 4–11).

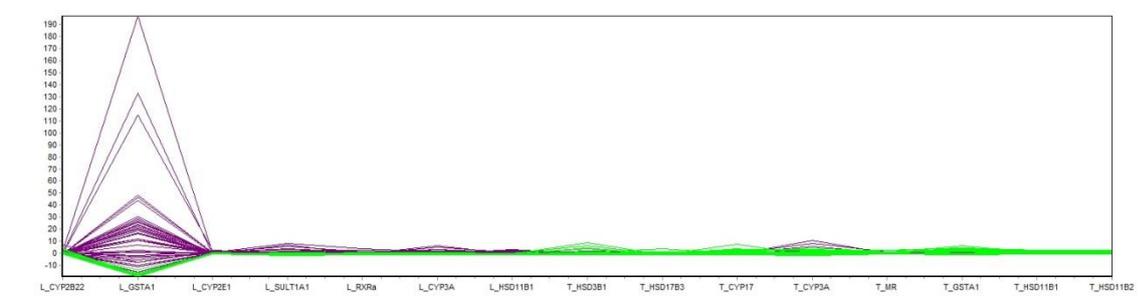
In taluni casi può essere utile ridurre l'ampiezza della variazione; quindi, oltre a centrare la matrice sulla media, si deve dividere il tutto per la deviazione standard. Questo produce una matrice di dati in cui la variabilità viene ridotta ad una unità per tutti i saggi. In questo caso si parla di matrice *autoscaled* (Figura 4–12).

Al fine di meglio chiarire il concetto, nella Figura 4–13 viene riportato un grafico in cui non è stato riportato il dato relativo alla *GSTA1* nel fegato (il cui profilo di espressione risulta essere molto elevato).

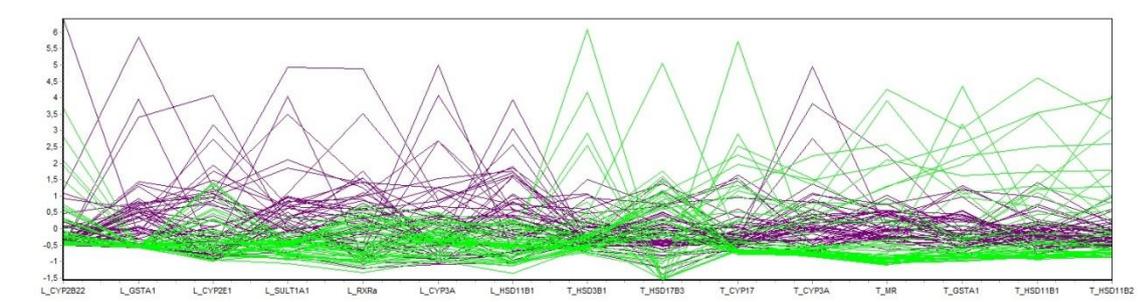
**Figura 4-10:** Rappresentazione grafica dei valori di RQ (per tutti i campioni) in assenza di procedimenti di normalizzazione dei dati. In ascissa si trovano i saggi; in ordinata è riportato l'RQ. Legenda: verde = campioni di controllo; viola = campioni di monitoraggio



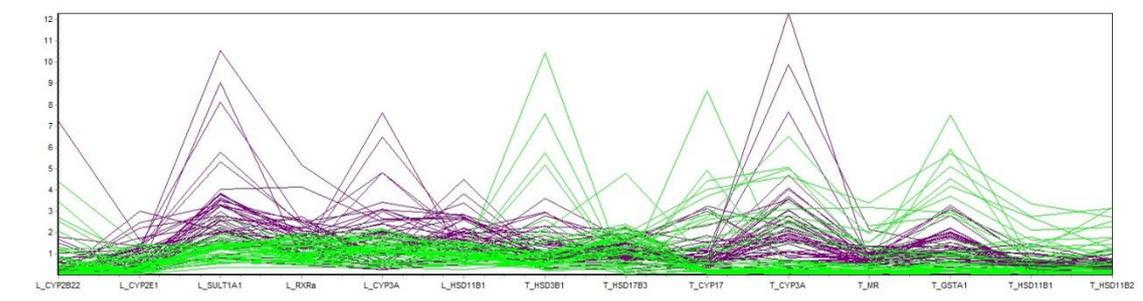
**Figura 4-11:** Rappresentazione grafica dei valori di RQ (tutti i campioni) dopo elaborazione *mean center* (per i dettagli si rimanda al testo). In ascissa si trovano i saggi; in ordinata è riportato l'RQ<sub>MC</sub>. Legenda: verde = campioni di controllo; viola = campioni di monitoraggio.



**Figura 4-12:** Rappresentazione dei valori di RQ di (tutti i campioni) dopo elaborazione *autoscale* (per i dettagli si rimanda al testo). In ascissa si trovano i saggi; in ordinata è riportato l'RQ<sub>AS</sub>. Legenda: verde = campioni di controllo; viola = campioni di monitoraggio.



**Figura 4-13:** Come Figura 4-10 (nessuna normalizzazione) escludendo dalla rappresentazione il saggio della GSTA1 epatica per migliorare la visualizzazione dei restanti saggi. In ascissa si trovano i saggi; in ordinata è riportato l'RQ. Legenda: verde = campioni di controllo; viola = campioni di monitoraggio.



Nel fegato, è evidente in tutti i saggi la compattezza del fascio generato dai controlli; per contro, questa situazione viene meno nel testicolo, in cui alcuni campioni di controllo presentano maggiori variazioni negli RQ rispetto ai campioni di monitoraggio. Questa situazione potrebbe essere dovuta a due cause: a) una variabilità individuale dell'espressione dei geni codificanti per gli enzimi legati alla steroidogenesi (che guarda caso costituivano la gran parte dei trascritti candidati); b) una differente composizione della popolazione cellulare presente nelle aliquote analizzate, dipendente dalla complessa architettura del parenchima testicolare.

L'applicazione dell'*autoscale* porta ad avere un grafico sovrapponibile a quello ottenuto senza considerare la GSTA1 epatica, poiché viene eliminata completamente la sua variabilità. Poiché tale tecnica di *data scaling* non evidenzia alcuna relazione utile a questo studio, si è deciso di escluderla dall'analisi.

Tra i metodi di *clustering* esistenti, sono stati utilizzati il *Single linkage* (la distanza tra due gruppi viene determinata sulla base della distanza tra i due membri più vicini), il *Complete linkage* (la distanza tra due gruppi viene determinata sulla base della distanza tra i due membri più lontani), l'*Average linkage* (la distanza è la media di tutte le distanze tra membri dei gruppi) e il *Ward's algorithm* (basato sull'analisi della varianza).

Inoltre, la misura della distanza poteva essere effettuata secondo il metodo Euclideo (distanza geometrica), Euclideo al quadrato (come il precedente utilizzando i quadrati delle distanze euclidee), Manhattan (medie delle distanze) e con la Correlazione di Pearson (considera i vettori di espressione, con correlazioni sia positive sia negative).

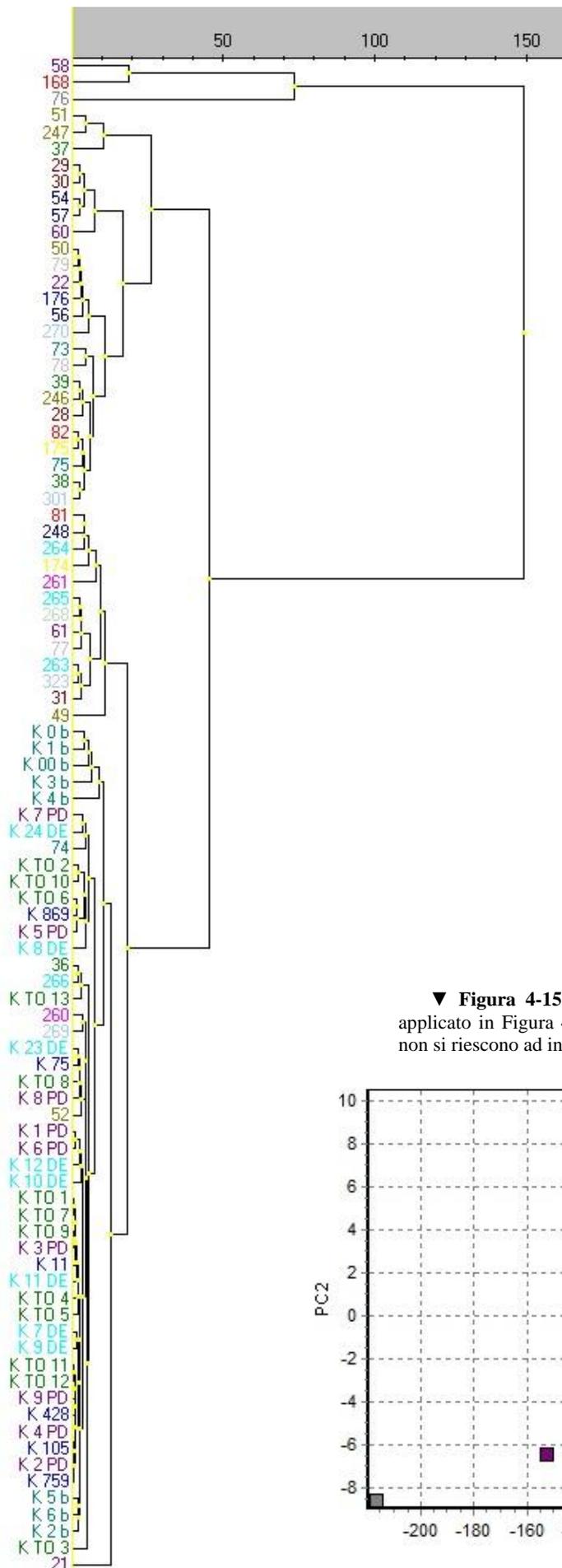
Dopo ogni *clustering* si è verificato che i gruppi identificati fossero individuabili anche con la PCA, poiché è fondamentale che la classificazione ottenuta non venga influenzata dalla tecnica di analisi adottata (Bergkvist, et al., 2010).

Un altro fatto importante da sottolineare è che non è stata introdotta alcuna classificazione *a priori* che potesse alterare l'esito della classificazione, in quanto non è stato settato alcun parametro che il software potesse utilizzare per distinguere i campioni di controllo da quelli conoscitivi.

Prima di procedere all'analisi vera e propria, sono state effettuate prove di classificazione utile a verificare l'incidenza delle condizioni di stabulazione sull'espressione genica. È emerso che il sistema non è in grado di assegnare allo stesso gruppo animali provenienti dallo stesso allevamento (Figura 4–14 e 4–15).

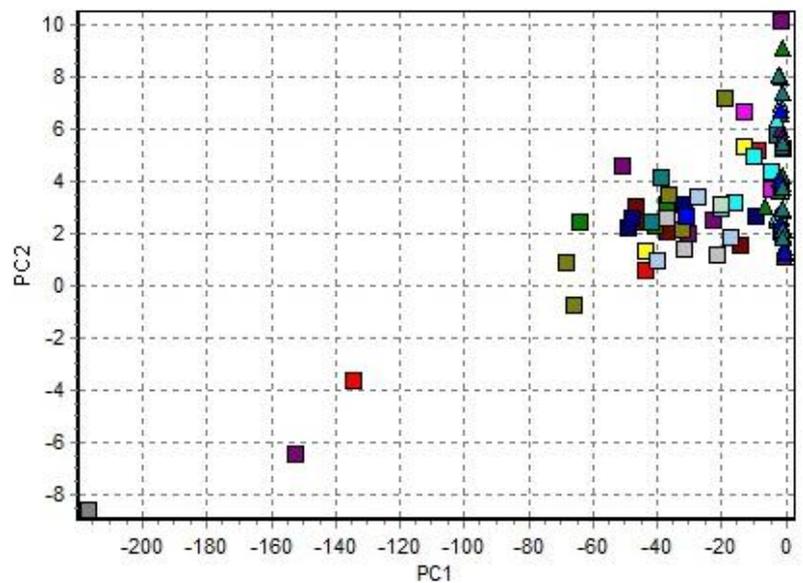
Pertanto, questo risultato sembra indicare che lo strumento biostatistico qui impiegato sia in grado di superare il problema legato alle differenze di razza e di stabulazione spesso citato in letteratura (come ad esempio in Riedmaier, et al., 2009).

Stesso risultato è stato ottenuto per il gruppo di animali di controllo (vedi Figura 4–16)

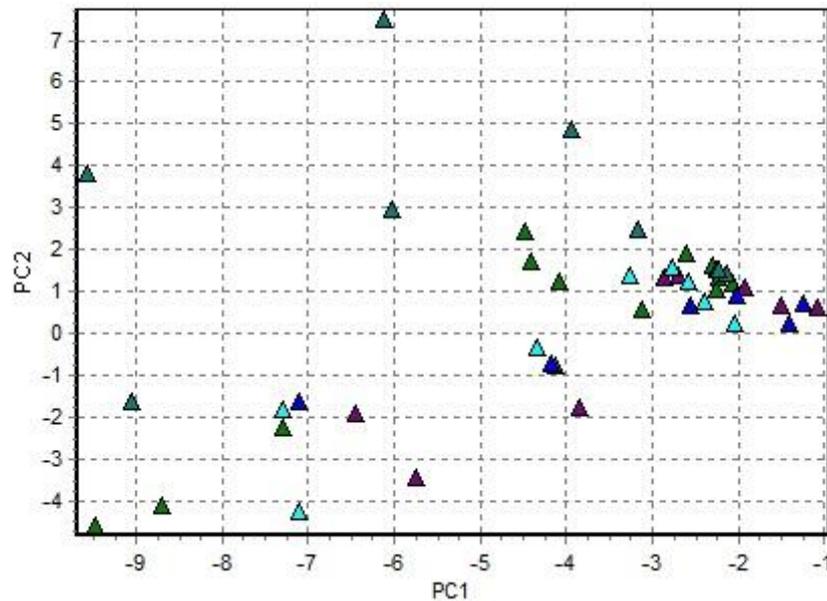


◀ **Figura 4-14:** Clustering eseguito in modalità *average linkage* con misurazione euclidea della distanza. Ogni colore identifica gli animali provenienti dalla stessa partita. Non viene creata una classificazione che ricalchi tale suddivisione.

▼ **Figura 4-15:** PCA eseguita con lo stesso codice di colore applicato in Figura 4-14. A conferma di quanto rilevato con HCL, non si riescono ad individuare dei gruppi corrispondenti alla partita.

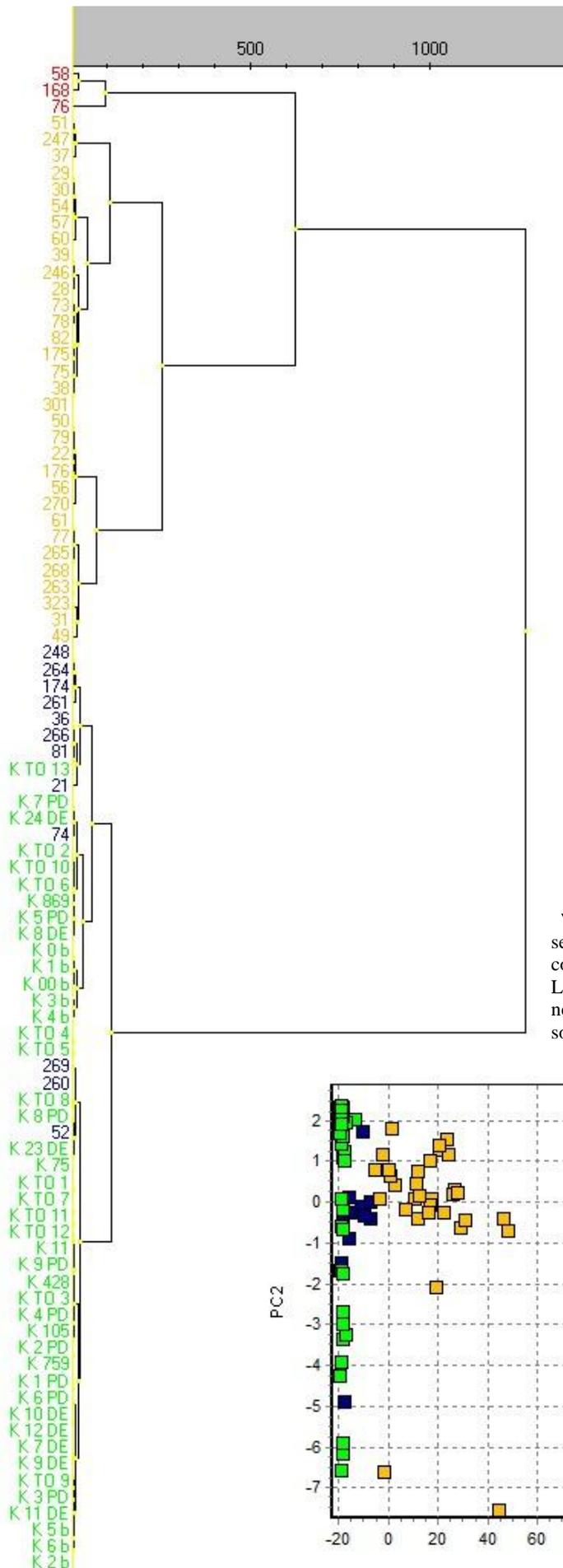


**Figura 4-16:** PCA dei campioni di controllo per verificare l'assenza di variabilità legata alla partita di appartenenza. Viene applicato lo stesso codice colore utilizzato nei due grafici precedenti.



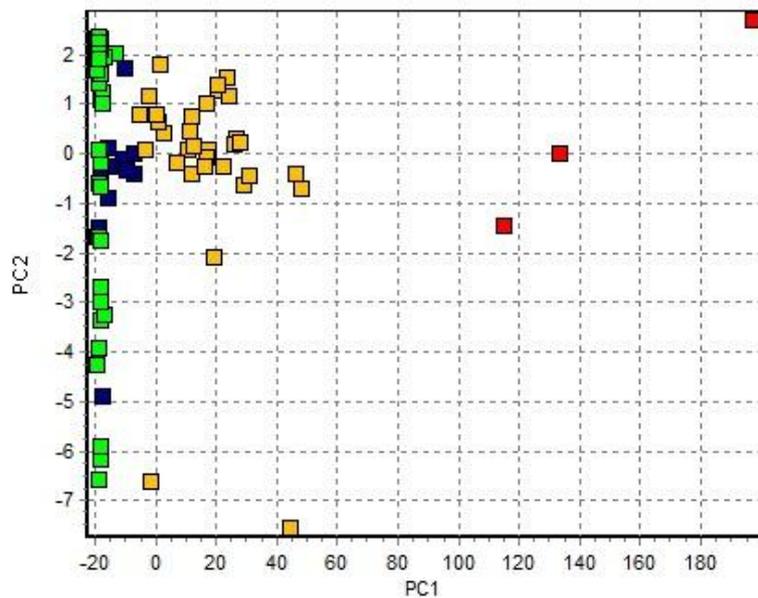
Operando un'analisi che considerasse contemporaneamente gli RQ individuati in entrambe le matrici tissutali, sono state ottenute delle classificazioni indipendenti dall'algoritmo di analisi considerato.

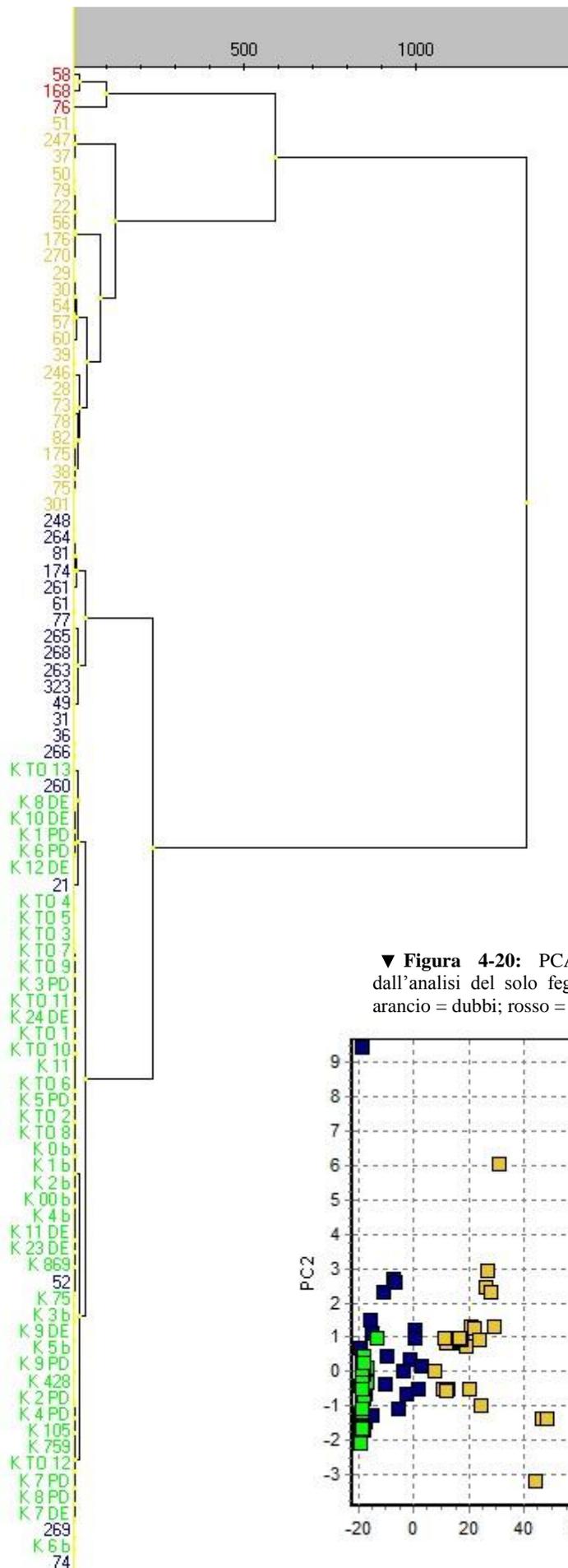
Come per tutte le classificazioni eseguite nel presente lavoro di tesi, i campioni di conoscitivi sono stati classificati in tre differenti gruppi: a) negativi, in quanto raggruppati assieme ai controlli; b) potenziali positivi (sospetti), data l'elevata distanza tra questo gruppo e quello di controllo; c) dubbi, in cui sono presenti quei campioni raggruppati separatamente dai controlli, ma la cui variabilità non è tale per cui possano essere inseriti all'interno del gruppo dei sospetti. Nelle Figure 4-17 e 4-18 vengono riportati il dendrogramma derivante dall'applicazione dell'algoritmo di Ward a distanze euclidee su dati centrati sulla media e la rispettiva PCA di conferma.



◀ **Figura 4-17:** Dendrogramma (*Ward - Euclidean*) ottenuto considerando assieme fegato e testicolo. Legenda: verde = controlli; blu = negativi; arancio = dubbi; rosso = sospetti.

▼ **Figura 4-18:** PCA ottenuta in seguito a classificazione eseguita considerando assieme fegato e testicolo. Legenda: verde = controlli; blu = negativi; arancio = dubbi; rosso = sospetti.





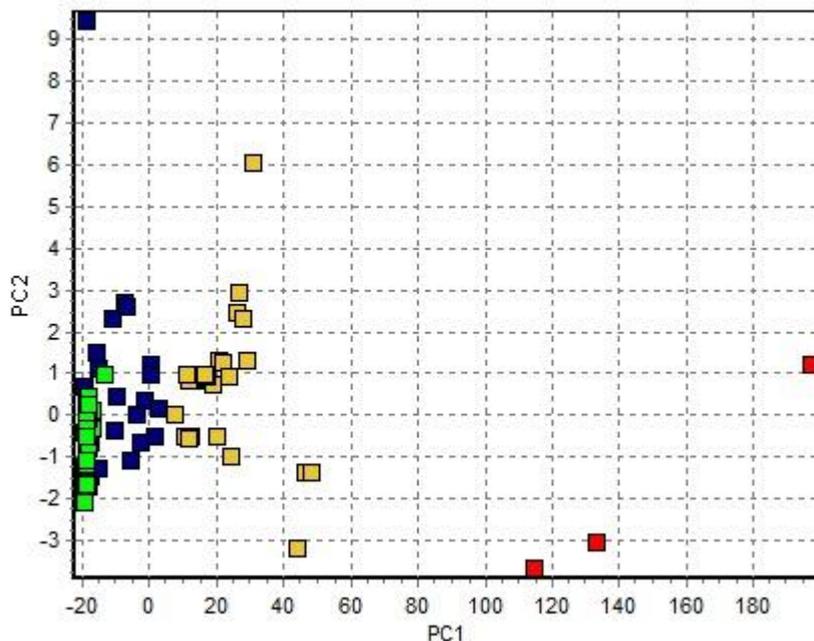
A questo punto si è deciso di valutare le capacità di classificazione ottenibili analizzando il singolo tessuto.

Nel fegato si era notato (vedi Figura 4-10 e 4-13) che gli RQ dei campioni di controllo formavano un fascio compatto con un'ampiezza di variabilità che sembrava permettere una classificazione attendibile.

Applicando l'algoritmo di Ward a distanze euclidee (Figura 4-19) si è acquisita una classificazione confermata da PCA (Figura 4-20), con risultati sovrapponibili a quanto ottenuto analizzando i due tessuti assieme.

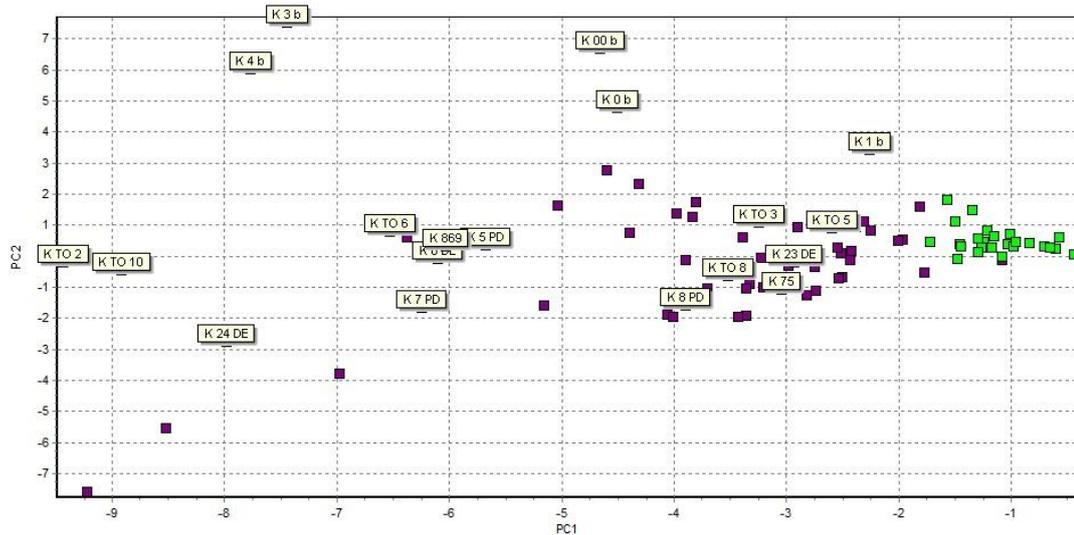
◀ **Figura 4-19:** Dendrogramma ottenuto considerando solamente i saggi eseguiti sul fegato. Legenda: verde = controlli; blu = negativi; arancio = dubbi; rosso = sospetti.

▼ **Figura 4-20:** PCA di conferma della classificazione acquisita dall'analisi del solo fegato. Legenda: verde = controlli; blu = negativi; arancio = dubbi; rosso = sospetti.



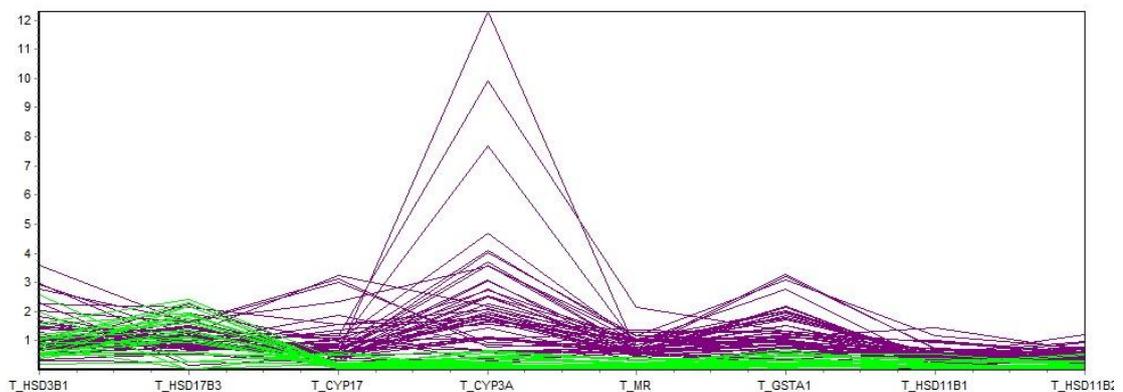
Nel testicolo si è riscontrata, sin dalle analisi preliminari, una particolare situazione: la variabilità dei campioni di controllo è risultata essere maggiore di quella riscontrata nei campioni di monitoraggio (Figura 4–13); questa evidenza è stata confermata anche dalla PCA (Figura 4–21).

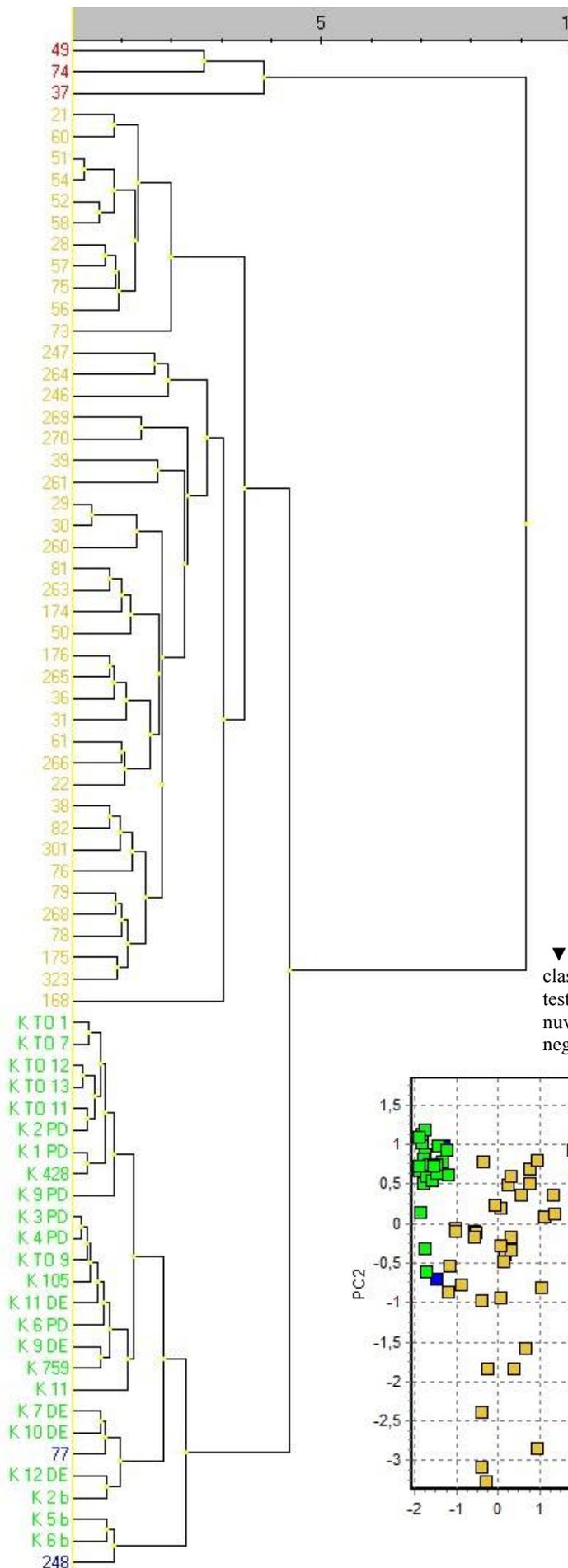
**Figura 4-21:** PCA dei campioni di testicolo. Vengono identificati con le etichette i campioni di controllo che non concorrono ad ottenere una nuvola compatta di campioni. Legenda: verde = controlli; viola = monitoraggio.



Al fine di ottenere dati relativi ai controlli con un miglior *cluster*, sono stati esclusi dall'analisi quei campioni (20 su 44) che si presentavano al di fuori della porzione compatta della nuvola, anche se questo approccio potrebbe almeno in teoria alterare la rilevanza dell'analisi dei dati. Dopo questa operazione di “pulizia”, la rappresentazione grafica degli RQ ha mostrato la presenza di un fascio ben compatto di controlli.

**Figura 4-22:** Rappresentazione grafica degli RQ trovati nei geni analizzati nel testicolo, dopo aver escluso i campioni che alteravano la precedente classificazione. In ascissa si trovano i saggi; in ordinata è riportato l'RQ. Legenda: verde = campioni di controllo; viola = campioni di monitoraggio.



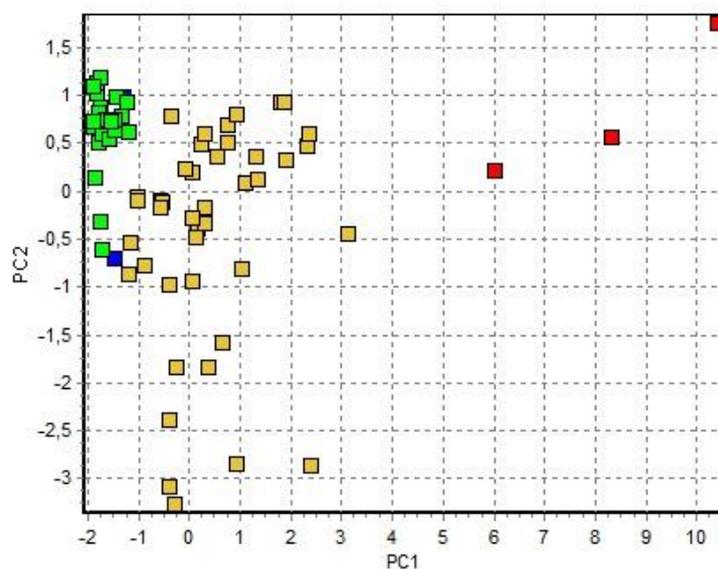


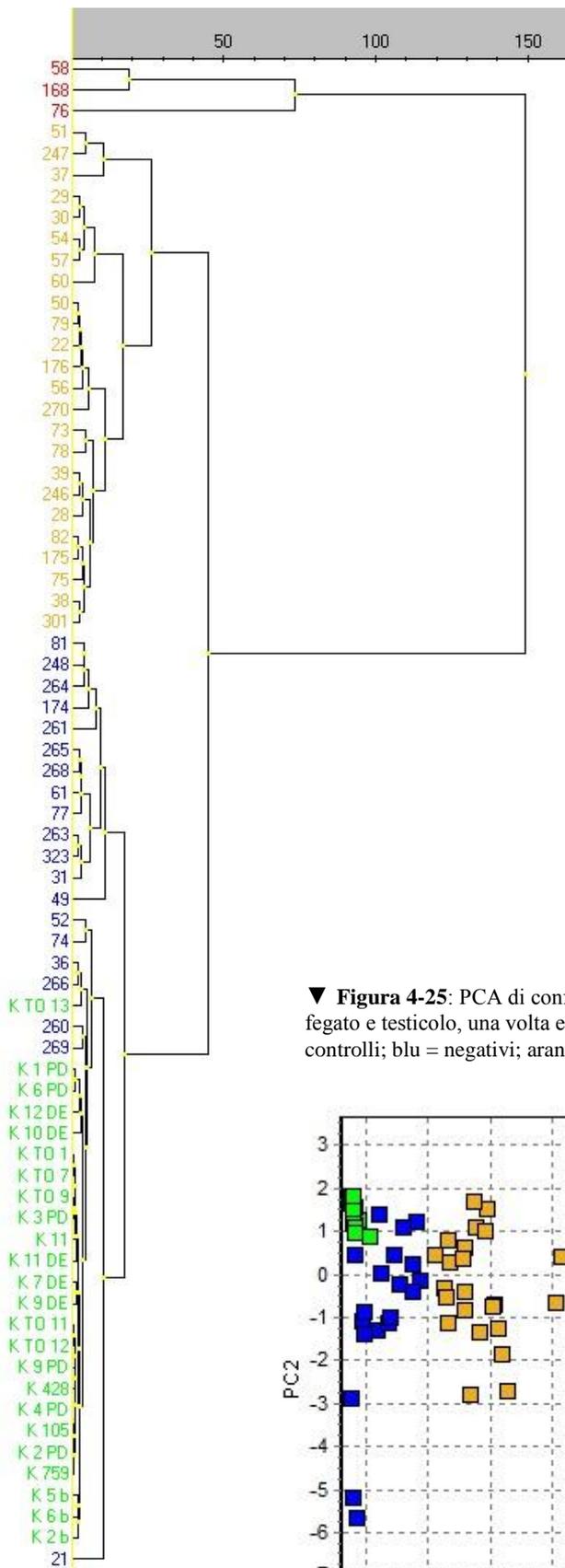
In tale tessuto e con il gruppo di controllo così corretto, applicando il clustering in modalità *average linkage* a misura euclidea, si ottiene una classificazione che praticamente va ad azzerare il numero dei soggetti negativi, mentre vengono aumentati di molto i soggetti dubbi (Figura 4-23).

Tale classificazione viene confermata eseguendo la PCA (Figura 4-24).

◀ **Figura 4-23:** Dendrogramma ottenuto considerando solamente i saggi eseguiti sul testicolo, dopo aver eliminato i campioni “fuori nuvola”. Legenda: verde = controlli; blu = negativi; arancio = dubbi; rosso = sospetti.

▼ **Figura 4-24:** PCA di conferma della classificazione acquisita dall’analisi del solo testicolo, una volta eliminati i controlli “fuori nuvola”. Legenda: verde = controlli; blu = negativi; arancio = dubbi; rosso = sospetti.

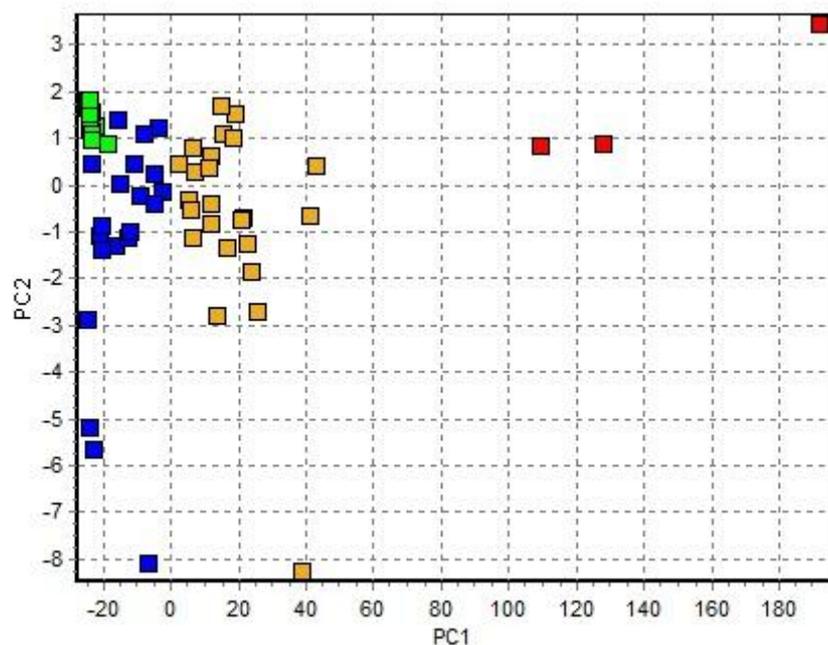




Al fine di valutare quanto l'eliminazione di venti soggetti dal gruppo dei campioni di controllo potesse influire sulla capacità di classificazione del sistema, è stata eseguita nuovamente un'analisi considerando entrambi i tessuti. A prima vista il sistema non sembra perdere di efficacia (Figura 4-25 e 4-26).

◀ **Figura 4-25:** Dendrogramma ottenuto considerando i saggi eseguiti su fegato e testicolo, dopo aver eliminato i campioni "fuori nuvola" individuati per il testicolo. Legenda: verde = controlli; blu = negativi; arancio = dubbi; rosso = sospetti.

▼ **Figura 4-25:** PCA di conferma della classificazione acquisita dall'analisi di fegato e testicolo, una volta eliminati i controlli "fuori nuvola". Legenda: verde = controlli; blu = negativi; arancio = dubbi; rosso = sospetti.



**Tabella 4-2:** Tabella dei confronti delle tecniche di classificazione. Legenda: A\_E = average linkage\_euclidean; A\_M = average linkage\_Manhattan; W\_E = Ward's algorithm\_euclidean; W\_M = Ward's algorithm\_manhattan; 0 = negativo; 1 = dubbio; 2 = sospetto; \* = classificazione ottenuta dopo aver eliminato dall'analisi i campioni di controllo considerati "fuori nuvola" per il testicolo.

Grp	ID	Fegato e Testicolo								Fegato		Testicolo *				Fegato e Testicolo *	
		None scaling				Mean centered				Mean center	None scaling	None scaling		Mean center		Mean center	
		A_E	A_M	W_E	W_M	A_E	A_M	W_E	W_M			W_E	A_E	A_M	A_E		A_M
5	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
5	22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	31	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1
9	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
9	37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1
9	38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	39	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1
13	49	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2	2	2	2	0	1
13	50	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	51	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
14	54	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	56	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	57	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	58	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2
15	60	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	61	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1
22	73	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1
24	74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	0	0
24	75	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	76	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2
25	77	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
25	78	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
25	79	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
26	81	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
26	82	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
53	168	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2
53	174	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	
53	175	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
53	176	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	246	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1
13	247	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1
14	248	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
17	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
17	261	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1	2	0	0
18	263	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1
18	264	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	2	0	0	
18	265	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1
18	266	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
19	268	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1
19	269	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	2	0	0
19	270	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1
27	301	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
32	323	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1
<b>Sospetti</b>		<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>Dubbi</b>		<b>37</b>	<b>24</b>	<b>32</b>	<b>24</b>	<b>24</b>	<b>24</b>	<b>32</b>	<b>24</b>	<b>24</b>	<b>29</b>	<b>42</b>	<b>33</b>	<b>42</b>	<b>33</b>	<b>24</b>	<b>32</b>
<b>Negativi</b>		<b>7</b>	<b>20</b>	<b>12</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>12</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>15</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>20</b>	<b>12</b>

Nella Tabella 4-5 vengono riportate le classificazioni ottenute con le varie combinazioni adottate. È facile notare come la classificazione che si ottiene sia perlopiù indipendente dalla combinazione dalla metodica di analisi applicata. Dalla stessa tabella è possibile vedere che, nonostante l'eliminazione di ben venti soggetti di controllo del testicolo, la nuova classificazione è del tutto sovrapponibile a quella ottenuta considerando entrambi i tessuti (con tutti i controlli) nonché quella ottenuta solo con l'analisi del fegato. Ciò fa supporre che l'adozione di codesto approccio bioinformatico

potrebbe non essere influenzato in misura rilevante dalla numerosità dei campioni di controllo, una volta raggiunta una numerosità sufficiente.

I dati ottenuti nel testicolo non permettono di ottenere una classificazione utile ai fini di un'applicabilità come metodica di screening, ma questo non deve portare a ritenere il testicolo un tessuto poco idoneo a tal fine: prima di trarre conclusioni definitive, potrebbe essere utile meglio caratterizzare "a monte" il trascrittoma di questo tessuto (ad esempio ricorrendo alla tecnica del *microarray*) su aliquote di campioni trattati con GP e di controllo, al fine di individuare ulteriori trascritti magari più responsivi, che dovrebbero essere in un secondo momento nuovamente verificati su campioni di monitoraggio come quelli qui considerati. Per contro il fegato è in grado di fornire, sia considerato da solo che in combinazione con il testicolo, una buona classificazione.

In questo studio, escludendo i risultati derivanti dall'analisi del solo testicolo, è stata rilevata una percentuale di animali da considerarsi negativi pari al  $35,11 \pm 9,92\%$ ; una percentuale di dubbi del  $58,51 \pm 9,92\%$  e una percentuale di sospetti del  $6,38\%$ . In vista di un'applicazione in campo, sia i dubbi che i sospetti dovranno essere avviati all'analisi chimica di conferma, ottenendo così una percentuale di "non negativi" del  $63,82 \pm 9,07\%$ .

In un altro lavoro (Vascellari, et al., 2008) sono stati confrontati i risultati ottenuti con un biomarcatore indiretto (morfologia del timo) e con l'analisi del cortisolo ematico. Applicando questi biomarcatori in 20 animali scelti casualmente e sottoposti a regolare macellazione, la percentuale di campioni, da confermare con analisi chimica, risulta essere il 75% sulla base della morfologia timica e il 60 % considerando l'abbassamento dei livelli di cortisolo circolante.

Confrontando i dati ottenuti applicando la trascrittomica, con i dati che si ricavano dalla letteratura, si può dire che le percentuali di campioni che devono essere avviati ad analisi di conferma sono pressoché le stesse, a sostegno della validità della metodica.



## 5 Valutazione economica

Secondo quanto riportato in Tabella 5–1, per eseguire l'analisi di un campione si deve sostenere un costo di circa 8 - 10 €. Considerando che in questo studio si sono analizzati in totale diciassette geni (compresi gli *housekeeping* per entrambi i tessuti), il costo per animale può essere stimato essere attorno ai 160 €.

**Tabella 5-1:** Tabella dei costi sostenuti per eseguire le analisi di trascrittomiche (da Giantin, 2011, dati non pubblicati)

<b>Materiale</b>	<b>Costo</b>
Reagenti per estrazione RNA totale utilizzando <i>TRIzol® reagent</i> (Invitrogen Corp.)	2.50 € a campione
Materiale necessario per valutazione RNA (gel per elettroforesi e quantificazione)	3.00 € per 12 campioni
Retrotrascrizione con kit <i>High Capacity cDNA Archive</i> (Applied Biosystem)	1 € a campione
qPCR con mix e sonda UPL (Roche Applied Science)	3 € per un'analisi in doppio di un campione
Materiale monouso complessivo	+ 10 % del costo dei reagenti

Il servizio Borsa Merci di Modena, che viene offerto dalla Camera di Commercio di Modena, seppure abbia solamente un carattere informativo ed orientativo, permette di determinare quale sia il prezzo attuale della carne con una certa attendibilità.

Riferendosi alla “carne nazionale di Vitellone: mezzene di qualità extra” come categoria merceologica, otteniamo che il prezzo medio, calcolato su base annuale, da macellatore a dettagliante franco acquirente è di 6,2842 € al chilo (Camera di Commercio di Modena, 2011).

Considerando una resa di macellazione<sup>1</sup> pari al 60 %, per vitelloni del peso di 600 Kg otteniamo due mezzene per un totale di 360 Kg (Falaschini, et al., 2005).

Aggiungendo il costo dell'analisi al costo di macellazione si ha che la carne verrebbe certificata esente da trattamenti con GP con una maggiorazione di 0,40 – 0,50 € al chilo.

---

<sup>1</sup> **Resa alla macellazione:** peso vivo – quinto quarto (ossia, pelle, testa, interiora, estremità distali degli arti e sangue). Il peso della carcassa si considera comprensivo di ossa.

A nostro avviso questa cifra non provocherebbe un eccessivo innalzamento del prezzo della carne tale da determinare un blocco delle vendite, poiché il consumatore avrebbe la possibilità di spendere una modica cifra in più, a fronte di un notevole valore aggiunto dato dalla certificazione.

## 6 Conclusioni

L'applicazione delle tecniche -omiche come metodiche di screening per contrastare l'uso illecito di GP è stata più volte auspicata; l'approccio innovativo di tali tecniche consta nell'individuazione degli effetti biologici che i diversi GP suscitano negli animali piuttosto che sulla tradizionale identificazione e rilevazione delle tracce dei loro residui nei tessuti e nell'urina, alla luce delle problematiche sottolineate da diversi Autori (Courtheyn, et al., 2002; Riedmaier, et al., 2009; Noppe, et al., 2008; Mooney, et al., 2009; Nebbia, et al., 2010).

Tale approccio innovativo ha suscitato anche l'interesse dell'EFSA (Agenzia Europea per la Sicurezza Alimentare) che, recentemente (luglio 2011), ha indetto una procedura concorsuale con l'obiettivo di esaminare criticamente le tecnologie -omiche per comprenderne quali possano essere le applicazioni future nell'ambito della sicurezza degli alimenti e dei mangimi (EFSA, 2011).

Tra le diverse tecniche -omiche, la trascrittomica ha assunto un particolare interesse, poiché è stato dimostrato che la somministrazione dei GP è in grado di alterare l'espressione genica (Riedmaier, et al., 2009; Girolami, et al., 2010; Nebbia, et al., 2010). La qPCR è una delle tecniche per l'analisi del trascrittoma ed è caratterizzata da un'elevata sensibilità, che permette di individuare anche lievi alterazioni nei profili di espressione di geni candidati (Riedmaier, et al., 2009).

Nel presente studio sono state utilizzate due matrici (fegato e testicolo), prelevate nell'ambito di un piano di monitoraggio della Regione del Veneto condotto su bovini da carne (n=47 soggetti di sesso maschile) campionati in allevamento e al macello; su codesti tessuti sono state eseguite analisi (qPCR) sulle possibili variazioni nel contenuto di mRNA di un certo qual numero di geni scelti in base ai risultati di precedenti esperimenti controllati, in cui i gruppi sperimentali erano stati trattati con differenti protocolli a base di GP (desametasone, da solo od in associazione con estradiolo: Giantin, et al., 2010; Lopparelli, et al., 2010).

Per analizzare i risultati sono stati utilizzati approcci di tipo biostatistico in grado di elaborare dati multivariati, come il clustering gerarchico (HCL) e l'analisi delle componenti principali (PCA), mediante un software specifico (GenEx®) (Bergkvist, et al., 2010).

In seguito all'applicazione di HCL (analizzando le varie modalità previste per la normalizzazione preliminare dei dati, per la scelta del metodo di clustering e per la misura della distanza) è stato possibile attuare una classificazione dei campioni di monitoraggio rispetto a campioni di controllo (provenienti dai gruppi di controllo dei pregressi esperimenti, per un totale di 44 soggetti di sesso maschile), che ha portato a riconoscere tre distinti gruppi: a) negativi (che *clusterizzano* con gli animali di controllo, indipendentemente dall'algoritmo utilizzato; trattasi di 7 su 47 campioni); b) dubbi (che si separano dagli altri due gruppi, ricadendo in una zona intermedia); c) sospetti di trattamento (3 campioni su 47). Gli animali di controllo si sono distribuiti in un unico gruppo.

Tale classificazione è risultata confermata dalla successiva analisi PCA.

In questo studio si è ottenuta una classificazione che risulta soddisfacente non solo analizzando congiuntamente le due matrici (fegato e testicolo), ma anche considerandone solamente una (il fegato). Inoltre, i risultati ottenuti suggeriscono di approfondire ulteriormente la ricerca di biomarcatori nel testicolo, poiché i risultati ottenuti con i saggi prescelti non sembrano essere in grado di garantire l'ottenimento di una classificazione utile ai fini di uno screening in campo. Tra i fattori da considerare, particolare attenzione dovrà anche essere rivolta alle modalità di campionamento.

Un dato interessante è rappresentato dal fatto che, pur dovendo considerare un numero ridotto di animali di controllo (24 invece degli iniziali 44, poiché 20 di questi sono stati scartati a seguito di analisi preliminari), la classificazione non è risultata essere sostanzialmente diversa da quella ottenuta considerando i due tessuti insieme. Ciò in apparente contrasto con l'opinione comune dei ricercatori che si occupano di GP, i quali sostengono la necessità di ampliare il più possibile i soggetti di controllo per limitare gli effetti variabili sul dato ottenuto di diversi fattori intrinseci (razza, condizioni fisiologiche, età) ed estrinseci (alimentazione, allevamento, fattore tempo, fattore clima).

Sebbene siano necessari ulteriori studi, si può affermare che questo rappresenti il primo passo verso una validazione di dati ottenuti con saggi di qPCR ritenuti utili per lo screening sull'impiego di GP nella filiera del bovino da carne. In prospettiva, si ritiene necessario lo svolgimento di ulteriori indagini volte a meglio risolvere il *cluster* degli animali sospetti, che non si è riusciti, in questo contesto, ad attribuire né al gruppo dei controlli né a quello dei sospetti trattati. Ciò potrebbe essere attuato mediante

l'implementazione dei saggi analizzati nel singolo tessuto (testicolo), o esplorando le possibilità informative di altri *surrogate tissues* (sangue). Inoltre, al fine di ottenere i necessari parametri relativi a sensibilità, specificità e tasso di falsi conformi, in ottemperanza alla Decisione 657/2002/CE, sarebbe necessario confermare il dato della trascrittomico con quello delle analisi chimiche di conferma, peraltro di difficile ottenimento.

Se questo approccio si confermasse promettente, l'applicabilità della trascrittomico al monitoraggio degli animali allevati, in una fase di screening, potrebbe addirittura prevedere la messa a punto ed il brevetto di un *PCR-array* tessuto-specifico.



## **7 Appendice**

In questa sezione vengono riportate le tabelle contenenti i *Crossing points* (Cp) e i relativi coefficienti di espressione genica (RQ) ottenuti secondo quanto riportato nei capitoli precedenti.

Al termine di ogni tabella è riportato anche il calibratore utilizzato per la normalizzazione (per una trattazione più particolareggiata si rimanda al capitolo 3.4.4.2). Sulla riga del calibratore (CAL), sotto alla colonna dell'RQ di ogni saggio si trova il valore 1. Questo serve a confermare che tutti i calcoli sono stati eseguiti correttamente.

**Tabella A-1:** Tabella contenente i Cp e i coefficienti di espressione genica (RQ) ricavati dall'analisi del fegato, calcolati secondo il metodo Livak (vedi paragrafo 3.4.4.2),. Legenda: Grp = partita; ID = codice del campione; S = sesso dell'animale.

FEGATO			ACTB	CYP2B22		GSTA1		HSD11B1		CYP2E1		SULT1A1		RXRa		CYP3A	
Grp	ID	S	Cp	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ
5	21	M	22.42	34.71	0.751	26.64	0.570	23.51	2.713	21.38	1.117	20.66	10.556	23.21	5.169	21.92	2.621
	22	M	22.35	45.00	0.001	20.84	30.379	23.75	2.196	23.58	0.232	22.98	2.021	24.79	1.653	22.21	0.603
7	28	M	22.14	42.64	0.003	20.34	37.014	23.29	2.603	24.78	0.087	22.09	3.227	23.92	2.603	22.59	0.889
	29	M	22.59	34.43	1.029	20.47	46.366	22.96	4.485	21.48	1.177	21.83	5.296	24.45	2.471	22.89	0.901
	30	M	21.67	38.25	0.039	19.57	45.728	23.19	2.021	20.45	1.270	20.79	5.756	23.59	2.370	23.30	0.674
	31	M	22.63	45.00	0.001	22.21	14.271	24.78	1.306	22.53	0.584	23.92	1.279	25.25	1.459	23.44	0.297
9	36	M	22.08	45.00	0.000	23.48	4.028	24.92	0.807	21.85	0.637	22.03	3.227	24.53	1.636	21.64	2.428
	37	M	21.58	36.89	0.093	19.00	63.779	24.46	0.787	21.65	0.519	23.55	0.798	25.48	0.601	21.38	0.259
	38	M	22.37	35.07	0.565	20.45	40.224	23.44	2.751	21.28	1.157	22.54	2.770	24.41	2.173	21.75	3.411
	39	M	21.68	36.69	0.114	19.90	36.504	23.16	2.071	21.49	0.620	21.49	3.555	23.77	2.099	20.37	1.028
11	45	F	22.85	34.17	1.474	21.40	29.041	24.67	1.636	21.57	1.320	23.21	2.428	25.83	1.133	22.40	0.518
12	46	F	21.12	35.51	0.176	19.45	33.942	22.84	1.759	19.00	2.370	21.87	1.860	23.88	1.324	21.57	0.451
	48	F	23.49	36.60	0.425	19.46	173.645	24.65	2.585	20.29	4.993	22.48	6.277	24.59	4.170	20.84	5.938
13	49	M	22.56	35.08	0.642	21.79	18.189	24.34	1.688	20.88	1.747	22.97	2.354	25.88	0.898	20.67	1.986
	50	M	22.39	41.25	0.008	20.80	32.000	24.75	1.125	21.37	1.102	22.93	2.144	25.81	0.835	21.83	1.778
	51	M	23.42	43.49	0.003	20.79	66.028	25.33	1.542	22.53	1.010	23.68	2.612	26.50	1.061	22.89	0.358
	52	M	21.75	41.72	0.004	26.20	0.486	23.28	2.000	23.66	0.145	22.36	2.042	23.74	2.250	22.33	1.310
	246	M	21.13	36.26	0.105	19.37	36.127	22.68	1.979	21.75	0.355	20.83	3.850	23.58	1.641	18.78	1.028
	247	M	21.45	37.27	0.079	18.78	67.884	23.18	1.747	20.26	1.244	22.06	2.049	23.95	1.586	21.35	1.157

FEGATO		ACTB	CYP2B22			GSTA1		HSD11B1		CYP2E1		SULT1A1		RXRa		CYP3A	
Grp	ID	S	Cp	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ
14	54	M	22.77	39.25	0.041	20.58	48.671	23.54	3.399	27.79	0.017	22.61	3.494	24.61	2.505	21.52	1.986
	56	M	24.06	35.20	1.674	22.50	31.450	24.67	3.797	26.73	0.086	24.34	2.576	25.85	2.594	24.32	0.717
	57	M	23.80	38.23	0.172	21.65	47.340	24.82	2.858	29.16	0.013	23.44	4.014	24.92	4.127	22.53	2.497
	248	M	21.15	33.59	0.824	21.32	9.448	23.47	1.157	20.55	0.824	22.50	1.223	23.79	1.434	19.62	1.919
	250	F	21.70	41.85	0.004	20.22	29.651	23.69	1.454	20.36	1.376	22.41	1.905	25.00	0.908	19.66	2.204
15	58	M	22.55	45.00	0.001	18.71	152.747	24.54	1.459	24.40	0.151	22.75	2.723	24.89	1.772	19.76	1.395
	60	M	22.09	45.00	0.000	19.84	50.563	23.75	1.828	23.49	0.206	20.55	9.063	25.69	0.737	17.99	4.823
	61	M	21.83	45.00	0.000	20.75	22.471	23.64	1.647	24.49	0.086	22.14	2.514	25.61	0.651	20.61	1.905
17	64	F	22.86	38.77	0.061	21.91	20.606	23.80	3.021	20.17	3.519	21.83	6.386	24.48	2.918	20.16	2.713
	65	F	22.43	37.98	0.078	20.74	34.297	23.43	2.888	19.75	3.482	21.37	6.498	24.69	1.866	20.91	0.785
	260	M	20.17	36.17	0.070	21.49	4.272	23.25	0.685	22.37	0.119	21.93	0.923	22.97	1.288	19.75	0.586
	261	M	20.90	30.21	7.225	20.66	12.553	22.48	1.932	19.31	1.636	20.82	3.294	23.16	1.866	18.98	3.074
18	66	F	22.23	36.00	0.270	21.47	18.063	23.43	2.523	19.96	2.630	22.85	2.035	24.82	1.490	22.70	0.895
	263	M	21.29	40.12	0.010	20.70	16.056	23.70	1.091	21.53	0.462	21.95	1.979	23.54	1.886	19.55	1.693
	264	M	20.30	36.67	0.054	20.42	9.815	22.99	0.898	27.56	0.004	20.48	2.761	22.88	1.500	18.67	1.050
	265	M	21.65	45.00	0.000	20.73	20.182	23.77	1.333	21.98	0.434	21.37	3.797	23.92	1.860	19.82	0.973
	266	M	20.50	33.41	0.597	21.79	4.362	23.78	0.597	24.63	0.031	20.32	3.543	24.57	0.534	20.89	1.613
22	73	M	22.86	38.06	0.100	21.00	38.720	24.56	1.784	22.44	0.730	23.88	1.542	26.22	0.874	20.59	6.498
24	74	M	24.32	45.00	0.002	26.65	2.114	27.40	0.683	24.87	0.371	26.18	0.859	27.87	0.763	24.43	0.441
	75	M	22.95	41.12	0.013	20.98	41.643	24.62	1.815	23.40	0.398	22.67	3.784	25.37	1.670	21.10	2.378
	76	M	23.68	34.73	1.771	19.33	216.767	24.71	2.828	22.38	1.338	22.30	8.112	25.53	2.479	21.75	3.074
25	77	M	22.46	45.00	0.001	21.47	21.185	23.88	2.166	23.36	0.292	23.62	1.400	24.62	2.007	21.44	1.064
	78	M	21.71	36.29	0.154	19.93	36.504	24.61	0.774	20.76	1.050	22.80	1.464	24.80	1.050	20.37	7.621
	79	M	21.17	34.65	0.331	19.60	31.669	22.97	1.664	21.31	0.495	21.66	2.227	24.54	0.868	19.69	0.953

FEGATO		ACTB		CYP2B22		GSTA1		HSD11B1		CYP2E1		SULT1A1		RXRa		CYP3A	
Grp	ID	S	Cp	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ
26	81	M	22.07	35.89	0.262	22.37	8.664	23.20	2.648	23.52	0.200	21.86	3.618	24.37	1.821	21.28	2.603
	82	M	22.01	36.12	0.213	19.97	43.713	24.26	1.214	20.83	1.231	22.96	1.613	24.77	1.320	20.40	2.042
42	137	F	20.79	32.04	1.545	20.65	11.713	23.17	1.110	18.77	2.204	21.61	1.765	24.00	0.966	18.72	1.959
	138	F	21.66	36.78	0.106	19.17	59.921	23.68	1.429	19.31	2.780	21.66	3.127	24.93	0.930	19.32	1.790
43	139	F	21.91	31.82	3.916	17.95	165.421	23.21	2.346	19.58	2.732	21.51	4.112	24.58	1.404	18.63	3.031
53	168	M	23.42	45.00	0.001	19.76	134.364	26.35	0.758	20.95	3.010	24.02	2.056	26.47	1.079	21.72	0.543
	174	M	21.77	41.26	0.005	21.55	12.424	23.74	1.479	19.59	2.471	21.68	3.329	23.81	2.181	19.22	4.823
	175	M	21.70	41.26	0.005	19.68	43.261	23.55	1.608	20.27	1.469	21.63	3.283	24.40	1.380	18.88	3.095
	176	M	22.34	37.63	0.094	20.81	30.696	23.46	2.657	20.31	2.219	22.50	2.789	24.46	2.056	21.70	1.919
10	236	F	20.42	34.39	0.235	18.93	29.857	23.40	0.732	18.52	2.028	21.62	1.357	23.71	0.914	18.52	5.169
19	268	M	20.75	34.18	0.414	19.83	20.112	22.93	1.275	22.53	0.158	20.80	3.010	24.61	0.616	20.23	2.990
	269	M	19.49	33.21	0.340	22.43	1.390	23.01	0.505	21.79	0.111	21.53	0.760	23.76	0.465	20.45	0.248
	270	M	20.66	35.28	0.182	19.32	26.909	21.79	2.639	19.37	1.329	21.30	2.000	22.36	2.751	20.43	0.432
27	301	M	21.04	32.60	1.513	19.13	39.947	23.31	1.197	22.60	0.184	21.71	1.959	23.87	1.257	18.74	2.071
32	323	M	20.65	33.65	0.561	19.95	17.328	23.24	0.963	24.55	0.037	21.53	1.699	23.44	1.297	19.36	1.057
45	373	F	21.57	33.37	1.286	19.97	32.223	23.86	1.181	19.70	1.986	22.04	2.250	23.89	1.790	19.48	2.297
Vitelloni di razza Frisona	K TO 1	M	22.54	38.95	0.046	24.79	1.266	23.62	0.927	24.26	0.079	24.14	1.385	24.87	0.841	20.30	1.376
	K TO 2	M	22.42	35.48	0.471	25.60	0.664	22.92	1.385	22.23	0.295	23.29	2.297	24.87	0.774	20.51	1.094
	K TO 3	M	22.69	38.86	0.054	24.78	1.414	23.72	0.959	22.24	0.354	24.27	1.404	24.13	1.558	20.76	1.110
	K TO 4	M	22.68	45.00	0.001	24.01	2.395	24.53	0.543	22.63	0.268	24.18	1.485	24.74	1.014	20.80	1.072
	K TO 5	M	22.28	42.38	0.004	23.80	2.099	22.89	1.283	22.61	0.206	23.69	1.580	24.43	0.953	19.87	1.548
	K TO 6	M	22.09	34.41	0.785	24.13	1.464	23.19	0.914	24.20	0.060	23.45	1.636	23.90	1.206	20.19	1.087
	K TO 7	M	22.18	37.24	0.117	24.19	1.495	23.31	0.895	21.56	0.398	23.70	1.464	23.79	1.385	20.40	1.000
	K TO 8	M	22.19	35.28	0.462	25.31	0.693	23.52	0.779	22.50	0.209	23.62	1.558	24.50	0.853	19.81	1.516
	K TO 9	M	21.91	45.00	0.000	23.94	1.474	23.03	0.901	20.16	0.871	23.45	1.444	23.87	1.087	19.89	1.181
	K TO 10	M	21.98	37.78	0.070	24.09	1.395	23.53	0.669	22.56	0.173	23.68	1.292	24.36	0.812	19.92	1.214
	K TO 11	M	21.94	35.26	0.392	24.49	1.028	22.88	1.021	22.47	0.179	23.96	1.035	24.55	0.693	20.28	0.920
	K TO 12	M	21.69	33.96	0.815	24.52	0.847	23.50	0.559	21.98	0.212	23.47	1.223	24.25	0.717	20.69	0.582
	K TO 13	M	22.30	34.91	0.642	22.28	6.105	22.77	1.414	22.21	0.275	22.91	2.751	23.85	1.444	19.67	1.803

FEGATO		ACTB		CYP2B22		GSTA1		HSD11B1		CYP2E1		SULT1A1		RXRa		CYP3A	
Grp	ID	S	Cp	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ
Vitelloni di razza Marchigiana	K 1 PD	M	21.52	31.70	3.458	24.33	0.859	23.40	0.532	21.83	0.209	22.95	1.558	23.91	0.807	19.37	1.292
	K 2 PD	M	19.99	36.29	0.050	23.57	0.503	22.16	0.435	20.46	0.187	22.86	0.574	22.80	0.603	19.66	0.366
	K 3 PD	M	21.29	36.73	0.090	23.73	1.110	22.11	1.110	20.20	0.551	22.97	1.310	23.82	0.732	19.29	1.165
	K 4 PD	M	20.41	36.91	0.043	24.34	0.395	22.40	0.493	21.72	0.104	23.23	0.595	23.65	0.448	19.85	0.429
	K 5 PD	M	21.27	35.10	0.275	23.46	1.320	22.40	0.895	28.84	0.001	22.36	1.972	23.50	0.901	18.96	1.444
	K 6 PD	M	20.95	31.58	2.532	23.22	1.248	22.17	0.841	20.25	0.420	22.70	1.248	22.96	1.050	18.78	1.310
	K 7 PD	M	22.20	34.35	0.883	25.73	0.521	24.12	0.518	26.49	0.013	24.53	0.835	24.96	0.624	20.34	1.057
	K 8 PD	M	18.84	30.59	1.165	21.96	0.693	20.66	0.555	17.77	0.543	21.18	0.829	21.64	0.607	17.24	0.883
	K 9 PD	M	20.87	34.95	0.232	24.37	0.532	22.49	0.637	19.96	0.486	23.14	0.871	23.75	0.574	19.60	0.702
Vitelloni incroci di razze francesi da carne	K 7 DE	M	20.60	32.40	1.125	23.76	0.674	21.71	0.908	19.86	0.432	23.10	0.742	23.65	0.511	19.52	0.616
	K 8 DE	M	21.62	32.15	2.713	22.79	2.676	22.51	1.057	20.05	0.768	23.39	1.231	22.81	1.853	19.94	0.933
	K 9 DE	M	20.95	32.52	1.320	23.21	1.257	22.12	0.871	19.76	0.590	23.10	0.946	22.74	1.223	18.76	1.329
	K 10 DE	M	21.79	32.71	2.071	22.85	2.888	22.86	0.933	23.60	0.074	23.49	1.292	22.92	1.932	18.90	2.158
	K 11 DE	M	21.80	35.46	0.310	23.74	1.569	22.16	1.526	21.49	0.321	23.26	1.526	23.43	1.366	18.95	2.099
	K 12 DE	M	23.30	33.14	4.377	25.12	1.705	23.62	1.569	20.87	1.395	24.99	1.301	24.97	1.329	21.36	1.117
	K 23 DE	M	21.85	35.54	0.304	23.73	1.636	22.25	1.485	21.39	0.356	23.51	1.329	23.11	1.765	19.25	1.765
	K 24 DE	M	20.91	36.57	0.077	23.23	1.206	22.33	0.732	20.99	0.245	23.21	0.853	23.37	0.768	19.15	0.986
Vitelloni di razza Valdostana	K 11	M	21.76	36.66	0.131	23.77	1.495	22.76	0.979	22.42	0.164	23.56	1.206	23.88	0.973	19.86	1.087
	K 75	M	21.92	35.06	0.444	23.88	1.548	22.58	1.240	19.45	1.434	23.44	1.464	23.25	1.682	19.63	1.424
	K 105	M	20.58	36.22	0.079	24.60	0.371	22.52	0.511	21.91	0.103	23.06	0.753	23.38	0.607	19.68	0.543
	K 428	M	21.98	37.76	0.071	24.97	0.758	23.50	0.683	22.63	0.165	24.94	0.540	24.63	0.674	20.76	0.678
	K 759	M	19.74	36.08	0.048	23.84	0.351	22.70	0.252	22.98	0.027	23.36	0.342	23.33	0.351	19.40	0.369
	K 869	M	21.84	35.42	0.328	23.96	1.385	22.22	1.505	22.38	0.178	22.98	1.905	22.97	1.932	19.35	1.636

FEGATO		ACTB		CYP2B22		GSTA1		HSD11B1		CYP2E1		SULT1A1		RXRa		CYP3A	
Grp	ID	S	Cp	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ
Vitelloni di incroci di razze da carne	K 0 b	M	22.21	35.74	0.340	25.27	0.722	23.45	0.829	21.91	0.319	23.88	1.320	23.85	1.357	19.61	1.765
	K 00 b	M	22.50	40.26	0.018	25.89	0.574	23.74	0.829	20.64	0.940	24.14	1.347	23.80	1.717	20.51	1.157
	K 1 b	M	22.08	37.56	0.088	24.95	0.824	23.28	0.853	19.89	1.181	23.75	1.320	23.55	1.526	19.21	2.129
	K 2 b	M	21.98	39.31	0.024	24.63	0.959	23.18	0.853	19.53	1.414	23.73	1.248	23.30	1.693	19.55	1.569
	K 3 b	M	21.90	35.04	0.444	23.71	1.717	22.43	1.357	19.99	0.973	23.15	1.765	23.42	1.474	19.27	1.803
	K 4 b	M	21.73	36.56	0.138	24.76	0.737	23.39	0.620	20.16	0.768	24.41	0.655	23.26	1.464	19.72	1.173
	K 5 b	M	22.50	34.18	1.227	25.22	0.914	23.35	1.087	20.16	1.310	24.68	0.927	24.64	0.959	19.76	1.945
	K 6 b	M	21.35	34.65	0.399	23.99	0.966	23.50	0.441	19.79	0.763	24.22	0.574	23.75	0.801	20.69	0.460
<b>CAL</b>			22.70	34.67	1	25.29	1	23.67	1	20.75	1	24.77	1	24.78	1	20.92	1

**Tabella A-2:** Tabella contenente i Cp e i coefficienti di espressione genica (RQ) ricavati dall'analisi del fegato, calcolati secondo il metodo Livak (vedi paragrafo 3.4.4.2).  
 Legenda: Grp = partita; ID = codice del campione; S = sesso dell'animale.

TESTICOLO		ACTB		HSD3B		HSD17B3		CYP17		CYP3A		MR		GSTA1		HSD11B1		HSD11B2	
Grp	ID	Cp	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	
5	21	19.29	25.61	0.865	25.0	1.434	24.93	0.578	20.70	3.580	24.42	0.959	21.55	1.165	32.10	0.529	31.22	0.993	
	22	18.62	25.30	0.901	24.2	1.516	24.61	0.454	21.47	2.250	23.60	1.064	21.44	0.790	31.74	0.426	30.62	0.946	
7	28	19.55	26.83	0.595	26.6	0.559	25.87	0.361	20.87	2.514	25.09	0.722	22.25	0.859	31.90	0.727	33.03	0.339	
	29	18.45	25.42	0.737	24.8	0.901	24.03	0.603	20.72	1.778	24.59	0.476	19.79	2.204	32.95	0.164	32.11	0.299	
	30	18.41	25.67	0.603	24.5	1.079	24.91	0.319	21.36	1.919	24.19	0.611	19.75	2.204	32.37	0.238	32.00	0.314	
	31	18.65	26.89	0.306	26.6	0.291	24.42	0.529	20.52	1.454	25.38	0.316	21.79	0.633	31.18	0.644	32.46	0.270	
9	36	18.27	25.55	0.595	24.8	0.774	24.27	0.451	19.38	2.000	24.11	0.586	20.75	1.000	32.40	0.212	30.93	0.599	
	37	19.75	26.55	0.829	25.6	1.257	25.37	0.586	22.61	12.295	25.40	0.669	21.62	1.526	32.86	0.429	33.48	0.285	
	38	17.72	24.54	0.818	23.9	1.035	22.34	1.173	19.27	0.321	23.52	0.603	19.29	1.879	30.65	0.488	30.85	0.432	
	39	16.90	21.86	2.969	23.5	0.742	21.30	1.366	18.52	1.840	22.84	0.547	18.38	2.000	30.59	0.287	29.99	0.444	
13	49	18.58	24.59	1.434	24.4	1.329	23.22	1.157	19.89	9.918	22.55	2.144	20.64	1.338	31.90	0.371	30.99	0.712	
	50	17.28	22.92	1.853	23.6	0.889	21.79	1.266	18.82	1.558	22.29	1.042	19.57	1.141	28.64	1.444	29.76	0.678	
	51	17.42	24.84	0.540	24.0	0.785	23.02	0.595	19.42	3.605	22.98	0.712	20.60	0.616	30.17	0.551	31.27	0.262	
	52	18.18	24.70	1.007	24.8	0.768	23.92	0.540	19.25	4.028	23.00	1.189	20.65	1.007	30.90	0.564	31.59	0.356	
	246	16.79	22.29	2.042	22.3	1.636	19.99	3.138	20.41	0.774	21.89	0.979	17.79	2.789	30.91	0.213	29.97	0.418	
	247	17.31	22.29	2.928	23.2	1.206	20.46	3.249	19.42	2.204	22.63	0.841	18.78	2.014	30.54	0.395	31.40	0.222	
14	54	18.21	25.60	0.551	24.7	0.796	23.61	0.683	19.57	3.706	23.78	0.707	21.41	0.607	31.60	0.354	31.96	0.281	
	56	19.91	26.59	0.901	26.8	0.629	24.68	1.057	21.70	2.751	24.93	1.035	22.45	0.959	33.20	0.379	32.98	0.451	
	57	17.77	24.79	0.712	24.2	0.865	23.60	0.507	19.55	2.770	24.00	0.448	20.96	0.611	30.97	0.405	31.67	0.253	
	248	16.44	21.76	2.313	25.5	0.142	22.56	0.415	22.49	0.144	21.83	0.801	18.86	1.042	30.58	0.211	30.11	0.297	
15	58	17.28	23.76	1.035	23.7	0.829	22.45	0.801	18.49	4.112	22.29	1.042	20.49	0.603	30.40	0.428	30.24	0.486	
	60	16.74	23.40	0.914	22.4	1.454	22.60	0.497	18.39	3.031	22.35	0.688	18.61	1.526	30.23	0.330	29.44	0.582	
	61	19.49	26.34	0.801	24.9	1.670	25.32	0.507	21.90	1.790	25.53	0.511	21.73	1.181	32.54	0.448	32.90	0.356	

TESTICOLO		ACTB	HSD3B		HSD17B3		CYP17		CYP3A		MR		GSTA1		HSD11B1		HSD11B2	
Grp	ID	Cp	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ
17	260	17.81	23.77	1.485	24.0	1.000	22.84	0.883	19.72	2.532	22.78	1.072	19.26	2.042	31.55	0.277	31.06	0.398
	261	17.64	22.98	2.282	22.7	2.129	21.86	1.548	19.83	2.085	22.62	1.064	19.30	1.765	31.56	0.481	30.00	0.737
18	263	17.77	24.41	0.927	23.7	1.173	22.91	0.818	20.31	1.636	22.40	1.357	19.91	1.266	31.11	0.717	30.50	0.570
	264	19.00	23.68	3.605	24.5	1.602	22.26	3.010	22.34	0.940	23.99	1.057	20.63	1.803	32.71	0.557	31.24	0.801
	265	19.21	25.46	1.214	25.7	0.824	24.87	0.570	21.72	1.670	25.32	0.486	22.13	0.737	33.20	0.459	32.55	0.374
	266	19.55	26.44	0.779	24.6	2.250	25.61	0.432	21.46	2.532	25.43	0.570	22.21	0.883	33.49	0.473	32.70	0.426
19	268	17.39	23.95	0.979	23.0	1.495	22.93	0.620	20.52	1.087	23.30	0.559	19.59	1.214	30.26	0.993	30.06	0.595
	269	17.60	23.53	1.516	22.8	1.959	22.51	0.959	20.73	1.087	23.22	0.683	18.41	3.182	30.87	0.755	30.40	0.543
	270	17.21	23.14	1.516	23.5	0.940	21.16	1.866	20.71	0.841	22.73	0.732	17.98	3.272	30.59	0.700	30.05	0.529
22	73	17.67	23.49	1.636	24.4	0.669	22.49	1.021	18.69	4.691	22.76	0.986	19.30	1.803	31.33	0.574	30.77	0.441
24	74	18.66	24.50	1.613	24.7	1.102	23.72	0.865	18.97	7.674	23.93	0.871	20.36	1.717	32.27	0.595	31.34	0.590
	75	17.72	23.87	1.301	24.3	0.758	23.19	0.651	19.35	3.074	23.83	0.486	20.55	0.785	31.23	0.639	31.51	0.274
	76	18.89	24.67	1.682	25.3	0.847	24.54	0.574	21.96	1.133	24.55	0.664	20.26	2.158	33.64	0.270	32.71	0.268
25	77	18.52	26.48	0.371	25.6	0.543	25.04	0.198	21.68	0.570	24.31	0.607	23.46	0.182	32.12	0.599	31.73	0.409
	78	17.77	24.79	0.712	24.0	0.986	23.47	0.555	20.93	1.064	23.34	0.707	19.82	1.347	31.70	0.476	29.40	1.223
	79	17.61	24.69	0.683	23.5	1.248	23.66	0.435	20.77	1.064	22.30	1.301	19.66	1.347	30.58	0.927	30.29	0.590
26	81	17.31	23.36	1.395	23.3	1.125	22.43	0.829	19.62	1.919	22.39	0.993	19.68	1.079	30.12	1.035	29.99	0.590
	82	17.98	24.38	1.094	24.7	0.697	23.09	0.835	21.82	0.664	23.58	0.693	19.49	1.959	33.86	0.123	31.38	0.358
27	301	16.98	23.81	0.812	22.8	1.338	23.42	0.332	21.56	0.398	22.24	0.877	18.44	2.028	31.06	0.429	29.96	0.480
32	323	17.70	24.68	0.732	23.7	1.165	22.40	1.110	21.53	0.669	23.65	0.543	20.37	0.877	31.83	0.415	31.18	0.339
53	168	18.93	23.99	2.770	24.4	1.693	22.56	2.329	20.35	3.555	23.75	1.189	19.79	3.074	31.56	1.173	31.26	0.753
	174	17.33	23.70	1.117	23.8	0.818	21.54	1.558	19.80	1.717	22.45	0.966	19.90	0.940	31.14	0.518	29.90	0.637
	175	18.36	24.75	1.102	24.9	0.796	24.27	0.480	22.25	0.642	23.75	0.801	20.89	0.966	31.82	0.662	31.22	0.521
	176	17.66	24.48	0.818	24.0	0.877	22.96	0.732	19.84	2.099	23.54	0.570	21.61	0.361	31.11	0.667	30.59	0.497

TESTICOLO		ACTB		HSD3B		HSD17B3		CYP17		CYP3A		MR		GSTA1		HSD11B1		HSD11B2	
Grp	ID	Cp	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	
Vitelloni di razza Frisona	K TO 1	18.69	25.33	1.219	25.0	1.749	27.23	0.092	26.40	0.057	28.45	0.047	24.35	0.131	35.67	0.083	35.32	0.047	
	K TO 2	23.48	30.97	0.676	29.6	1.939	26.56	4.042	24.83	4.643	27.08	3.376	23.69	5.717	35.11	3.366	34.25	2.716	
	K TO 3	20.80	26.66	2.093	25.6	4.776	26.44	0.686	24.85	0.715	27.48	0.399	23.89	0.777	34.69	0.704	33.88	0.550	
	K TO 4	20.55	28.21	0.602	27.6	0.992	26.48	0.562	25.19	0.476	26.85	0.521	23.19	1.063	34.95	0.495	33.84	0.475	
	K TO 5	21.27	27.46	1.667	27.2	2.185	27.34	0.510	25.45	0.654	27.62	0.503	23.91	1.063	34.33	1.254	34.51	0.491	
	K TO 6	22.62	29.65	0.930	28.9	1.772	26.21	2.839	24.82	2.576	27.37	1.521	23.17	4.517	34.94	2.089	33.66	2.248	
	K TO 7	18.83	25.16	1.510	24.9	1.938	27.65	0.076	25.50	0.116	28.00	0.071	24.21	0.159	35.34	0.114	34.48	0.092	
	K TO 8	21.52	29.16	0.609	27.6	1.992	26.68	0.956	23.97	2.165	27.03	0.898	24.07	1.129	34.07	1.782	34.13	0.761	
	K TO 9	18.73	25.97	0.804	25.6	1.137	26.64	0.142	24.77	0.180	27.87	0.073	24.11	0.159	35.14	0.122	34.75	0.072	
	K TO 10	22.48	29.44	0.977	28.8	1.642	25.69	3.695	23.73	4.978	26.88	1.940	22.86	5.083	34.41	2.728	33.04	3.136	
	K TO 11	19.18	26.32	0.859	25.3	1.921	26.45	0.221	24.85	0.232	26.75	0.215	23.90	0.250	34.20	0.321	33.68	0.205	
	K TO 12	19.12	25.90	1.110	25.5	1.603	26.59	0.194	25.29	0.165	27.19	0.153	23.91	0.240	35.01	0.176	34.03	0.155	
	K TO 13	19.50	26.36	1.048	25.8	1.690	26.77	0.222	24.86	0.289	27.59	0.150	23.63	0.378	35.17	0.204	34.67	0.129	
Vitelloni di razza Marchigiana	K 1 PD	20.99	27.89	1.019	26.9	2.200	28.85	0.147	25.78	0.429	28.81	0.181	25.31	0.332	36.61	0.212	36.26	0.120	
	K 2 PD	20.09	27.61	0.662	26.3	1.858	27.25	0.239	26.39	0.150	28.38	0.131	25.23	0.187	36.08	0.163	35.25	0.130	
	K 3 PD	19.16	26.84	0.594	26.1	1.100	28.53	0.052	25.59	0.138	27.66	0.113	24.44	0.171	37.21	0.039	34.49	0.116	
	K 4 PD	20.63	28.51	0.516	27.7	1.031	28.93	0.108	27.13	0.131	29.56	0.084	30.01	0.010	37.94	0.066	36.30	0.091	
	K 5 PD	23.09	30.31	0.819	29.7	1.358	27.39	1.743	25.36	2.464	27.83	1.538	23.76	4.173	35.04	2.713	35.03	1.215	
	K 6 PD	20.82	27.66	1.062	27.5	1.354	28.36	0.184	25.11	0.606	29.47	0.102	26.26	0.153	38.43	0.054	35.69	0.159	
	K 7 PD	23.74	32.44	0.292	32.2	0.378	26.69	4.427	24.97	5.050	29.33	0.851	25.88	1.501	36.73	1.313	35.44	1.428	
	K 8 PD	22.59	31.00	0.358	30.7	0.479	27.14	1.461	24.36	3.474	27.69	1.195	25.41	0.937	36.21	0.850	34.88	0.949	
	K 9 PD	21.00	27.24	1.609	26.8	2.405	27.56	0.363	32.52	0.004	29.18	0.141	25.40	0.313	38.14	0.074	35.58	0.193	

TESTICOLO		ACTB		HSD3B		HSD17B3		CYP17		CYP3A		MR		GSTA1		HSD11B1		HSD11B2	
Grp	ID	Cp	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	Cp	RQ	
Vitelloni incroci di razze francesi da carne	K 7 DE	20.00	27.94	0.497	28.1	0.500	26.07	0.511	24.25	0.625	27.12	0.296	23.57	0.559	35.05	0.316	33.82	0.329	
	K 8 DE	22.80	29.57	1.118	30.6	0.620	26.52	2.605	24.74	3.098	26.50	3.163	23.99	2.910	35.72	1.387	33.68	2.527	
	K 9 DE	20.72	28.93	0.410	27.6	1.144	28.59	0.146	25.39	0.464	27.27	0.436	25.80	0.195	36.13	0.244	33.84	0.533	
	K 10 DE	19.49	27.31	0.537	27.2	0.630	26.88	0.203	24.91	0.276	27.47	0.162	23.16	0.519	33.77	0.534	34.25	0.171	
	K 11 DE	19.55	26.60	0.919	26.7	0.952	26.92	0.207	25.16	0.243	27.35	0.184	24.56	0.206	36.78	0.070	33.99	0.213	
	K 12 DE	19.13	28.40	0.197	28.1	0.269	26.69	0.181	25.25	0.170	27.12	0.161	24.79	0.131	36.10	0.083	34.09	0.149	
	K 23 DE	21.67	29.82	0.429	28.7	1.007	26.32	1.366	24.67	1.485	26.65	1.301	24.57	0.889	35.59	0.692	33.11	1.720	
	K 24 DE	22.72	30.46	0.568	29.5	1.226	26.38	2.701	23.58	6.514	26.86	2.319	23.97	2.777	36.12	0.988	33.26	3.187	
Vitelloni di razza Valdostana	K 11	20.98	29.11	0.435	26.9	2.188	28.97	0.135	25.17	0.650	27.80	0.363	25.34	0.323	35.96	0.330	34.87	0.315	
	K 75	21.79	30.62	0.267	30.1	0.431	27.14	0.838	24.08	2.419	27.42	0.826	24.56	0.969	34.74	1.351	33.85	1.114	
	K 105	18.97	26.79	0.539	25.6	1.364	29.00	0.033	26.28	0.075	27.87	0.086	25.78	0.059	35.87	0.088	34.96	0.073	
	K 428	19.78	26.64	1.050	25.7	2.299	27.69	0.143	24.48	0.457	27.34	0.218	26.22	0.076	34.84	0.314	33.94	0.261	
	K 759	20.00	27.75	0.564	26.7	1.304	27.45	0.195	25.11	0.342	27.49	0.227	23.78	0.481	34.68	0.406	34.59	0.192	
	K 869	22.56	29.45	1.024	29.0	1.585	26.40	2.386	24.65	2.778	26.89	2.034	23.40	3.692	35.23	1.633	33.98	1.734	
Vitelloni di incroci di razze da carne	K 0 b	21.18	25.73	5.177	34.3	0.015	24.63	3.121	32.88	0.004	28.53	0.250	22.29	3.057	38.18	0.081	33.95	0.679	
	K 00 b	19.07	22.61	10.424	32.3	0.014	23.63	1.446	31.90	0.002	28.47	0.060	21.70	1.066	36.91	0.045	33.45	0.222	
	K 1 b	18.25	22.66	5.727	29.9	0.041	25.61	0.208	32.11	0.001	28.28	0.039	22.30	0.400	36.72	0.029	34.49	0.061	
	K 2 b	18.65	25.93	0.785	30.9	0.027	26.19	0.184	31.77	0.001	27.76	0.074	22.73	0.393	37.91	0.017	33.74	0.137	
	K 3 b	20.78	24.78	7.587	34.4	0.010	23.58	4.902	31.87	0.005	28.12	0.252	20.94	5.911	35.76	0.331	32.64	1.274	
	K 4 b	21.43	27.23	2.177	35.0	0.011	23.41	8.648	31.22	0.013	27.77	0.504	21.24	7.528	35.54	0.603	33.45	1.139	
	K 5 b	19.57	25.12	2.590	28.6	0.261	25.54	0.545	31.30	0.003	27.35	0.186	22.82	0.694	36.23	0.103	34.06	0.206	
	K 6 b	19.34	25.26	2.004	32.6	0.014	25.15	0.608	30.83	0.004	27.48	0.145	22.75	0.621	35.64	0.132	32.56	0.497	
CAL		20.05	26.98	1	27.1	1	25.15	1	23.62	1	25.41	1	22.78	1	33.44	1	32.27	1	

## Bibliografia

**Amann, RP e Seidel, GE Jr. 2007.** Testis development, beef consumption and study methods. *Human Reproduction*. 2007, 22, p. 2572 - 2573.

**Becker, C, et al. 2011.** Influence of anabolic combinations of an androgen plus an estrogen on biochemical pathways in bovine uterine endometrium and ovary. *Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2011, 125, p. 192 - 201.

**Bergkvist, A, et al. 2010.** Gene expression profiling - Cluster of possibilities. *Methods*. 2010, 50, p. 323 - 335.

**Biasotto, S, et al. 2010.** *Italia a tavola 2010 - VII rapporto sulla sicurezza alimentare*. Movimento Difesa del Cittadino & Legambiente, 2010. [http://www.legambiente.it/sites/default/files/docs/Rapporto\\_Italia\\_a\\_tavola\\_2010\\_embargo\\_ore\\_11\\_17\\_settembre\\_0000001655.pdf](http://www.legambiente.it/sites/default/files/docs/Rapporto_Italia_a_tavola_2010_embargo_ore_11_17_settembre_0000001655.pdf).

**Biolatti, B, et al. 2003.** Lo screening istologico nella prevenzione dell'uso di anabolizzanti nel bovino. *Large Animal Review*. 2003, 9, p. 9 - 19.

**Blum, JW e Flueckiger, N. 1988.** Early metabolic and endocrine effects of periorally administered beta-adrenoceptor agonists in calves. *European journal of pharmacology*. 1988, 151, p. 177 - 187.

**Bridges, JW e Bridges, O. 2001.** Hormones as growth promoters: the precautionary principle or a political risk assessment? [aut. libro] P Harremoës, et al. [a cura di] European Environment Agency. *Late lessons from early warnings: the precautionary principle 1896-2000 [Environmental issue report No.22]*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2001, 14.

**Calvarese, S, et al. 1994.** Experimental administration of 19-nortestosterone and dexamethasone in cattle: elimination of the two drugs in different biological matrices. *The analyst*. 1994, 119, p. 2611 - 2615.

**Camera di Commercio di Modena. 2011.** Carni bovine fresche macellatore/dettagliante. *Borsa merci di Modena*. [Online] 26 settembre 2011. [Riportato: 26 settembre 2011] <http://www.borsamercimodena.it/>.

**Cannizzo, FT, et al. 2011.** Effect of low-dose dexamethasone and prednisolone long term administration in beef calf: chemical and morphological investigation. *Analitica Chimica Acta*. 2011, 700, p. 95 - 104.

**Cantiello, M, et al. 2008.** Cytochrome P450 inhibition profile in liver of veal calves administered a combination of 17 $\beta$ -estradiol, clenbuterol and dexamethasone for growth-promoting purposes. *Food and Chemical Toxicology*. 2008, 46, p. 2849 - 2855.

**Cantiello, M, et al. 2009.** Effects of dexamethasone, administered for growth promoting purposes, upon the hepatic cytochrome P450 3A expression in the veal calf. *Biochemical Pharmacology*. 2009, 77, p. 451 - 463.

**Capolongo, F, et al. 2007.** Illicit treatments in cattle and urinary 6 $\beta$ -hydroxycortisol/cortisol ratio. *Analitica Chimica Acta*. 2007, 589, p. 228 - 232.

**Carraro, L, et al. 2009.** Expression profiling of skeletal muscle in young bulls treated with steroidal growth promoters. *Physiological Genomics*. 2009, 38, p. 138 - 148.

**Castagnaro, M e Poppi, L. 2006.** Indirect biomarkers of illegal anabolic treatments: five years of activity under the microscope. *Veterinary Research Communications*. 2006, Vol. Suppl. 1, 30, p. 105 - 108.

**Cocumelli, C, et al. 2008.** Piano Nazionale Residui - Test isologico: l'esperienza di un anno nelle regioni Lazio e Toscana. [Online] 2008. [Riportato: 03 Settembre 2011.] [http://195.45.99.79/csra/documenti\\_allegati/sidilv/residui.pdf](http://195.45.99.79/csra/documenti_allegati/sidilv/residui.pdf).

**Condon, LW. 1998.** The WTO dispute between the United States and the European Union involving growth-promoting hormones: an abbreviated history. *American Meat Institute*. [Online] 24 June 1998. [Riportato: 17 October 2010.] <http://www.meatami.com/ht/d/sp/i/1485/pid/14851%20di>.

**CONTAM Panel. 2007.** Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain (CONTAM) related to hormone residues in bovine meat and meat products. *The EFSA Journal*. 2007, 510, p. 1 - 62. doi:10.2903/j.efsa.2007.510 .

**Corpet, F. 1988.** Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acid Research*. 1988, Vol. 16, 22, p. 10881 - 10890.

**Courtheyn, D, et al. 2002.** Recent developments in the use and abuse of growth promoters. *Analitica Chimica Acta*. 2002, 473, p. 71 - 82.

**Dacasto, M, et al. 2005.** Effect of breed and gendre on bovine liver cytochrome P450 3A (CYP3A) expression and inter-species comparison with other domestic ruminants. *Veterinary research*. 2005, 36, p. 179 - 190.

**Dacasto, M, et al. 2009.** The steroidogenic enzyme 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase as a potential new molecular biomarker of growth promoters abuse in cattle breeding. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 2009, 32, p. 258 - 259.

**De Brabander, H F, et al. 2007.** Past, present and future of mass spectrometry in the analysis of residues of banned substances in meat-producing animals. *Journal of Mass Spectrometry*. 2007, 42, p. 983 - 998.

**De Maria, R, et al. 2009.** 17beta-oestradiol-induced gene expression in cattle prostate: biomarkers to detect illegal use of growth promoters. *The veterinary record*. 2009, 164, p. 459 - 464.

**Della Donna, L, et al. 2009.** A food safety control low mass-range proteomics platform for the detection of illicit treatments in veal calves by MALDI-TOF-MS serum profiling. *Biotechnology journal*. 2009, 4, p. 1596 - 1609.

**DG SANCO. 1999.** Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health (SCVPH): assessment of potential risks to human health from hormone residues in bovine meat and meat products (30 April 1999). *Food Safety - From Farm to Fork*. [Online] 30 April 1999. [Riportato: 20 August 2011] [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out21\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out21_en.pdf).

—. **2002.** Opinion of the SCVPH on "Review of previous SCVPH opinions of 30 April 1999 and 3 May 2000 on the potential risks to human health for hormone residues in bovine meat and meat products" adopted April 2002. [Online] 10 April 2002. [Riportato: 07 November 2010.] [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out50\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out50_en.pdf).

**EFSA. 2011.** Uno studio previsionale sulle tecnologie emergenti: lo stato dell'arte delle tecnologie omiche e le potenziali applicazioni nella sicurezza degli alimenti e dei mangimi. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea*. 2011, 2011/S 131-216732. Codice di riferimento: CFT/EFSA/EMRISK/2011/02.

**European Commission. 2002.** Commission Decision 657/2002/CE of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of

analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*. 2002, L 221, p. 8 - 36.

**European Council. 1981.** Council Directive 81/602/EEC of 31 July 1981 concerning the prohibition of certain substances having a hormonal action and of any substances having a thyrostatic action. *Official Journal of the European Communities*. 1981, L. 222, p. 32 - 33.

— **1988.** Council Directive 88/146/EEC of 7 March 1988 prohibiting the use in livestock farming of certain substances having a hormonal action. *Official Journal of the European Communities*. 1988, L. 70, p. 16 - 18.

— **1988.** Council Directive 88/299/EEC of 17 May 1988 on trade in animals treated with certain substances having a hormonal action and their meat, as referred to Article 7 of Directive 88/146/EEC. *Official Journal of the European Communities*. 1988, L. 128, p. 36 - 38.

— **1990.** Council Regulation (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment maximum residue limits of veterinary medical products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Communities*. 1990, L. 224, p. 1 - 8.

— **1996.** Council Directive 96/22/EC of 29 April 1996 concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of  $\beta$ -agonists, and repealing Directives 81/602/EEC, 88/146/EEC and 88/299/EEC. *Official Journal of the European Communities*. 1996, L 125, p. 3 - 9.

— **1996.** Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decision 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Official Journal of the European Communities*. 1996, L 125, p. 10 - 32.

— **2003.** Directive 2003/74/EC of the European Parliament and of the Council amending Council Directive 96/22/EC concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists. *Official Journal of the European Communities*. 2003, L 262, p. 17 - 21.

**European Union. 2010.** Commission Staff Working Paper on the Implementation of National Residue Monitoring Plans in the Member States in 2008. *Food Safety - From*

*the Farm to the Fork*. [Online] 2010. [Riportato: 07 November 2010.] [http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/workdoc\\_2008\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/workdoc_2008_en.pdf).

—. **2007**. Hormones in Meat - Introduction. *EUROPA - Food Safety - Chemical Safety of Food - Food Contaminants*. [Online] 04 Dicembre 2007. [Riportato: 15 Dicembre 2010.] [http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/hormones/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/hormones/index_en.htm).

—. **2003**. Reflection Paper on Residues in foodstuffs of animal origin. *Food Safety - From the Farm to the Fork*. [Online] November 2003. [Riportato: 07 November 2010.] [http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/residues\\_paper\\_2003\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/residues_paper_2003_en.pdf).

**Falaschini, A, et al. 2005**. La resa al macello nella razza romagnola., *4<sup>th</sup> World Italian Beef Cattle Congress, Italy*, 2005.

**Ferranti, C, et al. 2011**. Studies on the presence of natural and synthetic corticosteroids in bovine urine. *Steroids*. 2011. doi:10.1016/j.steroids.2011.02.044.

**Fleige, S e Pflaff, MW. 2006**. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006, 27, p. 126 - 139.

**Gardini, G, et al. 2006**. Proteomic investigation in the detection of the illicit treatment of calves with growth-promoting agents. *Proteomics*. 2006, 6, p. 2813 - 2822.

**Giantin, M, et al. 2008**. Effect of breed upon cytochromes P450 and phase II enzyme expression in cattle liver. *Drug metabolism and disposition*. 2008, 36, p. 885 - 893.

**Giantin, M, et al. 2010**. Effects of illicit dexamethasone upon hepatic drug metabolising enzymes and related trascription factors mRNAs and their potential use as biomarkers in cattle. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010, 58, p. 1342 - 1349.

**Girolami, F, et al. 2010**. Impiego illecito del desametasone nei bovini da carne: rationale, effetti negli animali trattati e metodologie diagnostiche tradizionali ed innovative. *Large Animal Review*. 2010, 16, p. 113 - 124.

**Hunter, RA, et al. 1993**. Increasing annual growth rates of cattle by reducing maintenance energy requirements. *Australian journal of agricultural research*. 1993, 44, p. 579 - 595.

**IARC. 1987.** Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs Volumes 1 to 42. *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to human*. 1987, Supplement 7, p. 96 - 97.

**Kuiper, HA, et al. 1998.** Illegal use of beta-adrenergic agonists: European Community. *Journal of animal science*. 1998, 76, p. 195 - 207.

**Life Technologies Corporation. 2010.** *RNAlater® Tissue Collection: RNA Stabilization Solution Protocol*. Carlsbad, California, 2010. Rev E.

—. **2010.** *TRIzol® reagent*. Carlsbad, California, 2010. Rev 15 Nov 2010.

**Livak, KJ e Schmittgen, TD. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001, 25, p. 402 - 408.

**Lopparelli, RM, et al. 2010.** Constitutive expression of drug metabolizing enzymes and related transcription factors in cattle testis and their modulation by illicit steroids. *Xenobiotica*. 2010, 40, p. 670 - 680.

**Lopparelli, RM, et al. 2011.** Steroidogenic enzyme gene expression profiles in the testis of cattle treated with illicit growth promoters. *Steroids*. 2011, 76, p. 508 - 516.

**Lopparelli, RM, et al. 2011.** Target gene expression signatures in neutrophils and lymphocytes from cattle administered with dexamethasone at growth promoting purposes. *Research in veterinary science*. 2011. doi:10.1016/j.rvsc.2011.07.004.

**Ludwig, JA e Weinstein, JN. 2005.** Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nature reviews. Cancer*. 2005, 5, p. 845 - 856.

**Manning, CD, Raghavan, P e Schutze, H. 2008.** *Introduction to Information Retrieval*. Cambridge : Cambridge University Press, 2008. <http://nlp.stanford.edu/IR-book/>.

**Marin, A, et al. 2008.** Administration of dexamethasone per os in finishing bulls. II. Effect on blood parameters used as indicators of animal welfare. *Animals*. 2008, 2, p. 1080 - 1086.

**Ministero della Salute. 2008.** *Piano Nazionale per la ricerca dei Residui negli animali e nei prodotti di origine animale - PNR 2008*. 2008.

—. **2011.** *Piano Nazionale per la ricerca dei Residui negli animali e nei prodotti di origine animale - PNR 2011*. 2011.

**Mooney, M H, Le Bizec, B e Elliott, C T. 2009.** Combining biomarker screening and mass-spectrometric analysis to detect hormone abuse in cattle. *Trends in Analytical Chemistry*. 2009, Vol. 28, 6, p. 665 - 675.

**Nebbia, C, et al. 2008.** Use of hepatic protein biomarkers for tracing the exposure of veal calves to illegal growth-promoters: investigation on experimental samples and preliminary application under field conditions. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2008, 31, p. 272 - 275.

**Nebbia, C, et al. 2010.** Novel strategies for tracing the exposure of meat cattle to illegal growth-promoters. *The Veterinary Journal*. 2010, 189, p. 34 - 42.

**Noppe, H, et al. 2008.** Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices. *Analitica Chimica Acta*. 2008, 611, p. 1 - 16.

**Odore, R, et al. 2006.** Changes in lymphocyte glucocorticoid and  $\beta$ -adrenergic receptors in veal calves treated with clenbuterol and steroid hormones for growth-promoting purposes. *Journal of veterinary Pharmacology and therapeutics*. 2006, 29, p. 91 - 97.

**Re, G, Badino, P, Novelli, A e Girardi, C. 1995.** Down-regulation of beta-adrenergic receptors and up-regulation of estrogen and progesterone receptors induced in the veal calves by dietary clenbuterol. *American journal of veterinary research*. 1995, 56, p. 1493 - 1497.

**Regal, P, et al. 2011.** Disturbance of sex steroid serum profile from cattle in response to exogenous estradiol: a screening approach to detect forbidden treatments. *Steroids*. 2011, 76, p. 365 - 375.

**Regione del Veneto. 2008.** Allegato B alla Dgr n. 2888 del 07 ottobre 2008: Iniziative per la sicurezza alimentare delle produzioni venete (2008-2010). *Bollettino Ufficiale Regionale*. 2008, 91.

**Reiter, M, et al. 2007.** Modifications of mRNA expression after treatment with anabolic agents and the usefulness for gene expression biomarkers. *Analytica Chimica Acta*. 2007, 586, p. 73 - 81.

**Riedmaier, I, et al. 2009.** Identification of potential gene expression biomarkers for the surveillance of anabolic agents in bovine blood cells. *Analitica Chimica Acta*. 2009, 638, p. 106 - 113.

**Riedmaier, I, et al. 2009.** The use of -omic technologies for biomarker development to trace functions of anabolic agents. *Journal of Chromatography A*. 2009, 1216, p. 8192 - 8199.

**Rijk, JCW, et al. 2010.** Feasibility of a liver transcriptomic approach to assess bovine treatment with the prohormone dehydroepiandrosterone (DHEA). *BMC Veterinary Research*. 2010, 6. <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/6/44>.

**Roche Applied Science. 2009.** Primer3 settings. *Real-Time PCR System*. [Online] 2009. <http://qpcr.probefinder.com/advanced.jsp>.

—. **2009.** *RealTime ready Universal ProbeLibrary*. Penzberg, Germany : Roche Diagnostics GmbH, 2009.

**Roche Diagnostics Co. 2011.** Universal ProbeLibrary. [Online] 2011. [https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp?id=uplct\\_010000](https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp?id=uplct_010000).

**Roche Diagnostics GmbH. 2008.** *LightCycler® 480 Instrument Operator's Manual Software Version 1.5*. Mannheim : Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science, 2008.

—. **2008.** *LightCycler® 480 Probes Master*. Mannheim : Roche Applied Science, 2008.

**Sauerwein, H e Meyer, HHD. 1989.** Androgen and estrogen receptors in bovine skeletal muscle: relation to steroid-induced allometric muscle growth. *Journal of animal science*. 1989, 67, p. 206 - 212.

**Scarth, JP, et al. 2011.** Detection of endogenous steroid abuse in cattle: results from population studies in the UK. *Food additives & contaminants. Part A: Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*. 2011, 28, p. 44 - 61.

**Schoor, O, et al. 2003.** Moderate degradation does not preclude microarray analysis of small amounts of RNA. *BioTechniques*. 2003, 35, p. 1192 - 1201.

**Shi, J e Luo, z. 2010.** Nonlinear dimensionality reduction of gene expression data for visualization and clustering analysis of cancer tissue samples. *Computers in Biology and Medicine*. 2010, 40, p. 723 - 732.

**Sigma-Aldrich Co. 2008.** *qPCR Technical Guide*. 2008.

**Sillence, M N. 2004.** Technologies for the control of fat and lean deposition in livestock. *The Veterinary Journal*. 2004, 167, p. 242 - 257.

**Smith, DJ e Paulson, GD. 1997.** Distribution, elimination, and residues of [14C] clenbuterol-HCl in Holstein calves. *Journal of animal science*. 1997, 75, p. 454 - 461.

**Smith, LI. 2002.** A tutorial on Principal Components Analysis. *Department of Computer Science of the University of Otago*. [Online] 2002. [http://www.cs.otago.ac.nz/cosc453/student\\_tutorials/principal\\_components.pdf](http://www.cs.otago.ac.nz/cosc453/student_tutorials/principal_components.pdf).

**StatSoft. 2011.** Cluster Analysis. *Electronic Statistics Textbook*. [Online] 2011.

**Stella, R, et al. 2011.** Protein expression changes in skeletal muscle in response to growth promoter abuse in beef cattle. *Journal of proteome reseach*. 2011, 10, p. 2744 - 2757.

**Stephany, RW. 2001.** Hormones in meat: Different approaches in the EU and in the USA. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Sscandinavica Supplementum*. 2001, Vol. 109, 103, p. S357 - S364.

**Swan, SH, et al. 2007.** Semen quality of fertile US males in relation to their mothers' beef consumption during pregnancy. *Human Reproduction*. 2007, 22, p. 1497 - 1502.

**Thermo Scientific. 2009.** T042-Technical bulletin 260/280 and 260/230 Ratios. *NanoDrop Nucleic Acid Purity Ratios*. [Online] 2009. <http://www.phenogenomics.ca/transgenics/docs/NanoDrop%20Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>.

**TNS Opinion & Social - EFSA. 2010.** *Eurobarometro speciale 354 - Rischi associati agli alimenti*. Parma : Ufficio delle pubblicazioni - EFSA, 2010. p. 170. doi: 10.2805/50337.

**Toffolatti, L, et al. 2006.** Expression analysis of androgen-responsive genes in the prostate of veal calves treated with anabolic hormones. *Domestic Animal Endocrinology*. 2006, 30, p. 38 - 55.

**van Miert, AS, et al. 1988.** Effect of trembolone and testosterone on plasma elimination rates of sulfamethazine, trimethoprim and antipyrine in female dwarf goats. *American Journal of Veterinary Research*. 1988, Vol. 49, 12, p. 2060 - 2064.

**Vascellari, M, et al. 2008.** Evaluation of indirect biomarkers for detecting corticosteroids used as illegal growth promoters in beef cattle. *The Veterinary Record*. 2008, 163, p. 147 - 152.

**Wikipedia. 2011.** Indice di correlazione di Pearson. [Online] 2011. [http://it.wikipedia.org/w/index.php?title=Indice\\_di\\_correlazione\\_di\\_Pearson&oldid=43687793](http://it.wikipedia.org/w/index.php?title=Indice_di_correlazione_di_Pearson&oldid=43687793).

**Woerner, DR, et al. 2011.** Effects of sequential implanting and ractopamine hydrochloride supplementation on carcass characteristics and longissimus muscle tenderness of calf-fed steers and heifers. *Journal of Animal Science*. 2011, 89, p. 201 - 209.

**Wong, ML e Medrano, JF. 2005.** Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. 2005, Vol. 39, 1, p. 75 - 85.

**You, L. 2004.** Steroid hormone biotrasformation and xenobiotic induction of hepatic steroid metabolizing enzymes. *Chimico-Biological Interactions*. 2004, 147, p. 233 - 246.

**Zancanella, V, et al. 2009.** Effects of illicit dexamethasone and 17-beta-oestradiol on the expression of hepatic and testicular bovine responsive genes. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 2009, 32, p. 119 - 120.

**Zancanella, V, et al. 2010.** Proposed new nomenclature for Bos taurus cytochromes P450 involved in xenobiotic drug metabolism. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 2010, 33, p. 528 - 536.

## Risorse informatiche

*Center for Biomolecular Science & Engineering of the University of California, Santa Cruz*

<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>

*European Bioinformatics Institute – European Molecular Biology Laboratory e Wellcome Trust Sanger Institute – “Ensembl”*

[http://www.ensembl.org/Bos\\_taurus/Info/Index](http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index)

*European Food Safety Authority (EFSA)*

<http://www.efsa.europa.eu/>

*Gene Quantification*

<http://genex.gene-quantification.info/>

*National Center for Biotechnology Information (NCBI) - Nucleotide*

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>

*National Center for Biotechnology Information (NCBI) - Gene*

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>

*OligoAnalyzer 3.1*

<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/default.aspx>

*Primer 3*

<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>

*ProbeFinder version: 2.45 di Roche Applied Science*

<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp>

*StatSoft®*

<http://www.statsoft.com/>

*U.S. Food and Drug Administration (FDA)*

<http://www.fda.gov/>