

# ALTERAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA IN LEUCOCITI DI ANIMALI TRATTATI CON SOMATOTROPINA RICOMBINANTE: RICERCA DI INDICATORI ISPETTIVI

## ***ALTERATION OF GENE EXPRESSION IN LEUKOCYTES FROM RECOMBINANT SOMATOTROPIN TREATED ANIMALS: SEARCHING FOR INSPECTION INDICATORS***

Castigliengo L.<sup>1</sup>, Armani A.<sup>1</sup>, Grifoni G.<sup>2</sup>, Rosati R.<sup>2</sup>, Mazzi M.<sup>3</sup>, Guidi A.<sup>1</sup>, Gianfaldoni D.<sup>1</sup>, Brizioli NR.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Patologia Animale Profilassi ed Igiene degli Alimenti Università di Pisa

<sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Lazio e Toscana, Roma - <sup>3</sup>Istituto Sperimentale per la Zootecnia, Roma

### **SUMMARY**

Besides immunochemical approaches, biomolecular studies can be carried out in order to discover a greater number of biological indicators to be exploited for the identification of bovines treated with recombinant somatotropin (rbST). With this aim, we analysed the expression of a number of genes related to the somatotropic axis in leucocytes from rbST treated cows and non-treated animals. Significant differences were observed in the genes *IGF-1*, *IGFBP-1*, *IGFBP-4* and the I- 5'UTR variant of the *GHR* gene.

### **Key words**

Cattle, gene expression analysis, recombinant somatotropin.

### **INTRODUZIONE**

La somatotropina bovina ricombinante (rbST) è un ormone peptidico (anche conosciuto come ormone della crescita) sintetizzato su larga scala ed utilizzato nell'industria lattiero-casearia per aumentare la resa nelle bovine da latte o in specie affini (1).

Il veto europeo (Decisione del Consiglio 1999/897/CE) non ha però definitivamente "scoraggiato" l'utilizzo di tale farmaco, come testimoniato da episodi, alcuni dei quali anche di notevole risonanza, in cui preparazioni iniettabili di rbST sono state ritrovate in allevamento. Le difficoltà riscontrate dalla comunità scientifica internazionale nel mettere a punto metodiche analitiche in grado di rilevare il trattamento ha spinto la ricerca ad affrontare il problema tramite svariati approcci sperimentali.

In una precedente fase di sperimentazione ab-

biamo messo a punto un metodo immunoenzimatico, relativo al siero bovino, in grado di amplificare il segnale in presenza di somatotropina ricombinante (2). Attualmente è in corso uno studio biomolecolare che si propone di analizzare le alterazioni di espressione di alcuni geni implicati nella regolazione dell'asse somatotropo in campioni biologici (sangue, latte, mammella, muscolo) provenienti da vacche sperimentalmente trattate con rbST. I geni prescelti sono quelli relativi ad alcune molecole circolanti e ai recettori dei principali mediatori ormonali implicati nella regolazione dell'asse somatotropo, alcuni dei quali possono variare i loro livelli di espressione in risposta alla somatotropina stessa, come osservato in altre specie animali (3). In particolare, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulle varianti al 5'UTR relative al gene codificante il recettore della somatotropina (*GHR*), alle quali è associata una diversa efficienza di traduzione, suggerendone

l'importanza nella regolazione fine della risposta biologica all'ormone della crescita (4). Anche per alcune di queste varianti è stata osservata un'alterata espressione nel fegato di vacche trattate con somatotropina ricombinante (5).

In questo lavoro riportiamo i risultati preliminari relativi alle cellule bianche del sangue al quinto giorno dopo la somministrazione del farmaco.

## MATERIALI E METODI

**Trattamento degli animali:** 5 bovine frisone sono state trattate per la durata di 3 mesi con il farmaco commercializzato dalla LG Life Sciences (500 mg di rbST in preparati monodose a lento rilascio) tramite il protocollo fornito dal produttore (un'iniezione sottocutanea lateralmente alla fossa del fianco, ogni 14 giorni, a partire dalla nona settimana dall'inizio della lattazione). Alle vacche di controllo, in numero di 5, è stata iniettata una soluzione fisiologica placebo.

**Processamento dei campioni:** i campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena giugulare prima del primo pasto giornaliero ed immediatamente processati per l'estrazione dell'RNA, eseguito con PerfectPure RNA Blood Kit -10 (5 Prime, Gaithersburg, MD, US).

**Analisi in real time PCR:** geni prescelti per l'analisi di espressione: *IGF-1*, *IGF-2*, *IGF-R*, *IGFBP-1*, *IGFBP-2*, *IGFBP-3*, *IGFBP-4*, *IGFBP-5*,

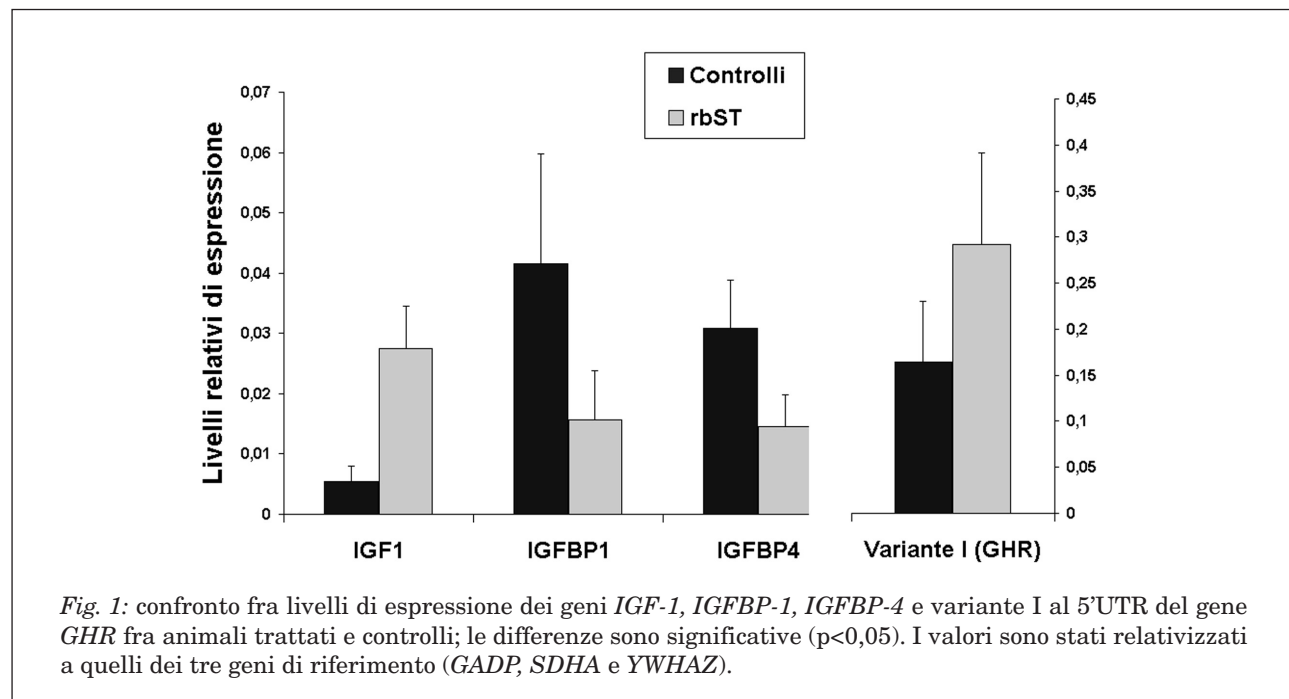
*IGFBP-6*, *ALS*, *GH*, *GHR*, varianti al 5' UTR del gene *GHR* (A, B1, C1, C3, D, E, F, G, H, I). Come geni di riferimento sono stati scelti *GADP*, *YWHAZ*, *SDHA*.

I primer sono stati disegnati elaborando le sequenze presenti nel database GenBank tramite il software Beacon Designer 5.0, in modo da amplificare una sequenza esonica inframezzata sul gene da almeno un introne, tranne nel caso del gene *ALS* per il quale non è stato possibile.

L'RNA è stato retrotrascritto secondo protocolli standard suggeriti dal produttore del kit utilizzato (QuantiTect Rev.Transcription Kit, Qiagen, Hilden, Germany).

Per le preparazioni della PCR è stato utilizzato un kit premiscelato (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Qiagen). I campioni sono stati amplificati con RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia) secondo il seguente schema, adattabile a tutte le coppie dei primer: 1 ciclo a 95°C, 15 min; 45 cicli a 94°C, 15 sec; 52,3°C, 30 sec; 72°C, 30 sec. Il protocollo è stato sviluppato in seguito a numerose prove su diversi tessuti bovini.

L'elaborazione dei dati è stata effettuata tramite il software associato al termocicizzatore, il quale calcola la quantità di ogni amplificato, relativizzata ad un gene di riferimento, tramite il metodo del ddCT, corretto tenendo in considerazione l'efficienza media di amplificazione, la quale viene misurata automaticamente durante il processo (6). Infine, la quantità relativa di ogni amplificato è stata ripor-



tata alla media geometrica dei livelli di espressione dei tre geni di riferimento. La significatività delle differenze riscontrate tra animali trattati e controlli è stata calcolata tramite test di Student.

## RISULTATI

Variazioni significative sono state osservate nell'espressione dei geni *IGF-1*, *IGFBP-1*, *IGFBP-4* e della variante I del gene *GHR* (fig. 1).

Per quanto riguarda gli altri geni analizzati, sebbene le medie relative agli animali trattati ed ai controlli siano risultate spesso molto diverse, abbiamo riscontrato elevate deviazioni standard che hanno negativamente influenzato i livelli di significatività statistica. Inoltre, l'amplificazione di alcune varianti al 5'UTR del gene *GHR* (F,G,H) e di *IGFBP-5* e *IGFBP-6* ha mostrato soltanto sporadiche positività. Per questo motivo non sono state considerate ulteriormente in fase di elaborazione dati. Infine, la variante D di *GHR* è stata amplificata con successo soltanto in un certo numero di campioni provenienti dal gruppo degli animali trattati.

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Trattandosi questa di un'indagine che si colloca all'interno di uno studio di ben più ampie dimensioni, i risultati qui riportati non ci permettono di esprimere, al momento, conclusioni definitive. Tuttavia, il fatto che esistano delle significatività e delle differenze nella variazione dell'espressione di alcuni geni lascia aperta la speranza di poter utilizzare tali risultati in un'ottica di confronto o sinergia con quelli degli altri campioni biologici presi in esame. Infatti, lo scopo dello studio nel suo complesso è quello di identificare un pattern di variazioni dell'espressione genica da poter essere utilizzato come ulteriore indicatore ispettivo, per evidenziare i trattamenti illeciti.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Bauman, D.E., Vernon, R.G. (1993). Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation. *Annual Review of Nutrition.*, 13:437-61.
- 2) Castigliero, L., Iannone, G., Grifoni, G., Rosati, R., Gianfaldoni, D., Guidi, A. (2007). Natural and recombinant bovine somatotropin: immunodetection with a sandwich ELISA. *Journal of Dairy Research*, 74:79-85.
- 3) Domené, H., Krishnamurthi, K., Eshet, R., Gilad, I., Laron, Z., Koch, I., Stannard, B., Cassorla, F., Roberts, C.T. Jr., LeRoith, D. (1993). Growth hormone (GH) stimulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I-binding protein-3, but not GH receptor gene expression in livers of juvenile rats. *Endocrinology*, 133:675-82.
- 4) Jiang, H., Lucy, M.C. (2001). Variants of the 5'-untranslated region of the bovine growth hormone receptor mRNA: isolation, expression and effects on translational efficiency. *Gene*, 265:45-53.
- 5) Jiang, H., Wang, Y., Wu, M., Gu, Z., Frank, S.J., Torres-Diaz, R. (2007). Growth hormone stimulates hepatic expression of bovine growth hormone receptor messenger ribonucleic acid through signal transducer and activator of transcription 5 activation of a major growth hormone receptor gene promoter. *Endocrinology*, 148:3307-15.
- 6) Fleige, S., Walf, V., Huch, S., Prgomet, C., Sehm, J., Pfaffl, M.W. (2006). Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters*, 28:1601-13.