

# BENESSERE DEI SUINETTI ALLA CASTRAZIONE: RISULTATI PRELIMINARI DELL'ESPRESSIONE DI ALCUNI MIRNA E CORTISOLO NELLA SALIVA

POLLONI A.<sup>[1]</sup>, ARCHETTI I.<sup>[1]</sup>, AVANZINI C.<sup>[2]</sup>, VINCO L.J.<sup>[1]</sup>, GIACOMELLI S.<sup>[1]</sup>,  
LOMBARDI G.<sup>[1]</sup>, CECILIANI F.<sup>[3]</sup>, LECCHI C.<sup>[3]</sup>, ROTA NODARI S.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Centro di Referenza Nazionale per il Benessere Animale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "B. Ubertini", Brescia ~ Brescia ~ Italy,

<sup>[2]</sup>libero professionista ~ cremona ~ Italy, <sup>[3]</sup>Università degli Studi di Milano ~ Milano ~ Italy

Keywords: castrazione, saliva, miRNA

## Riassunto

Per questo studio sono stati selezionati un totale di 35 suinetti sottoscrofa di 3-4 giorni di vita, suddivisi in 3 gruppi. Il gruppo A ha ricevuto un anestetico locale e un antidolorifico prima della castrazione, il gruppo B è stato castrato senza utilizzo di farmaci e il gruppo C è stato esclusivamente manipolato. Per valutare il dolore/stress indotto dalla castrazione e/o dalla manipolazione nei diversi gruppi di trattamento, da ogni soggetto è stato prelevato un campione di saliva prima dell'intervento di castrazione o di manipolazione (F1) e dopo 30-45 minuti (F3) al fine di dosare il cortisolo e alcuni miRNA (miR-19b, miR-27b e miR-365). Durante la castrazione sono stati rilevati dati di tipo comportamentale mediante una scheda validata. Il delta di cortisolo e la rilevazione comportamentale hanno evidenziato un punteggio di dolore inferiore nel gruppo trattato e un minor incremento di cortisolo anche se statisticamente le differenze tra gruppi sono apparse non significative. Per quanto riguarda i miRNA, l'analisi statistica ha evidenziato un incremento significativo di miR-19b nel gruppo B da F1 a F3, e di miR-365 nel gruppo A da F1 a F3 mentre la differenza non è risultata statisticamente significativa tra prima e dopo il trattamento per il gruppo B e C. Osservando i valori di AUC delle curve ROC miR-19b si è dimostrato essere il più efficace a discriminare tra gruppo di animali castrati senza utilizzo di farmaci e con utilizzo di anestetico locale e antinfiammatorio.

## Abstract

A total of 35 piglets 3-4 days old, divided into 3 groups were selected for this study. Group A received a local anesthetic and a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) before castration, group B was castrated without use of drugs and the group C was only manipulated (control group). All subjects were sampled by salivary swabs placed in the mouth prior to surgery castration (F1) and 30-45 minutes after surgery (F3) or after been only manipulated to quantify cortisol and some miRNAs (miR-19b, miR-27b and miR-365). During castration behavioral data were recorded on a validated form. Delta cortisol (cortisol in F1-F3) and behavioral observations showed a minor pain score and raise in cortisol in the treated group compared to the others, even if differences between groups were not statistically significant. Regarding miRNA, the statistical analysis showed significant increase of miR-19b in group B from F1 to F3, and of miR-365 in group A from F1 to F3 while the difference before and after treatment between group B and C was not statistically significant. The values of AUC (Area Under the Curve) of ROC curve (Receiver Operating Characteristic), showed that miR-19b is the most useful miRNA to discriminate between the groups of castrated animals with or without the use of drugs.

## **INTRODUZIONE:**

Ai sensi del Decreto Legislativo 26 marzo 2001, n. 146 “La castrazione e’ consentita per mantenere la qualità dei prodotti e le pratiche tradizionali di produzione a condizione che tali operazioni siano effettuate prima del raggiungimento della maturazione sessuale da personale qualificato, riducendo al minimo ogni sofferenza per gli animali”, mentre ai sensi del Decreto Legislativo 7 luglio 2011, n.122, solo se la castrazione viene effettuata dopo il settimo giorno di vita dell’animale questa deve obbligatoriamente essere praticata da un medico veterinario con l’utilizzo dell’anestesia e la somministrazione prolungata di analgesici. Tuttavia, la “European declaration on alternatives to surgical castration of pigs” (2010), di cui l’Associazione Nazionale Allevatori Suini è firmataria, si impegna ad abbandonare la castrazione a partire dal primo gennaio 2018 e, come primo passo, ad effettuare una prolungata analgesia e/o anestesia con metodi mutualmente riconosciuti a partire dal primo gennaio 2012. Sono stati proposti diversi metodi alternativi alla castrazione chirurgica, quali l’immunocastrazione, la macellazione dei maschi a pesi inferiori, l’utilizzo di seme sessato, la selezione genetica o la scelta di una alimentazione e un management ad hoc finalizzati alla riduzione dello sviluppo di scatofo e androstenone. L’anestesia generale mediante anestetici inalatori o somministrazione CO<sub>2</sub> è adottata in alcuni paesi del Nord Europa, ma è di fatto non praticabile negli allevamenti italiani e nel caso della CO<sub>2</sub> i benefici complessivi da un punto di vista del benessere animale necessitano di maggiori approfondimenti (Candotti, 2010). L’utilizzo di anestetici locali, quali la lidocaina o la procaina associata ad adrenalina, ha il potenziale di ridurre gli effetti negativi derivanti dall’anestesia totale quali la mancata suzione del latte e il rischio di schiacciamento da parte della scrofa, ma pochi sono gli studi che ne valutano l’efficacia di riduzione del dolore. L’analgesia viene utilizzata ancora più raramente dell’anestesia e soltanto in alcuni stati come Paesi Bassi, Slovenia e Ungheria dove, solo una minoranza degli intervistati ha dichiarato di utilizzarli comunemente o sempre (Fredriksen et al., 2009). I principi attivi che si sono dimostrati efficaci nel controllo del dolore alla castrazione del suino sono rappresentati dagli antinfiammatori non steroidei (FANS) ed essenzialmente ketoprofene (Prunier et al., 2006), meloxicam (Keita et al., 2010; Zöls et al., 2006) e metamizolo (Fredriksen et al., 2009). Non essendo possibile quantificare direttamente il dolore indotto dalla castrazione, a livello sperimentale sono stati utilizzati la quantificazione dell’incremento di cortisolo ematico (Prunier et al., 2005; Hay et al., 2003; Prunier et al., 2006; Kattesh et al., 1996; Kohler et al., 1998) e schede di rilevazione comportamentale (Rota Nodari et al., 2011). Il cortisolo viene solitamente dosato in campioni di plasma, ma il prelievo ematico di per sé ne influenza i livelli poiché è esso stesso un evento stressante in grado di inficiare l’esito del successivo campionamento. Inoltre, tutte quelle pratiche sperimentali che possono potenzialmente causare dolore, sofferenza, distress, danno prolungato equivalente o superiore all’introduzione di un ago, necessitano di autorizzazione ai sensi della Dir. 2010/63/UE. Negli ultimi anni l’interesse nei metodi non invasivi è quindi aumentato orientando la ricerca verso la misurazione degli ormoni in matrici non invasive quali saliva (nel suino in rapporto di circa 1:10 rispetto al plasma, Parrott et al., 1989), urine, feci (Laws, 2007), pelo (Accorsi 2008), penne (Bortolotti 2008) e uova (Royo 2008).

## **MATERIALI E METODI:**

### **Animali**

Per la prova è stato selezionato un allevamento commerciale di 350 scrofe a ciclo chiuso con gestione a bande. I suini erano incroci Hermitage con finale Duroc. Per la prova sono stati selezionati 35 suinetti omogenei, in buone condizioni corporee e di salute di 3-4 giorni di vita. Ciascun suinetto è stato assegnato a random ad uno dei tre gruppi sperimentali.

### **Trattamento**

I suinetti del gruppo A (n=15) sono stati sottoposti a trattamento con FANS (meloxicam) e anestetico locale (procaina associata ad adrenalina). I farmaci sono stati somministrati seguendo le indicazioni dei rispettivi foglietti illustrativi. In particolare il meloxicam è stato iniettato per via IM nella regione del collo, mentre l'anestetico mediante siringa da insulina all'interno di ogni testicolo (0.125 ml/testicolo).

Il gruppo B (n=10) è stato castrato seguendo le normali procedure.

Per il gruppo C (n=10) sottoposto unicamente a manipolazione, è stata mimata la posizione di castrazione senza procedere alla sua effettuazione.

### Metodologia

Di seguito vengono riportate le procedure e le rilevazioni effettuate nelle diverse fasi (F1;F2;F3).

F1 (T-5-10minuti): prelievo salivare 5-10 minuti prima del trattamento; per il gruppo A somministrazione del trattamento.

F2 (T0): Castrazione, taglio coda, somministrazione ferro e antibiotico, scheda comportamentale (gruppi A e B); manipolazione (gruppo C);

F3 (T + 30-45 minuti): 2° prelievo salivare.

### Prelievi salivari

Tutti i prelievi sono stati eseguiti il mattino tra le ore 8.00 e le ore 12.00. Il prelievo di saliva è stato eseguito su animali in posizione di stazione quadrupedale, sorretti a livello dell'addome da un altro operatore, con tamponi Salivette® come descritto da Gallagher et al. (2002). I campioni mantenuti refrigerati (4-8°C) sono stati consegnati al laboratorio in giornata.

### Castrazione

La castrazione è stata effettuata mediante l'utilizzo di bisturi, come descritto da Leman et al., 1992.

### Scheda di valutazione etologica

Per la valutazione della presenza di una sintomatologia algica al momento della castrazione, è stata utilizzata una scheda di rilievo comportamentale validata (Rota Nodari et al., 2011).

### Procedura analitica di titolazione del cortisolo

In laboratorio le provette Salivette® sono state centrifugate refrigerate a 3500 rpm per 15 minuti. La saliva è stata poi trasferita mediante micropipette in criovials e portata alla temperatura di -195.82°C in azoto liquido per poi essere trasferite in congelatore a -80°. Il cortisolo è stato quantificato mediante metodica immunometrica di tipo competitivo in chemiluminescenza, con l'analizzatore automatico IMMULITE ONE (Medical System, Genova, Italia) e il kit commerciale LKC01 (Medical System, Genova, Italia), in uso presso il laboratorio di biochimica clinica e controllo qualità prodotti, animali e reagenti, IZSLER, Brescia.

### Procedura analitica di quantificazione dell'espressione dei miRNA

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il kit miRNeasy Serum/Plasma Quiagen seguendo le istruzioni del produttore.

### Analisi statistica

Per i titoli di cortisolo e il punteggio totale di dolore alla castrazione è stata effettuata una statistica descrittiva mentre con il test di Shapiro-Wilk si è valutata la normalità della distribuzione. È stato eseguito il Test T tra gruppi con distribuzione normale e il test di Kruskal-

Wallis tra gruppi con distribuzioni casuali. Il delta di cortisolo è stato calcolato sul singolo soggetto come differenza tra F3 e F1 su singolo animale.

La normalità della distribuzione di ciascuna delle variabili miRNA è stata valutata utilizzando test di Shapiro-Wilk. Poiché i dati non erano distribuiti normalmente è stato utilizzato il test non parametrico di Wilcoxon per l'analisi delle differenze di espressione miRNA. La curva ROC è stata utilizzata per determinare la sensibilità e la specificità del test di discriminare tra gli animali prima e dopo la castrazione.

**RISULTATI E DISCUSSIONE:**

I risultati relativi all'elaborazione statistica dei dati per il cortisolo e per la scheda comportamentale sono riportati in tabella 1.

Gruppo	Fase	N campioni	Punteggio scheda (media±ds)	Cortisolo media±ds (µg/dl)	Delta cortisolo (F3-F1) (media±ds)
A	F1	14		0.759 <sup>a</sup> ±0.531	0.052 <sup>a</sup> ±0.590
	F2		8.838 <sup>a</sup> ±3.653		
	F3	13		0.842 <sup>a</sup> ±0.377	
B	F1	4		0.475 <sup>a</sup> ±0.292	0.360 <sup>a</sup> ±0.311
	F2		10.661 <sup>a</sup> ±2.786		
	F3	6		1.048 <sup>a</sup> ±0.407	
C	F1	9		0.809 <sup>a</sup> ±0.556	-0.126 <sup>a</sup> ±0.865
	F3	10		0.804 <sup>a</sup> ±0.828	

Tabella 1. descrittiva del dosaggio del cortisolo nei diversi gruppi di trattamento. (Per lettere uguali nella medesima colonna p≥0.05)

I risultati relativi all'elaborazione statistica per i dati dei miRNA sono riportati nel grafico 1.

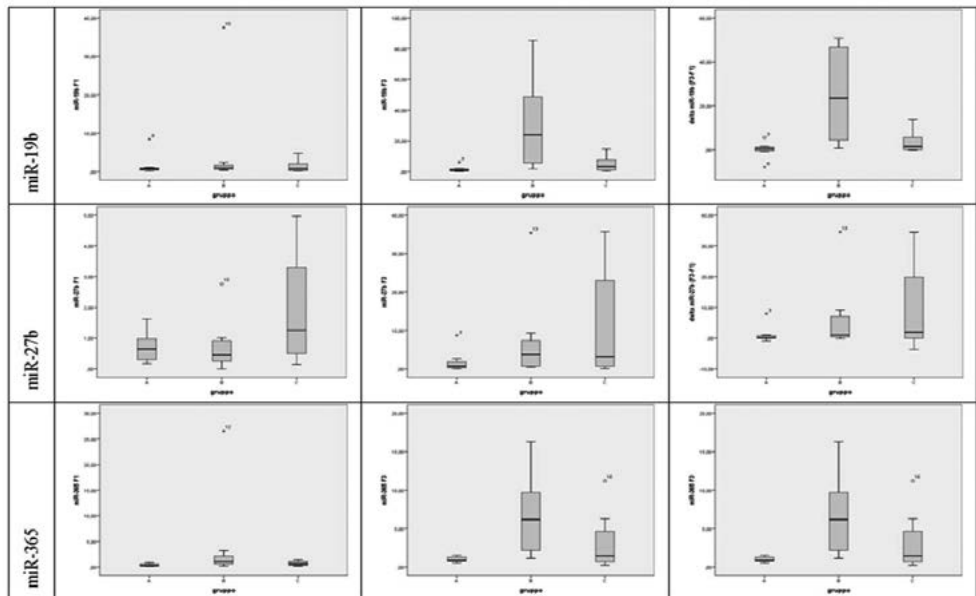


Grafico 1. box-whiskers relativi a miR-19b, miR-27b e miR-365 in F1, F3 e delta (F3-F1) nei gruppi.

Il test non parametrico di Wilcoxon prova che vi è differenza significativa ( $p \leq 0.05$ ) per miR-19b in F3 tra i gruppi A e B e tra i gruppi B e C; per miR-365 vi è differenza significativa ( $p \leq 0.05$ ) in F3 tra i gruppi A e B mentre non vi è differenza statisticamente significativa ( $p > 0.05$ ) per miR-27b in F1 in nessuno dei tre gruppi considerati.

Attraverso la valutazione delle curve ROC e del calcolo dell'area sottesa a tali curve (AUC) si è potuta verificare quanto un miRNA è sensibile e specifico nel discriminare tra gruppi. I risultati relativi alle AUC sono riportati in tabella 2.

Gruppi	miR-19b			miR-27b			miR-365		
	F1	F3	Delta	F1	F3	Delta	F1	F3	Delta
B-A	0.625	0.946	0.893	0.562	0.750	0.732	0.848	0.964	0.679
C-A	0.516	0.719	0.703	0.703	0.734	0.656	0.711	0.594	0.531
C-B	0.634	0.804	0.786	0.732	0.500	0.500	0.643	0.750	0.607

Tabella 2. Differenti AUC per i vari miRNA tra gruppi in F1 e F3.

I risultati relativi alla scheda comportamentale hanno evidenziato un punteggio complessivo di dolore, sebbene non statisticamente significativo, inferiore nel gruppo trattato A rispetto al gruppo B. Più difficili da interpretare sono gli esiti del cortisolo salivare a causa del numero ridotto dei soggetti nei quali è stato possibile valutare il delta. La quantità di saliva recuperabile in suinetti sottoscrofa è, infatti, più limitata rispetto al campione ematico, pertanto in molti animali non è stato possibile effettuare sia l'analisi dei miRNA che del cortisolo per esaurimento della matrice. Prove precedenti eseguite in laboratorio avevano comunque evidenziato un delta di cortisolo salivare inferiore nei soggetti sottoposti ad anestetico + antidolorifico rispetto ai soggetti sottoposti esclusivamente ad antidolorifico (Rota Nodari, dati non mostrati). Mendell et al. (2012) hanno identificato cinque meccanismi con cui i miRNA potrebbero influenzare i segnali di stress: mediazione del segnale, modulazione del segnale, feedback negativo, feedback positivo e mantenimento della stabilità del segnale. I cinque meccanismi d'azione non sono mutualmente esclusivi.

L'analisi statistica, ha evidenziato come miR-19b incrementi in modo significativo nel gruppo B da F1 a F3 e come miR-365 incrementi nel gruppo A da F1 a F3 mentre non vi è differenza statisticamente significativa tra prima e dopo il trattamento per il gruppo B e C.

Osservando le curve ROC si può osservare che  $AUC=0.946$  e  $AUC=0.964$  in F3 rispettivamente per miR-19b e miR-365. Questi due miRNA risultano essere indicatori più sensibili e più specifici di miR-27b. Per quanto riguarda la differenza tra i gruppi B e A  $AUC$  è rispettivamente 0.893 per miR-19b e 0.679 per miR-365 quindi, evidentemente miR-19b risulta più efficace al fine di discriminare tra gruppo di animali castrati senza utilizzo di farmaci e con utilizzo di anestetico locale e antinfiammatorio. La differenza tra F3 ed F1 per miR-19b è statisticamente significativa anche tra gruppi C e B con  $AUC=0.786$  quindi questo miRNA si dimostra abbastanza sensibile e specifico anche per discriminare tra gruppo di animali solo manipolato (C) e gruppo di animali castrati senza ausilio farmacologico (B); meno tra C e A.

L'esposizione ad un evento traumatico e stressante acuto modifica permanentemente i circuiti neuronali e recentemente i miRNA sono emersi come nuovi biomarker di diverse patologie ma anche di eventi stressanti.

In particolare miR-19b, appartenente al cluster miR 17-92, è implicato nel pannello di

risposta allo stress nel ratto (Balakathiresan et al., 2014), è altresì indicato come potenziale biomarker di eventi paurosi anche ritardati rispetto all'evento originale. Per quanto riguarda miR-27b, esso è sempre correlato all'evento traumatico ma non si ritrova nel siero quanto nell'amigdala che è la parte del sistema limbico che gestisce le emozioni in modo specifico il dolore. Secondo Balakathiresan et al., la up regulation di miR-27b e in misura minore di miR-19b sarebbe correlata alla sensazione dolorifica nei ratti oggetto dell'esperimento.

I livelli di miR-365 rimangono piuttosto invariati nei gruppi B e C in F3 rispetto ad F1, mentre si evidenzia l'aumento in F3 e nel conseguente delta per il gruppo A. Il loro ruolo non è stato ancora individuato con precisione; nell'uomo è associato allo sviluppo del cancro (Zhou et al., 2013) regolando negativamente la produzione di interleuchina 6 (IL-6), una citochina coinvolta nella risposta immunitaria, nell'ematopoiesi e nell'infiammazione (Xu et al., 2011).

Determinare quanto un animale provi dolore e il suo grado di stress rappresenta sicuramente una sfida per la ricerca, soprattutto quando la finalità sia quella di valutare a livello applicativo l'efficacia nella riduzione del dolore. Sebbene siano correntemente utilizzati alcuni strumenti quali schede comportamentali o dosaggio del cortisolo, è necessario un perfezionamento nella loro applicazione e l'introduzione di nuovi strumenti di misurazione.

La possibilità di dosare il cortisolo dalla matrice saliva anche in soggetti molto piccoli è senza dubbio incoraggiante, ma è necessario ampliare l'unità campionaria e valutare più tempistiche post-evento stressante per individuare il momento migliore per il prelievo e il derivante delta di cortisolo.

Molto promettenti appaiono i risultati relativi ai miRNA salivari individuati per la prima volta nei suini da questo studio ed espressi in modo diverso nei diversi gruppi di trattamento. Queste molecole, espresse più precocemente rispetto al cortisolo potrebbero rappresentare la nuova frontiera di valutazione del dolore e dell'efficacia delle molecole nel loro controllo. Per quanto preliminari, i dati osservati in questo studio indicano come l'utilizzo di un anestetico locale associato ad antidolorifico riduca l'espressione di miR-19b nei soggetti castrati.

Il lavoro è stato eseguito durante le pratiche di castrazione programmata aziendale senza interferire sul normale operato. Gli animali non sono stati sottoposti ad alcuna pratica dolorosa pari o superiore all'infissione di un ago.

#### **BIBLIOGRAFIA:**

- Aguggini, G., Beghelli, V., & Giulio, L. F. (1992). Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia-UTET.
- Ahanda, M. L. E., Zerjal, T., Dhorne-Pollet, S., Rau, A., Cooksey, A., & Giuffra, E. (2014). Impact of the Genetic Background on the Composition of the Chicken Plasma MiRNome in Response to a Stress. *PloS one*, 9(12), e114598.
- Balakathiresan, N. S., Chandran, R., Bhomia, M., Jia, M., Li, H., & Maheshwari, R. K. (2014). Serum and amygdala microRNA signatures of posttraumatic stress: Fear correlation and biomarker potential. *Journal of psychiatric research*, 57, 65-73.
- Candotti, P., Rota Nodari, S., (2010) La nostra proposta per la sterilizzazione del suino. 30 Giorni Dicembre 2010.
- Decreto Legislativo 26 marzo 2001, n. 146 Attuazione della direttiva 98/58/CE relativa alla protezione degli animali negli allevamenti (GU n. 95 del 24-04-2001)
- Decreto Legislativo 7 luglio 2011, n. 122 Attuazione della direttiva 2008/120/CE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini (GU n.178 del 2-8-2011 )
- Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010

sulla protezione degli animali utilizzati ai fini scientifici

- European Declaration on alternatives to surgical castration of pigs [http://ec.europa.eu/food/animals/welfare/practice/farm/pigs/castration\\_alternatives/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/animals/welfare/practice/farm/pigs/castration_alternatives/index_en.htm)
- Fredriksen, B., Font i Furnols, M., Lundström, K., Migdal, W., Prunier, A., Tuytens, F. A., & Bonneau, M. (2009). Practice on castration of piglets in Europe. *Animal*, 3(11), 1480-1487.
- Gallagher, N. L., Giles, L. R., & Wynn, P. C. (2002). The development of a circadian pattern of salivary cortisol secretion in the neonatal piglet. *Neonatology*, 81(2), 113-118.
- Hay, M., Vulin, A., Génin, S., Sales, P., & Prunier, A. (2003). Assessment of pain induced by castration in piglets: behavioral and physiological responses over the subsequent 5 days. *Applied Animal Behaviour Science*, 82(3), 201-218.
- Horn, T., Marx, G., & Von Borell, E. (1999). [Behavior of piglets during castration with and without local anesthesia]. *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 106(7), 271-274.
- Kaneko, J. J., Harvey, J. W., & Bruss, M. L. (Eds.). (2008). *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic press.
- Kattesh, H. G., Brown, M. E., Masincupp, F. B., & Schneider, J. F. (1996). Protein-bound and unbound forms of plasma cortisol in piglets after castration at seven or 14 days of age. *Research in veterinary science*, 61(1), 22-25.
- Keita, A., Pagot, E., Prunier, A., & Guidarini, C. (2010). Pre-emptive meloxicam for postoperative analgesia in piglets undergoing surgical castration. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 37(4), 367-374.
- Klemcke, H. G., Nienaber, J. A., & Hahn, G. L. (1989). Plasma adrenocorticotrophic hormone and cortisol in pigs: Effects of time of day on basal and stressor-altered concentrations. *Experimental Biology and Medicine*, 190(1), 42-53.
- Kohler, I., Moens, Y., Busato, A., Blum, J., & Schatzmann, U. (1998). Inhalation anaesthesia for the castration of piglets: CO2 compared to halothane. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 45(1-10), 625-633.
- Leman, A.D., Straw B.E., Mengeling W.L., D'Allaire S. & Taylor D.J., (1992) *Diseases of Swine* (7th edn) Iowa State University Press
- McGlone, J. J., & Hellman, J. M. (1988). Local and general anesthetic effects on behavior and performance of two- and seven-week-old castrated and uncastrated piglets. *Journal of animal science*, 66(12), 3049-3058.
- Mendell, J. T., & Olson, E. N. (2012). MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*, 148(6), 1172-1187.
- Parrott, R. F., Misson, B. H., & Baldwin, B. A. (1989). Salivary cortisol in pigs following adrenocorticotrophic hormone stimulation: comparison with plasma levels. *British Veterinary Journal*, 145(4), 362-366.
- Prunier, A., Bonneau, M., Von Borell, E. H., Cinotti, S., Gunn, M., Fredriksen, B., ... & Velarde, A. (2006). A review of the welfare consequences of surgical castration in piglets and the evaluation of non-surgical methods. *ANIMAL WELFARE-POTTERS BAR THEN WHEATHAMPSTEAD-*, 15(3), 277.
- Prunier, A., Bonneau, M., Von Borell, E. H., Cinotti, S., Gunn, M., Fredriksen, B., ... & Velarde, A. (2006). A review of the welfare consequences of surgical castration in piglets and the evaluation of non-surgical methods. *ANIMAL WELFARE-POTTERS BAR THEN WHEATHAMPSTEAD-*, 15(3), 277.
- Prunier, A., Mounier, A. M., & Hay, M. (2005). Effects of castration, tooth resection, or tail docking on plasma metabolites and stress hormones in young pigs. *Journal of Animal Science*, 83(1), 216-222.

- Rota Nodari, S., Guerra, O., Sassi, M., Nassuato C., Gastaldo, A., Della Casa, G., Archetti, I.L., Lombardi, G., Candotti, P. (2011) Validazione di una scheda comportamentale di rilevazione del dolore nei suinetti sottoposti a castrazione. XXXVII Meeting annuale SIPAS, Piacenza.
- White, R. G., DeShazer, J. A., Tressler, C. J., Borcher, G. M., Davey, S., Waninge, A., Clemens, E. T. (1995). Vocalization and physiological response of pigs during castration with or without a local anesthetic. *Journal of Animal Science*, 73(2), 381-386.
- Xu, Z., Xiao, S. B., Xu, P., Xie, Q., Cao, L., Wang, D., ... & Fang, L. R. (2011). miR-365, a novel negative regulator of interleukin-6 gene expression, is cooperatively regulated by Sp1 and NF- $\kappa$ B. *Journal of Biological Chemistry*, 286(24), 21401-21412.
- Zheng, Y., Chen, K. L., Zheng, X. M., Li, H. X., & Wang, G. L. (2014). Identification and bioinformatics analysis of microRNAs associated with stress and immune response in serum of heat-stressed and normal Holstein cows. *Cell Stress and Chaperones*, 19(6), 973-981.
- Zhou, M., Liu, W., Ma, S., Cao, H., Peng, X., Guo, L., ... & Shi, W. (2013). A novel onco-miR-365 induces cutaneous squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 34(7), 1653-1659.
- Zöls, S., Ritzmann, M., & Heinritzi, K. (2005). [Effect of analgesics on the castration of male piglets]. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 119(5-6), 193-196.