



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO in

**RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE ANIMALE E
SICUREZZA DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**

Direttore Prof. Giovanni Garippa

***INDIRIZZO IN:* Riproduzione, Produzione e Benessere Animale (XXIII CICLO)**

(coordinatore: prof. Sergio Ledda)

STUDIO DELLA VARIAZIONE GENETICA AL

LOCUS *SLC11A1* IN *CAPRA HIRCUS*

Docente Guida

Prof. Giuseppe Massimo Vacca

Direttore

Prof. Giovanni Garippa

Tesi di dottorato della

Dott.ssa Maria Luisa Diaz

ANNO ACCADEMICO 2009 - 2010

Indice

1	Introduzione	pag.	2
2	Scopo della ricerca	”	59
3	Materiali e metodi	”	62
4	Risultati e discussione	”	68
5	Conclusioni	”	79
6	Bibliografia	”	81

INTRODUZIONE

Maria Luisa Diaz, Studio della Variazione Genetica al Locus SLC11A1 in *Capra hircus*, tesi di dottorato in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale, Università degli Studi di Sassari.

Introduzione

1.1 La capra nella storia

L'attuale capra domestica appartiene alla Classe: *Mammalia*, Ordine: *Artiodactyla*, Famiglia: *Bovidae*, Sottofamiglia: *Caprinae*, Genere: *Capra*, Specie: *C. hircus*.

Si ritiene che la capra sia stata domesticata intorno al VIII millennio a.C. nell'area geografica che oggi è compresa tra Iran, Siria e Palestina, quando l'uomo da cacciatore-raccoglitore iniziò a cambiare il proprio stile di vita passando alla condizione di agricoltore-allevatore.

La domesticazione ha provocato nelle capre modificazioni a livello morfologico: riduzione della dimensione delle ossa degli arti, alterazione del nucleo osseo delle corna che divenne, specialmente nel maschio, più arrotondato e a forma di mandorla, più corto e di diametro inferiore. Per quanto riguarda la forma delle corna, attualmente le capre con corna ritorte prevalgono su quelle con corna dritte, mentre subito dopo la domesticazione le capre avevano per lo più corna dritte e a scimitarra; non si conosce però il motivo per cui capre con corna ritorte abbiano prevalso su quelle con corna dritte.

Lo studio delle origini di questo animale, ha portato alla affermazione di numerose teorie che convergono nell'individuare gli antenati della attuale capra domestica in tre specie del genere *Capra*:

Maria Luisa Diaz, Studio della Variazione Genetica al Locus SLC11A1 in *Capra hircus*, tesi di dottorato in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale, Università degli Studi di Sassari.

- la *C. Aegagrus* (egagro o bezoaro) è la principale, se non l'unica, progenitrice del ceppo domestico. Ha corna ricurve come scimitarre, la cui superficie anteriore è compressa lateralmente in modo da formare una carena affilata. È diffusa nello stesso areale del muflone selvatico (*Ovis orientalis*), cioè sulle montagne dell'Asia Minore e in tutto il Medio Oriente, oltre che su alcune isole dell'Egeo e su Creta; in Italia è presente sull'Isola di Montecristo.



- la *C. falconeri* detta anche markor o capra di Falconer, ha corna ritorte a cavatappi o a spirale aperta, con bordo posteriore carenato e bordo anteriore appiattito. Ha fornito le basi genetiche alle razze asiatiche dal vello pregiato.



- la *C. prisca*, specie ormai estinta che avrebbe dato origine alle razze caprine dalle corna ritorte.

Intorno al VII millennio a.C., seguendo le migrazioni umane alla ricerca di terre da coltivare, la capra compare verso Est, fino al Pacifico e all'Oceano Indiano, verso Ovest fino all'Atlantico e oltre attraverso l'Africa e l'Europa.

Per capire meglio la storia e quindi lo sviluppo e l'allevamento della capra bisogna considerare il ruolo importante che hanno avuto la

pecora ed il bosco. Questi due fattori infatti hanno condizionato, nel corso dei secoli, l'evoluzione della specie caprina.

Le greggi erano composte sin dall'antichità da pecore e capre, anche se nel Preneolitico e nel Neolitico, si osserva una maggiore presenza di ossa di capra nei resti dei pasti. Dopo la loro domesticazione, l'allevamento dei due piccoli ruminanti, procede praticamente parallelamente, con lievi variazioni determinate più che altro dall'ambiente e dall'importanza che l'animale riveste nella società. Verso la seconda metà del Neolitico si assiste ad una minor presenza di capre a favore delle pecore.

In epoca Romana la capra ed i suoi prodotti (carne, latte e pelle) erano molto apprezzati, anche in misura maggiore rispetto a quelli ovini e vaccini. In questo periodo l'allevamento di questa specie porta a modificazioni morfologiche degli animali, che assumono una taglia nettamente maggiore e compare per la prima volta la capra senza corna. Con le conquiste Romane la taglia aumenta per tutti gli animali allevati nell'Europa centrale. Sempre in questo periodo però, si assiste ad un incremento dell'allevamento ovino, dovuto al ruolo assunto dalla lana nel sistema economico e produttivo della società.

Con la caduta dell'Impero Romano (476 d.C.) si riduce ancora di più la quantità di animali allevati; durante il medioevo e con le invasioni barbariche la situazione precipita, si interrompe la transumanza, che era il principale sistema di allevamento, a causa dell'insicurezza negli

spostamenti e con la scomparsa di alcune città le terre incolte prendono il sopravvento.

Nel basso Medioevo (1000-1492 d.C.) e negli anni successivi lo scenario europeo cambia, si vede una maggiore attenzione verso la coltivazione delle campagne, con aumento dei seminativi, dei pascoli erbacei e delle opere di bonifica. La produzione della lana riacquista allora la sua importanza, la transumanza viene regolamentata e tutelata con un aumento delle terre dedicate al pascolo. Si assiste ad una graduale riduzione degli spazi disponibili all'allevamento della capra che viene spinta verso i boschi per lasciare spazio nei pascoli agli ovini, viene inoltre accusata di distruggere i boschi e per questo motivo vengono attuate leggi contro essa.

Nei primi anni del XIX secolo inizia la così detta “guerra alle capre” che si ripresenterà con vigore anche durante il ventennio fascista.

All'inizio dell'800 i cambiamenti a livello sociale ed economico avvantaggiano lo sviluppo della proprietà privata e della nascente industria ed ancora una volta l'allevamento caprino subisce una forte riduzione numerica in favore dell'allevamento ovino e bovino ritenuti più redditizi. La capra viene ancora accusata di rovinare siepi, campi, giardini e orti, di facilitare le frane e di distruggere i boschi e vengono infatti emanate leggi contro la detenzione e l'allevamento delle capre.

Nonostante il carattere repressivo delle numerose leggi bandite, le capre continuano ad essere allevate, in quanto ritenute animali

indispensabili per gran parte della popolazione. Inoltre vantavano alcuni estimatori, soprattutto tra i medici, che esaltavano le proprietà medicinali del latte di capra.

Negli anni '30 alcune leggi imponevano perfino delle tasse per i proprietari e i detentori di capre, questo ovviamente determinò un crollo dell'allevamento caprino che scese al di sotto dei 2 milioni di capi presenti in Italia.

Negli anni '70 invece, seppur con una certa difficoltà, la consistenza del patrimonio nazionale comincia ad aumentare ma soprattutto cambia l'approccio culturale verso questa specie.

Negli anni '80 in seguito ad alcune normative che promuovevano l'imprenditoria giovanile si assiste ad una rivitalizzazione dell'allevamento caprino, infatti la maggior parte dei nuovi imprenditori non provenivano dal mondo dell'allevamento ovino o bovino ma erano generalmente professionisti o imprenditori provenienti da nuove classi sociali.

L'aumento della consistenza è quindi da attribuire soprattutto ai nuovi allevamenti che nacquero in quegli anni in tutta Italia ed in particolar modo al Centro-Sud.

1.2 L'allevamento della capra: consistenza e tipologie di allevamento

L'allevamento caprino si colloca bene su territori impervi, aridi o comunque inaccessibili, consentendo lo sfruttamento di aree che altrimenti resterebbero abbandonate e selvagge (Bittante et al., 2005).

La popolazione caprina mondiale conta 830 milioni di capi, di questi, 13,7 milioni sono allevati nei 25 paesi dell'Unione Europea (Faostat, 2007; <http://www.faostat.fao.org>).

L'Italia con oltre 1.120.000 animali (Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, 2008; <http://www.izs.it/it/anagrafe.zootecnica/anagrafe.zootecnica.intro.html>.) possiede l' 8% del patrimonio comunitario, le altre nazioni con elevato numero di capi allevati sono la Grecia che detiene il 39% del patrimonio, seguita da Spagna e Francia che possiedono, rispettivamente il 21 e 9% (Faostat, 2007).

In Italia l'allevamento caprino è praticato da circa 46 mila imprese (IZSA&M, 2008). Il confronto tra i dati degli anni '90 e quelli dell'ultimo censimento dell'agricoltura, evidenzia come il numero delle aziende si sia sensibilmente contratto (-35%) ma si è registrata una sensibile crescita di capi allevati, infatti l'ampiezza media degli allevamenti nazionali è passata da 14 a 23 capi per azienda. (ISTAT 2000).

La distribuzione di capi per regione vede la Sardegna in testa con 291.000 capi, seguita dalla Calabria e dalla Sicilia (IZSA&M, 2008).

Le tipologie di allevamento possono essere molto diverse in relazione alle razze allevate e soprattutto all'ambiente:

L'allevamento estensivo è una tipologia molto diffusa nelle aree montane. Prevede una forma di allevamento pressoché semibrado, con ricovero delle capre d'inverno solo durante il periodo dei parti e dell'allattamento naturale dei capretti. Per il resto dell'anno le capre vengono lasciate libere di pascolare, in fondovalle in primavera e autunno e in alpeggio durante l'estate. Il latte viene utilizzato solamente per l'allattamento dei capretti e l'unica fonte di reddito è la vendita della carne. I costi di questo tipo di allevamento sono minimi, poiché l'alimentazione è basata sul pascolo ed è prevista un'integrazione di fieno e a volte mangime solo al parto, e anche la richiesta di manodopera è limitata. Questa forma non consente però la selezione delle capre in base alle loro caratteristiche produttive né un controllo delle monte, cosicché anche le capre giovani o non sufficientemente sviluppate possono essere coperte. Le razze allevate secondo questa tipologia sono solitamente quelle autoctone, più rustiche e adattabili di quelle altamente selezionate.

L'allevamento semi estensivo è anche questo diffuso nelle aree montane ed è piuttosto simile alla tipologia precedente, tranne che per il diverso utilizzo del latte, che viene destinato alla caseificazione dopo lo

svezzamento del capretto. Le capre vengono stabulate durante tutto l'inverno e non solo durante i parti, in primavera ed autunno pascolano nei pressi della stalla utilizzando i prati-pascoli o in forme di pascolo guidato, mentre durante l'estate sono in alpeggio. Dopo lo svezzamento dei capretti, il latte, solitamente munto a mano, viene caseificato. Rispetto alla tipologia precedente, i costi di gestione sono maggiori, per l'attività di mungitura e caseificazione, ma il ritorno economico è senz'altro superiore. Come per la tipologia precedente, le razze allevate in questa forma sono solitamente autoctone.

L'allevamento intensivo è un tipo di allevamento caprino non tradizionale, ma che negli ultimi anni si sta diffondendo soprattutto nelle aree di pianura e fondovalle; la principale produzione è il latte. Gli animali sono allevati in aziende moderne e di grandi dimensioni, in stabulazione libera. I capretti sono allattati con alimenti sostitutivi al latte materno (latte artificiale), mentre le capre sono munte solo per la produzione di latte, destinato alla caseificazione. La mungitura avviene in sala mungitura, che presenta dimensioni variabili a seconda del numero di capi allevati, e le capre sono munte di solito da febbraio a ottobre-novembre. L'alimentazione è studiata sulla base dei fabbisogni giornalieri degli animali, a seconda dei diversi stadi fisiologici, ed è impiegata una elevata quantità di mangime. In genere le aziende di questo tipo producono solo in parte gli alimenti necessari agli animali, dipendendo dal mercato per l'approvvigionamento alimentare.

Le razze allevate secondo questa tipologia sono per lo più la Saanen e la Camosciata delle Alpi, altamente selezionate per la produzione di latte.

L'allevamento semi intensivo si differenzia da quello precedente in quanto il pascolo ricopre un ruolo fondamentale nell'alimentazione delle capre. A parte il periodo di stabulazione invernale, per il resto dell'anno gli animali vengono condotti al pascolo, che viene gestito in modo razionale utilizzando la forma del pascolo turnato, e ricevono poi un'integrazione alimentare in stalla, comunque limitata. In questo modo si ottiene una sostanziale riduzione dei costi di alimentazione e lo sfruttamento di aree difficilmente utilizzabili per la produzione di fieno. I capretti vengono allattati artificialmente e il latte prodotto destinato alla caseificazione.

Le razze utilizzate sono solitamente quelle selezionate per la produzione di latte (Saanen e la Camosciata delle Alpi), ma anche razze autoctone con una buona produttività.

Per quanto riguarda le modalità di allevamento, nel nostro Paese, esistono due realtà completamente diverse:

- Nel Nord le aziende sono di piccole dimensioni, il latte, spesso, viene trasformato direttamente in azienda; vengono allevate soprattutto razze estere quali la Saanen e la Camosciata caratterizzate da un allevamento di tipo stanziale e da elevate produzioni.
- Nel Centro-Sud invece, gli allevamenti contano un maggior numero di capi, in genere si tratta di razze italiane, il tipo di

allevamento predominante è quello estensivo con bassi livelli di tecnologia (Rubino, L'allevamento caprino).

1.3 Le razze

Camosciata delle Alpi o Alpine: originaria della Svizzera, si è diffusa in molti paesi europei ed extraeuropei. In Italia ha la sua maggiore consistenza nelle regioni dell'arco alpino ma è molto presente anche nelle altre regioni. E' detta anche camosciata per il mantello simile a quello del camoscio: il colore di fondo è marrone con riga più scura dalla nuca alla coda, anche testa, spalle, petto ed arti sono di colore scuro (Tortorelli, 1983).

E' una capra di taglia grande, l'altezza al garrese è nei maschi 86 cm e nelle femmine 74 cm, mentre il peso va da 70 Kg nelle femmine a 100 Kg nei maschi adulti, la testa è relativamente piccola leggera e fine, il profilo fronto-nasale rettilineo e soprattutto nei maschi può essere presente una caratteristica barba sotto il mento, le orecchie sono lunghe e portate di lato obliquamente e in avanti ma mai abbandonate e pendenti, nei maschi è presente un ciuffo di peli arruffati sulla fronte e le corna possono essere presenti o assenti sia nei maschi che nelle femmine. Il collo generalmente è lungo e può presentare o meno le tette. Il torace e l'addome sono ampi e la regione dorso-lombare rettilinea, la groppa è ben sviluppata e leggermente piovente (Falaschini, 1996).

L'apparato mammario è ampio e ben sviluppato, la mammella è preferibilmente globosa con capezzoli mediamente sviluppati, conici, rettilinei e portati verticalmente ma può essere anche piriforme. Gli arti sono lunghi, forti e ben proporzionati. Viene generalmente allevata in piccoli, medi e grandi allevamenti sia allo stato semi stabulato che in strutture a stabulazione permanente.

Saanen: anche questa originaria della Svizzera ma diffusa in molti paesi europei ed extraeuropei. In Italia conta il maggior numero di capi nelle regioni dell'arco alpino ma è diffusa anche nel resto del territorio nazionale.

E' una capra di taglia medio grande raggiungendo, i maschi 90 e le femmine 60 Kg di peso per un'altezza al garrese rispettivamente di 87 e 75 cm per i due sessi (Falaschini, 1996). Anche questa razza è caratterizzata da una testa piccola, leggera e fine, profilo fronto-nasale rettilineo e nei maschi è presente la barba ed il ciuffo di peli arruffati sulla fronte, le orecchie sono lunghe e portate di lato ma non pendenti. Anche per la razza Saanen sia i maschi che le femmine possono presentare o meno corna, per quanto riguarda la strutture del tronco e dell'apparato mammario, si può dire che sia del tutto simile a quello precedentemente descritto per la Camosciata delle Alpi. Le differenze invece si osservano nel mantello che in questa razza bianco o talvolta rosato, gli unghiaie sono color ardesia o ambra e la pelle non è pigmentata, si accettano piccole macchie sulla cute della mammella e dei

padiglioni auricolari e del musello. Anch'essa è una razza ad attitudine lattifera che viene allevata in medi e grandi allevamenti allo stato semi stabulato o in stabulazione permanente (Tortorelli, 1983).

Sarda: è la razza autoctona della Sardegna, che nel tempo è stata incrociata con altre razze, soprattutto con la maltese. E' una capra di taglia media, l'altezza è circa 78 cm nei maschi e 70 cm nelle femmine, mentre il peso è rispettivamente 60 e 45 Kg nei due sessi (Falaschini, 1996). La testa è abbastanza piccola e leggera nelle femmine mentre nei maschi è più grossa, il profilo fronto-nasale è quasi rettilineo, le orecchie sono di media lunghezza e larghezza e portate orizzontalmente, le corna possono essere presenti o assenti. Il collo è lungo e sottile ed il torace profondo, la regione dorso-lombare è quasi rettilinea con la groppa sviluppata ed inclinata posteriormente. L'apparato mammario è ben sviluppato, la mammella ha attacco ampio ed è di forma globosa con capezzoli grandi e distanziati. Gli arti sono robusti con unghie solidi. Il mantello è di colore variabile, ma più frequentemente bianco e grigio.

Il tipo di allevamento predominante per questa razza è quello estensivo o semiestensivo in medie o grandi aziende.

L'attitudine di questa razza è la produzione di latte e la sua selezione ha come obiettivi: la valorizzazione quali-quantitativa del latte destinato alla trasformazione casearia, per prodotti tipici e tradizionali, il miglioramento dell'attitudine al pascolamento in montagna con attenzione alla correttezza degli appiombi e alla robustezza degli arti,

ancora il miglioramento delle caratteristiche morfologiche della mammella e l'aumento della fertilità e della prolificità (Balasini,2001). In Sardegna secondo i dati ASSONAPA 2008 sono presenti circa 10.100 soggetti distribuiti in 90 aziende, di cui 9.938 sono femmine in produzione.

Maltese: questa razza ha le sue origini nel versante medio-orientale del bacino del mediterraneo. E' stata allevata e selezionata in Italia soprattutto nella parte insulare e meridionale.

E' di taglia media, i maschi sono alti al garrese 87 cm e pesano circa 70 Kg mentre le femmine misurano 71 cm per 46 kg di peso (Falaschini, 1996). La testa è relativamente piccola e leggera nelle femmine mentre nei maschi risulta piuttosto tozza. Il profilo fronto-nasale è rettilineo e nei maschi è presente un ciuffo di peli arruffati sulla fronte e la barbetta nel mento. Le orecchie sono caratteristiche in questa razza, sono lunghe, larghe e pendenti e tendono ad avere l'estremità rivolta verso l'esterno. Anche le corna possono esserci o meno. Il collo è mediamente lungo e sottile con presenza o meno di tette; torace e addome sono ampi, la regione dorso-lombare è rettilinea e la groppa è mediamente sviluppata.

L'apparato mammario è molto ampio, le mammelle sono del tipo pecorino, raramente piriformi ed hanno capezzoli ben sviluppati. Gli arti sono robusti e con unghie di colore grigio tendente al giallo. Il mantello è generalmente di colore bianco con possibilità di pezzature nere, anche

sulla testa possono essere presenti maculature più o meno estese di colore nero corvino, la pelle è di colore bianco roseo ad eccezione delle dove è presente la pezzatura. Viene allevata in piccoli, medi e grandi allevamenti allo stato brado, semibrado e stabulato (Tortorelli, 1983).

Murciano Granadina: è originaria del sud-est della Spagna dove è molto allevata ed è stata esportata in molti paesi del Sud America (Argentina, Brasile, Messico e Venezuela) e del Nord Africa. Filogeneticamente si considera derivata dalla *Capra Aegagrus* la cui forma secondaria è la capra pirenaica che si è evoluta nella attuale razza Murciano Granadina. Data la sua rusticità costituisce una razza di grande interesse per i paesi caldi ed aridi. Viene allevata in sistemi di tipo estensivo ma anche semi estensivo e intensivo dando comunque ottime produzioni.

Si può considerare una capra di taglia media e di costituzione armonica, i maschi sono alti 76 cm per 70 kg e le femmine 68 cm per 60 kg La testa è leggera con profilo diritto o leggermente concavo, le orecchie sono piccole e quasi orizzontali. Il colore del vello è di un rosso più o meno scuro che a volte arriva quasi al nero. E' caratterizzata da buone produzioni di latte (900 kg), media fecondità ed elevata precocità dei capretti (www.agraria.org/caprini/murciana.htm).



A. Becco di razza Camosciata delle Alpi



B. Capra di razza Saanen



C. Capre di razza Maltese



D. Capra di razza Nubiana



E. Capra di razza Sarda



F. Capre di razza Marciano-Granadina

1.4 I prodotti caprini

Il latte di capra e i prodotti derivati

Il latte di capra presenta un'elevata variabilità sia nella composizione che nell'attitudine alla trasformazione casearia, questo dipende da vari fattori quali: le caratteristiche peculiari della razza, l'ordine di parto, i fattori ambientali, le tecniche di allevamento e di alimentazione ed anche il momento della lattazione. La sua composizione lo rende spesso preferibile al latte prodotto da altre specie zootecniche per il consumo umano diretto.

Per quanto riguarda la composizione, il latte di capra presenta delle caratteristiche particolari: i globuli di grasso presentano dimensioni minori rispetto a quelli del latte vaccino, con una maggiore superficie esposta che favorisce i processi di lipolisi, rendendo più digeribile il latte di capra. Questa peculiarità comporta però maggiori problemi di caseificazione, in quanto i globuli di grasso vengono inglobati più difficilmente nel reticolo caseinico, si ottengono quindi minori rese, ed il formaggio è più predisposto all'irrancidimento, ne consegue una maturazione più veloce. Il latte di capra contiene inoltre percentuali superiori di acidi grassi a corta e media catena (da C10 a C14, capronico, caprilico, caprinico), responsabili del caratteristico odore e sapore dei formaggi.

Le sostanze azotate sono costituite in massima parte da proteine

(95-96%) e in minima parte da sostanze non proteiche (4-5%). La frazione proteica comprende caseine (α_1 , α_2 , β e κ) e sieroproteine (α -lattoalbumina, β -lattoglobulina, sieroalbumina e immunoglobuline). Le caseine sono presenti sotto forma di micelle in sospensione e precipitano quando il latte viene acidificato (coagulazione lattica) o per trattamento enzimatico con caglio (coagulazione presamica) o per centrifugazione ad alta velocità. Questi trattamenti sono alla base dei processi di trasformazione casearia. Il diametro medio delle micelle di caseina del latte di capra è inferiore a quello del latte vaccino e questo provoca la formazione di un coagulo più soffice e friabile. Questo rende il latte di capra più digeribile, ma meno idoneo a subire il processo di caseificazione. Il latte di capra presenta una composizione in proteine più simile a quella del latte umano che a quello vaccino. Il tasso di caseina è inferiore rispetto a quello bovino, mentre è superiore quello di sieroproteine, più facilmente digeribili rispetto alla caseina e di maggior valore biologico.

Il lattosio è lo zucchero (disaccaride) del latte e la sua concentrazione è direttamente correlata con la quantità di latte prodotto. È la componente meno variabile, anche se presente in minor quantità nel latte di fine lattazione o in presenza di ghiandole mammarie affette da mastiti.

Per quanto riguarda i minerali, il latte caprino presenta concentrazioni di potassio (K) e ferro (Fe) nettamente superiori a quelle

del latte umano e bovino, rispetto ai quali ha minori contenuti in sodio (Na), per cui è più adatto all'alimentazione di soggetti con problemi di ipertensione.

Il contenuto in vitamina A, acido ascorbico e vitamina B12 del latte caprino è mediamente inferiore a quello del latte umano; esso è inoltre carente in acido folico rispetto alle altre specie zootecniche. La presenza di vitamina A come tale e non sotto forma di β -carotene, come nel latte vaccino, rende il latte di capra e i formaggi derivati particolarmente bianchi.

Il caratteristico odore del latte di capra è in realtà meno marcato di quello dei suoi prodotti di trasformazione: su circa 30 componenti rilevate nel formaggio, solo 18 sono state trovate nel latte di origine. L'intensità di questo profumo è influenzata dallo stadio di lattazione, dal contenuto in cellule somatiche (CCS), dal contenuto in acidi grassi liberi e dal tipo di alimentazione.

Il formaggio di capra:

Il formaggio ha origini antichissime che risalgono almeno al III millennio a.C. Inizialmente furono utilizzati solo il latte di capra e di pecora e si presume che i primi formaggi furono prodotti semplicemente per coagulazione acida del latte (tipo caprino). Successivamente nacquero i formaggi a coagulazione enzimatica, dopo che ci si accorse che il latte conservato in recipienti ricavati dall'abomaso dei ruminanti

coagulava per la presenza del caglio (o presame). Il termine formaggio deriva dal latino *caseum formaticum*, che indicava il cacio messo in forma.

In Sardegna, un prodotto importante, ma ancora da valorizzare, è la *Frue* o *Casu axedu*, che consente di ottenere dal latte di capra guadagni superiori rispetto a qualsiasi altro formaggio. Si tratta di un prodotto di qualità che fino a ieri era destinato all'autoconsumo e non veniva sfruttato commercialmente per via delle sue caratteristiche. Infatti la breve scadenza del prodotto e l'impossibilità di disporre di contenitori adatti al commercio su larga scala, come quelli oggi forniti dall'industria, hanno in passato confinato in secondo piano le caratteristiche qualitative del *casu axedu*.

L'avventura economica del prodotto inizia in Ogliastra nel 1994 ad opera del caseificio Chiai & Figli di Barisardo che, con spirito pionieristico ed avventuroso, superando non pochi ostacoli burocratici legati alle autorizzazioni sanitarie, iniziano per primi la produzione del *casu axedu* in vaschette di plastica. Nonostante le difficoltà iniziali incontrate in un mercato ormai assuefatto alle produzioni di massa, il *casu axedu* si è imposto progressivamente, conquistando sempre più spazio. Parallelamente altre aziende hanno iniziato la produzione (anche fuori dell'Ogliastra) e conquistato a loro volta crescenti quote di mercato, pur in assenza di attività di marketing rivolte al consumatore e senza alcun supporto pubblicitario, a dimostrare la validità del prodotto ed il

riconoscimento da parte del consumatore delle sue proprietà dietetiche e salutistiche.

Secondo dati raccolti dall'Ersat nel 2007 in una breve indagine conoscitiva, la produzione di questo particolare formaggio avviene soprattutto in Ogliastra e Nuorese, ma è in Ogliastra che sono dislocate il maggior numero di aziende di produzione, oltre 9, per una quantità di prodotto che supera abbondantemente i 2500 quintali, pari a oltre il 70 % della produzione isolana, buona parte della quale realizzata con latte di capra. L'origine di questo prodotto comune al Centro e al Nord dell'isola, molto diffuso nell'antichità si perde nella notte dei tempi. Ne danno notizie Apicio (25 a.C-37d.C) nella sua opera *De re coquinaria* e Galeno nel II secolo d. C. ne parla come di un alimento molto famoso ed apprezzato dai Romani. Il canonico Giovanni Spano lo cita nel suo *“Vocabolario Sardo-Italiano ...”* (1851-1852) e il linguista Max Leopold Wagner nel suo *“Vita rustica della Sardegna....”* pubblicato nel 1921, lo dice “il piatto prediletto dei pastori sardi...” e lo definisce “cibo rinfrescante che ha lo stesso sapore dello jogurt dell'Oriente” (www.regione.sardegna.it).

La carne di capra:

Le caratteristiche della carne di capra dipendono da vari fattori precedenti alla macellazione (razza, alimentazione, età, ambiente e tipo di allevamento), legati alla macellazione stessa e alla successiva

conservazione della carne. L'età alla macellazione, in particolare, rappresenta il principale fattore di determinazione della composizione della carcassa: con l'aumentare dell'età, diminuisce l'incidenza dell'osso, resta più o meno costante quella del tessuto magro, mentre aumenta quella del grasso corporeo.

La percentuale di *tessuto magro* delle carcasse caprine è intorno al 60-65%, mentre quella di *grasso* si aggira intorno al 12-14%, inferiore a quella che si riscontra in bovini, ovini, suini. La presenza di grasso è legata soprattutto all'alimentazione, al sesso, all'età, alla velocità di crescita e alla razza. Con la crescita del capretto, la distribuzione del grasso di deposito si modifica: alla nascita è concentrato prevalentemente nella cavità addominale, poi aumenta quello intramuscolare e sottocutaneo. Il grasso sottocutaneo è comunque piuttosto scarso nella specie caprina, nelle razze alpine è di circa 1 mm di spessore. Il suo colore è variabile dal bianco (di maggior qualità) al giallo. Il colore della carne di capra, invece, varia dal pallido al rosa al rosso. Tra i principali elementi di *valutazione delle carcasse caprine* troviamo la distribuzione e lo spessore del grasso sottocutaneo di copertura: questo non deve essere né troppo abbondante né troppo scarso. Carcasse troppo magre possono essere danneggiate dalla refrigerazione, essendo troppo sottile lo strato che isola termicamente la carne sottostante, che può risultare asciutta e dura, mentre quelle troppo grasse non sono gradite dal punto di vista organolettico.

Le carcasse vengono classificate in:

- *magrissime*: copertura adiposa quasi assente, presente solo il grasso intramuscolare in spalle e arti posteriori;
- *magre*: lombi e dorso ricoperti da un sottile strato adiposo che lascia trasparire i muscoli sottostanti;
- *con giusta copertura*: tutta la muscolatura, tranne quella di spalle e arti posteriori, è coperta da un sottile strato di grasso, più spesso su natiche e garrese;
- *grasse*: tutta la muscolatura è coperta da uno spesso strato adiposo, solo i muscoli delle spalle e degli arti posteriori sono visibili;
- *molto grasse*: tutta la carcassa è coperta da uno strato adiposo molto spesso.

Un altro elemento di valutazione delle carcasse è la presenza del *grasso che copre i reni*. Questi possono essere coperti solo parzialmente da un sottile strato di grasso, o ricoperti quasi completamente, tranne l'estremità anteriore del rene destro (giusto livello di ingrassamento) o ricoperti interamente da uno spesso strato adiposo.

La fibra di capra:

La specie caprina è stata selezionata anche per la produzione di fibra, soprattutto nel territorio asiatico, attualmente vengono allevate due razze a questo scopo, la Capra D'Angora e la Capra Cashmere, che forniscono due fibre altamente pregiate, la prima il Mohair e la seconda

il Cashmere.

Il Cashmere si ricava in primavera dal sottovello che è molto fine e soffice e più corto rispetto al vello principale chiamato giarra. La fibra può essere ottenuta mediante due tecniche: la pettinatura e la tosatura, in entrambe i casi segue comunque la degiarratura, cioè la separazione di giarra e sottovello. Ogni capra produce in media da 60 a 170 gr di sottovello all'anno. La maggiore caratteristica di questa lana è sicuramente l'elevata finezza, il suo diametro infatti si aggira intorno agli 11-18 μm , quindi molto inferiore rispetto ai 20-24 μm della lana merinos. Il sottovello viene poi filato e sottoposto a finissaggio, una procedura di lavaggio che lo rende morbido e vellutato. Il diametro e la lunghezza del Cashmere sono influenzati da vari fattori, quali: il patrimonio genetico, lo stato di salute e l'ambiente di allevamento, infatti ad altitudini elevate si registrano maggiori lunghezza e resa della fibra, mentre non si hanno variazioni nel diametro, che invece viene influenzato dall'alimentazione, elevati contenuti proteico ed energetico causano ispessimenti della fibra.

Il Mohair, dal turco "*mukhyar*" è una fibra molto pregiata che solitamente viene miscelata con altre fibre ed è prodotta dalla razza Capra d'Angora. Si ricava dai follicoli secondari, caratterizzati da diametro variabile da 25 a 39 μm . Il colore è solitamente bianco, ma anche grigio, bruno o nero. Caratteristiche del mohair sono la finezza e la lucentezza della fibra. La crescita è continua durante tutto l'anno e la

fibra di qualità migliore è quella ricavata dalla prima tosatura dei capretti a 6 mesi di età (kid-mohair). La raccolta del vello avviene per tosatura due volte l'anno, la prima ad aprile e la seconda a settembre. L'età è il principale fattore che determina qualità e quantità di mohair prodotto. Il numero dei follicoli secondari infatti aumenta fino ai 2 anni di età così come il diametro della fibra e la quantità prodotta. Le femmine producono un numero maggiore di follicoli secondari e di minor diametro e quindi di miglior qualità rispetto ai maschi (Rubino et al., 2004).

2.1 Il sistema immunitario

Il sistema immunitario dei vertebrati è una complessa rete integrata di mediatori chimici e cellulari che hanno lo scopo di difendere l'organismo da qualsiasi forma di insulto chimico, traumatico o infettivo. Una caratteristica fondamentale del sistema immunitario è la capacità di distinguere tra le strutture endogene o esogene che non costituiscono un pericolo e dunque possono o devono essere preservate (*self*) e le strutture endogene ed esogene che invece si dimostrano nocive per l'organismo e che devono quindi essere eliminate (*non-self*). Secondo le più recenti teorie il sistema immunitario distingue dunque un *non-infectious self* (self non infettivo) da un *infectious-self* (self infettivo). La discriminazione tra self e non self avviene a livello molecolare ed è mediata da particolari strutture cellulari (recettori Toll-like, i recettori dei linfociti T, i complessi MHC e gli anticorpi) che consentono la presentazione ed il riconoscimento di componenti dell'agente lesivo definite *antigeni* (letteralmente induttori di anticorpi). A seconda delle modalità di riconoscimento degli antigeni si distinguono due tipologie di difesa immunitaria: l'*immunità aspecifica*, dovuta a fattori umorali e/o cellulari che agiscono sui microrganismi indipendentemente dal loro assetto antigenico; l'*immunità specifica* invece dipende dall'intervento iniziale di anticorpi e /o linfociti capaci di riconoscere le strutture antigeniche dei microrganismi (Turk, 1976; Roitt, 1977; Serafini et al., 1980)

L'immunità aspecifica o innata è quella deputata alla prima difesa dell'organismo contro le aggressioni, questa utilizza diverse misure difensive rappresentate da: barriere anatomiche epiteliali e mucose (Roitt 1977), dalle secrezioni esocrine, da mediatori dell'infiammazione e della cascata del complemento e da numerose specie cellulari prevalentemente della linea mieloide ma anche della linea linfoide. La barriera epiteliale non rappresenta solo una barriera fisica che blocca l'entrata di potenziali patogeni, ma è provvista di recettori che permettono l'attacco dei patogeni e che sono coinvolti nelle prime fasi dell'infezione (Mims et al., 1984; Wakelin et al., 1988). In seguito ad una situazione di pericolo, l'immunità aspecifica pone il sistema immunitario in una condizione di allarme che favorisce lo sviluppo dell'immunità specifica. La caratteristica fondamentale dell'immunità aspecifica è la capacità di rispondere immediatamente ad un vasto numero di agenti patogeni, questa rapidità però, determina un'efficacia non sempre ottimale nell'eliminazione di questi "aggressori". Inoltre, l'incapacità di adattarsi alle contromisure sviluppate dai microrganismi patogeni ed una scarsa capacità di discriminazione tra *self* e *non-self*, determina lo sviluppo di danni tissutali spesso sproporzionati rispetto all'entità dello stimolo immunogeno.

Le difese cellulari sono dovute essenzialmente alle cellule dotate di azione fagocitaria e cioè ai leucociti neutrofilici e ai macrofagi. Queste cellule, intervengono anche nei meccanismi di difesa specifica verso gli

agenti infettivi, in quanto condizionata da anticorpi o da fattori prodotti dai linfociti. Esse però possono anche agire indipendentemente dai processi che prevedono la messa in atto dei sistemi di riconoscimento degli antigeni (Nelson, 1976; Issekutz e Biggar, 1977; Faulk e Greenwood, 1977; Alexander, 1980; Farrar et al., 1980).

La componente cellulare dell'immunità aspecifica comprende prevalentemente cellule di derivazione mieloide ma anche alcuni stipiti di tipo linfoide. Queste cellule sono dotate di una serie di recettori (*recettori tool-like, recettori per il frammento cristallizzabile delle immunoglobuline, recettori per il complemento, recettori delle cellule natural-killer, recettori delle cellule T di tipo $\gamma\delta$ e i recettori delle cellule T NK*) che permettono loro di interfacciarsi direttamente o indirettamente con gli antigeni o di riconoscere la presenza di uno stato infiammatorio ed innescare la risposta immune.

I **mastociti** sono cellule di derivazione mieloide, risiedono nei tessuti connettivi e sono dotati di granuli di istamina, eparina e numerosi altri fattori infiammatori, i granuli vengono rilasciati in grande quantità in risposta a stimoli immunogenici.

I **granulociti** sono anch'esse cellule di derivazione mieloide, che circolano nel sangue e vengono richiamate nei tessuti in seguito a stimoli infiammatori. I granulociti circolanti sono di 3 tipi, i *neutrofili*, che costituiscono la maggior parte di queste cellule e svolgono 4 funzioni fondamentali : ▪ fagocitosi potenziata da recettori per il complemento e

per gli anticorpi, ▪ digestione dei patogeni attraverso il rilascio di radicali liberi e di sostanze ossidanti contenute nei granuli primari, ▪ rilascio di fattori chemotattici e di mediatori infiammatori contenuti nei granuli secondari, ▪ rimozione o induzione di danni tissutali attraverso il rilascio di gelatinasi (che digerisce il tessuto connettivo) contenuta nei granuli terziari. I *granulociti basofili* svolgono invece funzioni simili ai mastociti e con le medesime modalità di attivazione, sono presenti in numero molto esiguo rispetto alle altre popolazioni cellulari. Gli *eosinofili* controllano le reazioni immunitarie IgE mediate come infezioni elmintiche o allergie.

I **macrofagi** sono cellule di derivazione mieloide che originano dal differenziamento tissutale di monociti circolanti nel torrente sanguigno che migrano nei vari tessuti dell'organismo. Si trovano in grandi quantità nel tessuto connettivo del tratto gastrointestinale, nei polmoni, lungo certi vasi sanguigni del fegato e nella milza. Riconoscono i patogeni attraverso recettori di superficie cellulare, che possono distinguere tra le molecole di superficie esposte dai patogeni e quelle proprie dell'ospite. I macrofagi come i neutrofilo svolgono funzioni di fagocitosi e digestione ossidativa degli agenti patogeni, durante la fagocitosi, producono una grande quantità di prodotti tossici che aiutano ad uccidere il microrganismo fagocitato, i più importanti sono l'anione superossido (O_2^-), il perossido d'idrogeno (H_2O_2) e l'ossido nitrico (NO) che risultano direttamente tossici per i batteri. Sono

generati tramite la NADPH ossidasi lisosomale ed altri enzimi, in un processo detto catena respiratoria, in quanto è caratterizzato da un temporaneo aumento del consumo di ossigeno. I macrofagi hanno vita lunga e continuano a generare nuovi lisosomi. L'interazione tra patogeni e macrofagi tissutali genera l'attivazione ed il rilascio di citochine ed altri mediatori da parte dei macrofagi, tutto questo crea uno stato di infiammazione nel tessuto che richiama neutrofili e proteine plasmatiche. Sono strettamente legati alle cellule dell'immunità specifica in quanto dipendono da queste ultime per raggiungere una completa attivazione, inoltre influenzano il differenziamento di queste cellule nelle fasi precoci della risposta immune specifica e contribuiscono alla risposta antigenica.

Le **cellule dendritiche** sono morfologicamente e funzionalmente specializzate nella cattura e nella presentazione dell'antigene, per questo sono chiamate anche *antigen presenting cells (APC)*.

Le cellule che invece derivano dalla linea linfoide, sono le **cellule natural killer**, queste contribuiscono alla costituzione di un solido sistema citochinico nelle fasi iniziali delle infezioni virali e in base all'equilibrio tra segnali attivatori o inibitori, rilevati dai recettori per le cellule NK possono tollerare o distruggere attraverso un meccanismo simile a quello dei linfociti T, per questo motivo sono particolarmente attive contro cellule che non esprimono MHC I (in seguito ad alcune infezioni virali o in presenza di alcuni tumori).

Altre cellule di derivazione linfoide che partecipano all'immunità

aspecifica sono i **linfociti innati** tra i quali i *linfociti T $\gamma\delta$* , che costituiscono una minoranza dei linfociti T ed esprimono un recettore delle cellule T di tipo $\gamma\delta$, a differenza degli altri linfociti possono attivarsi e rispondere direttamente senza ulteriori segnali costimolatori; i *linfociti T NK* che quali riconoscono antigeni glicolipidici e svolgono un ruolo di fondamentale importanza nella regolazione del differenziamento dei linfociti T-helper; i *linfociti B1* che sono particolarmente presenti all'interno della cavità peritoneale e pleurica e producono anticorpi di classe M, senza ulteriori segnali costimolatori, ma non sviluppano alcuna forma di memoria immunologica.

Esiste poi un tipo di immunità definita specifica o acquisita che comprende mediatori chimici e cellulari responsabili di una risposta difensiva più potente e mirata ma più lenta. L'immunità specifica può essere di tipo umorale, cioè mediata da anticorpi, oppure cellulo-mediata. E' costituita prevalentemente da cellule della linea linfoide della serie T e B e da cellule accessorie. Nei processi di infezione primaria l'azione di questa risposta immunitaria è ritardata, visto che serve tempo per l'attivazione, la proliferazione e la differenziazione dei linfociti T e B antigene specifici (MacLeod et al., 1995).

I **linfociti T** si suddividono in *linfociti T helper CD4+* e *linfociti T citotossici CD8+*. La funzione dei primi è quella di coordinare il complesso della risposta immune attivando linfociti CD8+ e macrofagi (T-helper 1) o linfociti B (T-helper 2) e di sostenere il processo

infiammatorio, questa attività è svolta attraverso l'interazione cellula-cellula o mediante il rilascio di citochine. La funzione dei linfociti CD8+ è invece quella di lisare le cellule infette grazie alla produzione delle linfochine. I linfociti B attivati si specializzano in cellule secernenti anticorpi dette *plasmacellule*. L'immunità specifica o acquisita è stata selezionata nel corso dell'evoluzione per la sua capacità di adattarsi dinamicamente alla variabilità di agenti ambientali riconosciuti come un pericolo per l'organismo, questa è una caratteristica peculiare di molti microrganismi infettivi in continua co-evoluzione con il sistema immunitario che cerca di distruggerli. L'immunità specifica deve quindi essere in grado di rispondere a tutte le possibili combinazioni molecolari presenti in natura e in grado di interagire con l'organismo. Il sistema immunitario deve mantenere una memoria delle strutture di riconoscimento antigenico dimostrate efficaci nel rispondere a precedenti aggressioni, che potrebbero ripresentarsi. Inoltre deve poter essere istruito a riconoscere il self dal non-self per rendere più efficace la risposta alle aggressioni e prevenire l'autoimmunità i cui fenomeni di controllo vengono definiti "tolleranza" e si svolgono negli organi linfoidei primari durante la maturazione delle cellule del sistema immunitario e in periferia la termine di questo processo. La maturazione dell'immunità specifica si svolge prevalentemente durante il primo anno di vita anche se in realtà prosegue per tutta la durata della vita dell'individuo, l'istruzione dei linfociti T avviene nel timo e consiste in un rigidissimo processo di

selezione delle varianti cellulari in grado di montare un TCR completo che possa legare con affinità intermedia (cioè attraverso un legame reversibile e temporaneo) complessi MHC-antigene corrispondenti a tutto (o quasi) il patrimonio self dell'individuo. I linfociti B si sviluppano e maturano nel midollo osseo dove, attraverso opportuni riarrangiamenti sviluppano numerose varianti di recettori delle cellule B (BCR). Queste strutture costituiscono i precursori di membrana dei futuri anticorpi (che sono invece rilasciati in forma solubile dalle plasmacellule) e come questi ultimi riconoscono gli antigeni in forma nativa e non nel contesto di una struttura MHC.

Nella difesa specifica umorale, un ruolo fondamentale spetta agli anticorpi, prodotti dalle plasmacellule le quali sono cellule derivate dalle cellule clone che a loro volta derivano dai linfociti B. Il processo di difesa umorale inizia quando un linfocita rileva un agente esterno grazie al suo recettore specifico, ossia che rileva uno ed un solo corpo esterno inizia la produzione di cellule clone che in parte saranno destinate alla memoria immunologica e in parte andranno a formare le plasmacellule le quali produrranno gli anticorpi che si legheranno al corpo esterno bloccando i suoi siti attivi facilitando la fagocitosi da parte dei macrofagi. L'immunità specifica cellulare invece, è svolta dai linfociti T capaci di distruggere i virus che hanno già infettato una cellula, queste cellule, tramite recettori specifici, si legano al complesso esposto dalle cellule APC (*antigen presenting cells*) in modo che possano creare dei fori nella

parete cellulare mediante l'azione di un enzima da loro secreto chiamato perforina. Si ha così la lisi cellulare (Janeway et al., 2007).

2.2 La resistenza naturale alle malattie

La resistenza naturale alle malattie è la capacità innata che un animale ha di resistere alle malattie quando è esposto ad un patogeno, senza che vi sia stata precedentemente una esposizione o immunizzazione (Hutt, 1958). Questo importante processo deriva da una risposta immunologica più efficiente dell'ospite contro particolari patogeni ed è sotto il controllo di uno o più geni (Spooner et al., 1975; Barger et al., 1989).

Tale fenomeno fu descritto per la prima volta alla fine del 1800 negli studi sulla difterite umana (Jacobi, 1880), ma allora non vennero considerate le implicazioni genetiche. Fu soprattutto il rinnovato apprezzamento dei principi genetici proposti da Mendel, a favorire, intorno agli anni '20 del secolo successivo, i primi esperimenti relativi allo studio della resistenza naturale verso alcune malattie infettive negli animali (Roberts e Card, 1926).

Il fatto che una malattia si manifestasse raramente in tutti i membri di una popolazione esposta ad un patogeno è stato da sempre osservato negli allevamenti domestici e l'importanza del controllo

genetico alla base di questo processo venne confermato inizialmente da alcuni studi fatti sulla resistenza alla *S. pullorum* nei polli e *B.suis* nei suini (Roberts e Card, 1926; Cameron et al., 1940) e successivamente da alcune ricerche sulla tubercolosi nei gemelli (Comstock, 1978; Fine, 1981). Tutte queste osservazioni furono inizialmente ignorate. La scoperta della penicillina da parte di Fleming nel 1928 e il largo uso di antibiotici che si fece negli anni successivi, oltre che l'utilizzo dei vaccini per la prevenzione di molte malattie infettive, frenarono la ricerca in questo campo. Inoltre, parlare di resistenza genetica in quel periodo appariva un discorso troppo complicato, e nel settore delle scienze animali si pensava che i piani di selezione eventualmente impiegati per aumentare il livello di resistenza naturale potessero anche compromettere le produzioni.

Scoperte importanti sul ruolo della genetica nella suscettibilità e resistenza al micobatterio avvennero a partire dagli anni '60 attraverso vari lavori (Comstock, 1978) e contemporaneamente contribuirono alla definizione delle basi relative alla risposta immunitaria specifica verso gli stessi micobatteri. La combinazione di queste scoperte formò le basi di due importanti concetti:

- la risposta dell'ospite al micobatterio avveniva in due fasi. Inizialmente la resistenza innata e naturale stabilizzava l'infezione, successivamente, lo sviluppo dell'immunità adattativa, che è andata col tempo evolvendosi combinando le forze con i processi dell'immunità

innata, bloccava l'infezione e la progressione della malattia.

- I meccanismi di difesa dell'ospite sono sotto il controllo genetico in entrambe le fasi, ma ciascuna fase è controllata da diversi gruppi di geni.

Il genoma animale influenza fortemente la suscettibilità e la resistenza ad una malattia, ma vista la complessità dell'interazione ospite-patogeno è improbabile che il controllo sia esercitato da un unico gene, attraverso l'espressione di uno o un altro allele, ma è più plausibile che molti geni risultino coinvolti nel controllo della malattia.

A tal proposito, un modo utile per comprendere il controllo genetico sulla resistenza alle malattie in campo animale potrebbe essere quello di investigare la sequenza di processi che riguardano le conseguenze dell'interazione ospite-patogeno. Questo processo deriva da una vecchia relazione che è andata evolvendosi nel tempo e dalla pressione selettiva notevolmente influenzata anche dal lavoro di selezione artificiale effettuato nei circa diecimila anni di domesticazione del bestiame. E' inoltre basilare identificare con precisione le risposte dell'ospite al patogeno in modo da ricostruire e definire la regolazione genetica di questi processi.

Ancora oggi le malattie infettive e non infettive continuano a causare forti perdite economiche dirette e indirette nell'industria zootecnica nonostante il largo uso delle misure tradizionali di prevenzione. Inoltre, nell'ultimo decennio, l'uso eccessivo e talvolta

inadeguato di antibiotici è stato messo in discussione sia per il possibile sviluppo di antibiotico-resistenza ai microrganismi zoonotici che per i danni potenziali dei residui degli stessi antibiotici negli alimenti di origine animale destinati all'uomo. La legislazione, soprattutto nell'ambito della comunità Europea, ha quindi provveduto ad arginare questo fenomeno impedendo l'uso dei coccidiostatici nel mangime per animali (Reg. CE 1831/2003) e limitando l'utilizzo degli antibiotici a scopo metafilattico negli allevamenti intensivi. Questo problema suggerisce la necessità di prendere in considerazione in campo animale altre misure per il controllo delle malattie infettive. Per contribuire al raggiungimento di questo obiettivo sono attese nuove strategie con lo scopo di aumentare il livello di resistenza nelle popolazioni animali attraverso l'uso di specifici programmi di selezione e studiare in maniera approfondita i meccanismi naturali alla base della resistenza alle malattie (Lunney, 1986; Womack, 1988).

Notevoli progressi sono stati compiuti sull'identificazione e caratterizzazione di geni che esercitano un ruolo chiave nella resistenza naturale alle malattie, e di microsatelliti e mappe genetiche che hanno permesso la corretta localizzazione cromosomica di numerosi geni (Fries et al., 1993; Bishop et al., 1994). L'identificazione di un gene candidato deputato al controllo della resistenza naturale e la conoscenza della sua azione aumenterebbe enormemente le conoscenze sulla resistenza genetica alle malattie e la possibilità di un'applicazione pratica

contribuendo fortemente a migliorare lo stato sanitario e conseguentemente la produttività degli animali domestici.

2.3 Le Proteine della Famiglia *SLC11*

Le proteine della famiglia *SLC11* hanno la funzione di trasportare ioni metallo nelle membrane cellulari a cui sono associate. La famiglia di trasportatori di ioni metallo *SLC11* funziona in diversi organismi, dai batteri all'uomo. Tra quelle finora conosciute, la proteina *SLC11A1* funziona nel trasporto di ioni metallo attraverso la membrana fagosomale dei macrofagi. Infatti, difetti legati ad essa, causano sensibilità nei confronti di numerosi patogeni intracellulari.

Gli ioni metallo sono elementi fondamentali per la vita, infatti la carenza o l'eccesso, come risultato di disordini genetici o di malnutrizione, può causare morte o patologie molto gravi. Per esempio, l'anormale captazione del ferro è implicata nella malattia ereditaria nota come emocromatosi, nell'anemia, nell'aterosclerosi e anche in patologie neurologiche come il Parkinson, l'Alzheimer, l'Huntington e l'ataxia di Friedreich (Nevo e Nelson, 2006). Per prevenire certe malattie, le cellule devono mantenere l'omeostasi degli ioni metallo e questo è reso possibile grazie a processi di captazione, stoccaggio e secrezione all'interno della cellula e dei suoi compartimenti.

I fattori che controllano il trasporto degli ioni metallo attraverso le membrane cellulari, nonché l'omeostasi intracellulare e le risposte regolatrici delle cellule ai cambiamenti ambientali per il rifornimento di questi elementi, sono stati oggetto di molti studi. Metalli come Cd^{2+} , Co^{2+} e Ni^{2+} possono essere una grande minaccia per la salute dei mammiferi, principalmente perché interferiscono in vari modi con il trasporto, l'omeostasi e le funzioni dei metalli essenziali. Per minimizzare i loro effetti, le cellule hanno sviluppato varie strategie: il trasporto o il sequestro di questi elementi all'interno di organelli e il loro legame con i tioli, risultano essere le più importanti.

I differenti metalli si possono raggruppare in ioni redox attivi e in ioni non-redox attivi. Tra i primi: Fe^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} e, in minor grado il Mn^{2+} ; tra i secondi: Ca^{2+} e Zn^{2+} . Lo zinco e il calcio sono cofattori per fattori di trascrizione e altri enzimi coinvolti nel metabolismo del DNA, perché la presenza di ioni metallo redox attivi può portare alla formazione di radicali che sono in grado di danneggiare gli acidi nucleici. Gli ioni redox attivi normalmente funzionano negli enzimi che partecipano nelle reazioni redox e la conversione di componenti contenenti ossigeno. Uno specifico set di trasportatori funziona in ciascun compartimento cellulare per garantire l'equilibrio delle attività di trasporto attraverso le loro membrane. In alcuni organelli cellulari e nella membrana plasmatica, trasportatori ad alta e a bassa affinità agiscono di concerto per il mantenimento del giusto equilibrio della concentrazione

di ioni metallo. Solo negli ultimi anni la ricerca ha focalizzato il suo interesse anche sui geni che codificano per i trasportatori negli eucarioti e sui disordini genetici ad essi associati. Come risultato, sono stati scoperti numerosi geni candidati, alcuni dei quali sono stati descritti in dettaglio, come i trasportatori per: Ca^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{2+} . Parallelamente, è divenuto chiaro che, dai batteri all'uomo, la famiglia delle proteine di trasporto associate alla resistenza naturale *SLC11* (inizialmente denominate *NRAMP*), gioca un ruolo importante nella omeostasi degli ioni metallo. I membri della famiglia funzionano come trasportatori generali di ioni metallo e possono trasportare: Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+} . Questa classe di proteine nei mammiferi condivide un'importante identità di sequenza proteica con quelle di lieviti, piante e moscerini (Nevo e Nelson, 2006). Questa famiglia è rappresentata nei mammiferi da *SLC11A1* e *SLC11A2* (precedentemente denominata *NRAMP2*). La proteina di trasporto *DCT1* (Divalent Cation Transporter 1), codificata dal gene *SLC11A2*, è ritenuta l'isoforma murina dell'*SLC11A2* umana, e condivide il 72% di identità con *SLC11A1* umana.

2.4 La proteina trasportatrice *DCT1*

La maggior parte delle informazioni sulla funzione della proteina

DCT1, derivano da studi elettrofisiologici in cui era espressa in oociti di *Xenopus* (Sacher et al., 2001). *DCT1* trasporta un ampio range di ioni metallo divalenti. Opera come un simporto di metalli e H^+ , dove il gradiente protonico è la forza motrice per il trasporto del metallo. Esperimenti di elettrofisiologia hanno dimostrato che Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} e, in minor misura Ni^{2+} e Pb^{2+} sono tutti in grado di determinare correnti ioniche nelle cellule che esprimono *DCT1*, suggerendo che ognuno di loro è un ligando. Esperimenti di uptake radioattivo usando $^{55}Fe^{2+}$, $^{54}Mn^{2+}$, $^{60}Co^{2+}$, $^{65}Zn^{2+}$ e $^{109}Cd^{2+}$ rivelarono che questi metalli sono trasportati da *DCT1* (Nevo e Nelson, 2004; Gunshin et al. 1997; Sacher et al., 2001; Marciani et al., 2004; Okubo et al., 2003).

Il trasporto di ioni metallo è dipendente dalla presenza di Cl^- o altri piccoli anioni come NO_3^- o SCN^- , ma non gluconato o SO_4^{2-} . Però il ruolo del cloro nel meccanismo di *DCT1* rimane sconosciuto.

E' stato proposto che *DCT1* possa avere un ruolo cruciale nell'assorbimento del ferro dal duodeno, come pure nel trasporto del ferro rilasciato a pH basso negli endosomi. L'mRNA di *DCT1* si trova in molti tessuti diversi, inclusi cervello, intestino prossimale, rene, midollo osseo e reticolociti. La proteina e il suo mRNA sono più abbondanti nel duodeno prossimale, coerentemente con la funzione di assorbimento del ferro nell'intestino. La proteina *DCT1* è stata anche localizzata, insieme alla transferrina, in endosomi da riciclo, endosomi morti e proteine lisosomiali di molti tipi cellulari, inclusi reticolociti e cellule transfettate

in vitro. Questi ritrovamenti coincidono con una funzione di trasporto ionico dal lume acidificato degli endosomi verso il citoplasma. Nei macrofagi, *DCT1* è localizzato negli endosomi da riciclo, ma è anche localizzato nei fagosomi di macrofagi che contengono eritrociti e fagosomi di cellule del Sertoli che contengono spermatozoi. Questo suggerisce che *DCT1* può avere un ruolo nel *turn-over* del ferro dagli eritrociti morti e dagli spermatozoi degenerati (figura 1). Mutazioni del gene *SLC11A2* nel topo e nell'uomo causano anemia e morte nel topo e anemia microcitica ipocromica e sovraccarico di ferro nell'uomo (Canonne-Hergaux et al., 2001)

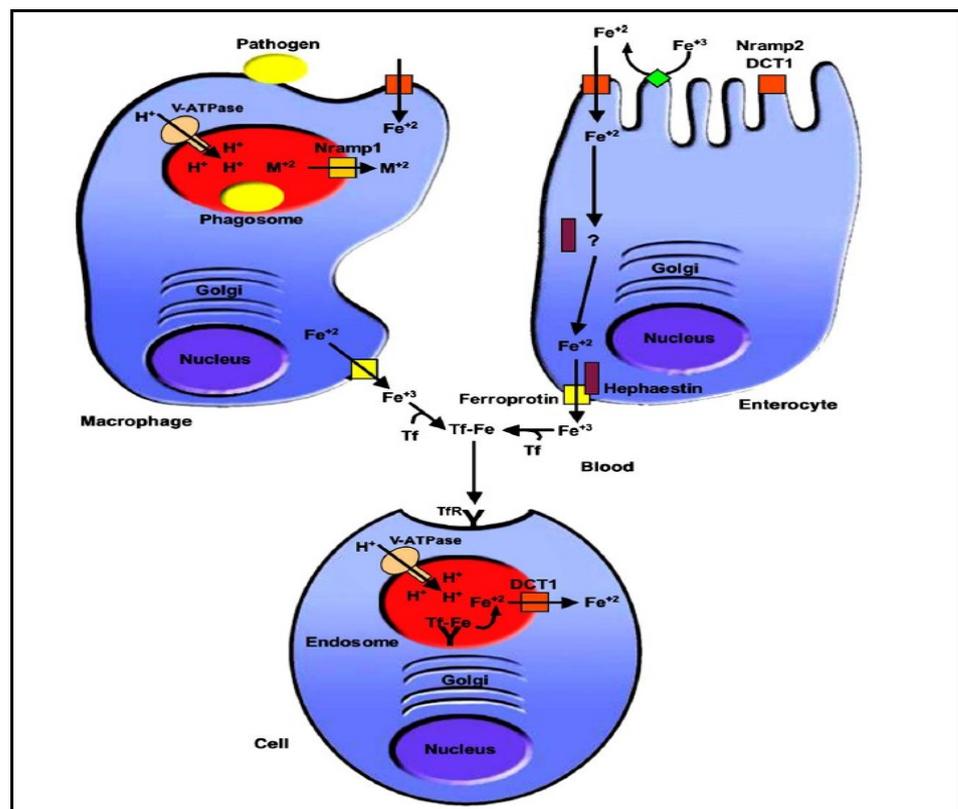


Figura 1. Rappresentazione schematica degli elementi chiave nel trasporto del ferro e delle funzioni di *DCT1*.

2.5 La proteina trasportatrice SLC11A1

È noto da tempo che la patogenicità di un'ampia gamma di parassiti intracellulari dipende dalla disponibilità di ioni metallo di transizione per il proprio metabolismo (Payne, 1992). Questo è confermato dal fatto che la proteina macrofagica *SLC11A1* sia stata riconosciuta come trasportatore di ioni metallo e che conferisca resistenza verso questi parassiti intracellulari.

Nevo e Nelson (2006) proposero che il ruolo di *SLC11A1*, nella difesa del macrofago contro un'invasione microbica, fosse quello di ridurre la concentrazione di ioni all'interno dei fagosomi contenenti i batteri. Di conseguenza, questo limiterebbe la produzione e la funzione dei metallo-enzimi del batterio fagocitato, i quali sono richiesti per la difesa contro i prodotti intermedi come ossigeno attivo e/o azoto tossico che vengono riversati su di loro dai fagociti.

E' stato proposto che *SLC11A1*, come il suo omologo nel topo, trasporti ioni metallo dal lume fagosomiale nel citoplasma (figura 7 A). Così la deplezione di ioni metallo dal lume fagosomiale diventerebbe una tappa limitante nella produzione e funzione dei metallo enzimi del batterio fagocitato, riducendo l'abilità a produrre e attivare enzimi come la superossidodismutasi (SOD) e prevenire la propagazione dei microrganismi "ingeriti". Per contro, un aumento della concentrazione di ioni metallo nel fagosoma, causata da un difetto del trasportatore

SLC11A1, può promuovere la crescita del micobatterio e rendere l'organismo invasore sensibile al patogeno.

Tale ipotesi è stata avvalorata da parecchi studi, che provano che il trasportatore favorisce davvero il passaggio di ioni metallo divalenti (inclusi Mn^{2+} , Fe^{2+} e Co^{2+}). Tuttavia, rispetto alla direzionalità degli ioni metallo che passano attraverso il canale di *SLC11A1*, gli scienziati hanno opinioni differenti. Un gruppo propone che *SLC11A1* possa condurre ioni metallo all'interno dei fagosomi dei macrofagi e faciliti l'accumulo di ioni metallo nel loro lume (figura 7 B). L'aggiunta di Fe^{2+} ai macrofagi che esprimono *SLC11A1* nelle colture di tessuto mostrava un'ulteriore inibizione della crescita di *Mycobacterium avium* e questo effetto potrebbe essere rovesciato con l'aggiunta di "spazzini" dei radicali idrossilici. In più i macrofagi che esprimevano *SLC11A1* crescevano con una quantità di Fe^{2+} accumulato quattro volte maggiore nei loro fagosomi che nelle cellule senza *SLC11A1*. Lo stesso era vero per l'ingresso di Fe^{2+} nei fagosomi isolati. Si osservò un notevole aumento dei radicali idrossilici dopo infezione delle cellule che esprimevano *SLC11A1*, ma non in quelle che non lo esprimevano.

Venne dimostrato che il ferro è dipendente da un gradiente di pH e, con la sua distruzione attraverso agenti come cloroquina e ammonio cloridrato, la quantità di ferro introdotto diminuiva nei fagosomi isolati che esprimevano *SLC11A1*. Questo ingresso di ferro potrebbe anche essere inibito dal trattamento dei fagosomi con anticorpo contro la quarta

ansa esterna di membrana. In un altro lavoro, l'espressione di *SLC11A1* in oociti di *Xenopus*, dimostrava che potrebbe trasportare Fe^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} in cambio di H^+ . Sebbene siano state registrate le correnti indotte da grandi ioni metallo, il trasporto di questi ioni era estremamente basso. L'attività dell'mRNA di *SLC11A1* iniettato negli oociti era solo superiore di due volte in confronto con gli oociti iniettati con acqua. Questo fa in modo che sia la fonte di ioni metallo a doppia valenza a indurre la corrente. Tali ritrovamenti portano questo gruppo di scienziati a credere che *SLC11A1* funzioni come un antiporto pH dipendente, portando cationi divalenti all'interno del fagosoma contenente il batterio. I cationi accumulati nel fagosoma generano radicali idrossilici altamente reattivi attraverso la reazione Haber-Weiss, la quale contribuisce all'effetto batteriostatico del macrofago sul batterio ingerito.

Un altro gruppo di scienziati propone che *SLC11A1* possa trasportare gli ioni metallo fuori dal fagosoma, e quindi all'interno del citoplasma (figura 2). Essi hanno dimostrato che, nei macrofagi che esprimono *SLC11A1*, il 28% del ferro era legato alla ferritina e il 60% era nella frazione solubile e quindi nel citoplasma. Su induzione del macrofago, il ferro nel citoplasma era incrementato sino all'82% a spese del ferro legato alla ferritina che era meno del 5%. Questo suggerisce che *SLC11A1* è necessario per rilasciare ferro dai fagosomi e trasportarlo all'interno del citoplasma. Usando calceina come marcatore, è stato dimostrato che *SLC11A1* potrebbe trasportare ferro dalle vescicole al

citoplasma nei macrofagi in riposo. Mediante l'uso di altri indicatori è stato mostrato anche il trasporto di altri cationi, come il Mn^{2+} , verso il citoplasma.

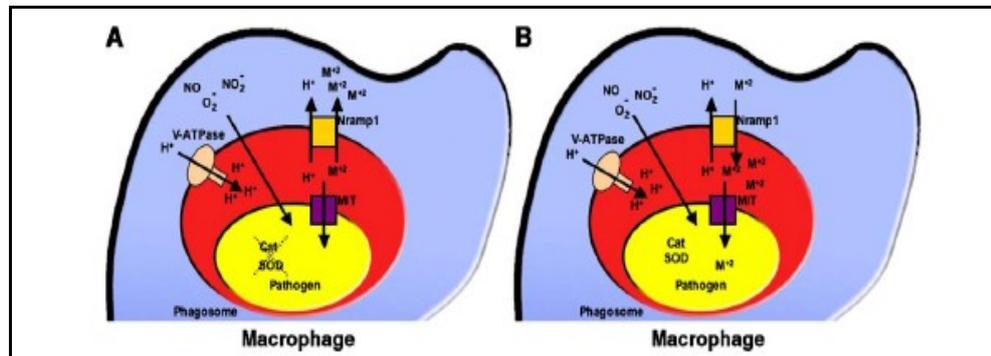


Figura 2. rappresentazione schematica delle due ipotesi di funzionamento di *SLC11A1* nella interazione macrofago-patogeno.

In analogia con questo, *DCT1* è stata associata ai fagosomi contenenti eritrociti, suggerendo un ruolo nel riciclaggio di ferro da eritrociti morenti, i quali rappresentano la fonte principale di ferro nel nostro corpo. Il gene *SLC11A1* è stato anche trovato nei fagosomi delle cellule del Sertoli, suggerendo un ruolo nel riciclaggio del ferro da spermatozoi in via di degenerazione. Questo suggerisce che anche *DCT1* lavori portando ioni metallo dal fagosoma nel citoplasma. Questi Autori sostengono che il trasporto di cationi divalenti fuori del microambiente del batterio (fagosoma) attraverso *SLC11A1* risulta in un aumento dell'attività batteriostatica.

Recentemente è stato dimostrato che *SLC11A1* si comporta proprio come *DCT1*. *SLC11A1* modificato dall'inserzione di un'emoagglutinina nell'ansa del dominio TM 7/8 è stato espresso nella

membrana plasmatica. Il ritrovamento dell'emoagglutinina con immunofluorescenza nelle cellule non permeabilizzate confermava che l'ansa è extracellulare, come precedentemente dimostrato per *DCT1*. In aggiunta, il ritrovamento di *SLC11A1* con anticorpi diretti contro la parte amino terminale della proteina nelle cellule permeabilizzate con TritonX-100, ma non nelle cellule intatte, dimostrava che la parte N-terminale di *SLC11A1* era intracellulare. Nell'insieme, questi risultati indicano che *SLC11A1* ha una tipologia di membrana simile a quella di *DCT1*. Esperimenti fatti utilizzando radioisotopi come $^{55}\text{Fe}^{2+}$ e $^{54}\text{Mn}^{2+}$ come pure fluorofori sensibili ai metalli come la calceina, dimostravano che sia *SLC11A1* che *DCT1* mediano l'ingresso di Fe^{2+} , Mn^{2+} e Co^{2+} e che il trasporto si verifica per il gradiente protonico (figura 3). Questi esperimenti suggerivano anche che *SLC11A1* può essere un trasportatore più efficiente di Mn^{2+} rispetto al Fe^{2+} e un trasportatore più efficiente di Mn^{2+} rispetto a *DCT1*. La topografia di membrana e le proprietà di trasporto di *SLC11A1* e *DCT1* sono indistinguibili (Nevo e Nelson, 2006).

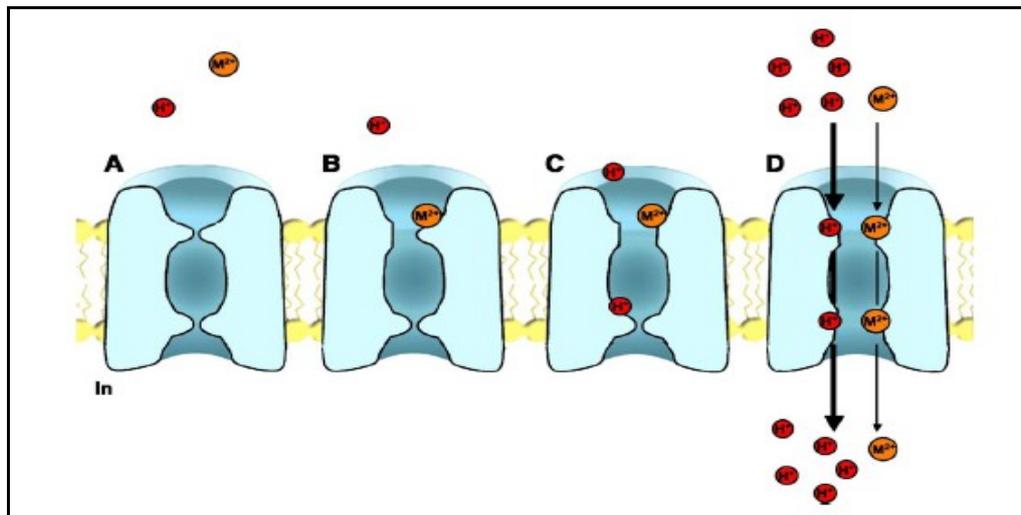


Figura 3. Rappresentazione schematica delle conformazioni di *DCT1* durante il trasporto degli ioni metallo e lo scivolamento dei protoni.

2.6 Il gene *SLC11A1*

Il gene *SLC11A1* è un membro della famiglia *solute carrier family 11* (trasportatori di ioni metallo divalenti accoppiati a trasporto protonico) e codifica per una proteina di membrana *multi-pass*. La proteina funziona come trasportatore di metalli di transizione divalenti (ferro e manganese) coinvolti nel metabolismo del ferro e nei meccanismi di resistenza dell'ospite ad alcuni patogeni. Nell'uomo, alcune mutazioni in questo gene sono state associate con suscettibilità a malattie infettive come la tubercolosi e lebbra, e malattie infiammatorie come artrite reumatoide.

Il percorso che ha portato alla identificazione del gene *SLC11A1* è

Maria Luisa Diaz, Studio della Variazione Genetica al Locus *SLC11A1* in *Capra hircus*, tesi di dottorato in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale, Università degli Studi di Sassari.

partito dalla consapevolezza che nel topo la suscettibilità verso infezioni sostenute da patogeni intracellulari, come *Mycobacterium bovis* è sotto il controllo di fattori genetici dell'ospite. Tali fattori sono stati mappati sul cromosoma 1 del topo in un locus denominato *Bcg* (Gros et al., 1981). Questo gene controlla anche la resistenza a infezioni con altri parassiti intracellulari antigenicamente e tassonomicamente diversi come *Salmonella typhimurium*, *Ity* e *Leishmania donovani*, *Lsh*, per cui il locus è stato inizialmente denominato *Ity/Lsh/Bcg* (Govoni et al., 1995).

Utilizzando tecniche di biologia molecolare vennero identificati ben sette potenziali geni candidati all'interno di questa regione. Soltanto uno dei geni individuati era espresso esclusivamente nelle cellule reticoloendoteliali.

Vidal e Collaboratori, nel 1993, isolarono il gene candidato *Bcg* designato Natural Resistance-Associated Macrophage Protein (*NRAMP*), il quale apparentemente codificava per una proteina integrale di membrana politopica con struttura simile ai trasportatori ritrovati nei procarioti e negli eucarioti (Vidal et al., 1993). Il nome *NRAMP* è stato in seguito sostituito dall'acronimo *SLC11A1* (Solute Carrier Family 11 member A1).

Lo stesso gruppo di ricerca dimostrò, con l'utilizzo di topi *knockout*, che *SLC11A1* era il gene *Bcg/Lsh/Ity*, suggerendo che la proteina codificata dal gene *SLC11A1* nel topo fosse espressa nella membrana fagosomale e funzionasse come un concentratore di prodotti di ossidazione derivati

dall'ossido nitrico ed esplicasse un'attività citocida o citostatica nei confronti dei parassiti endocellulari all'interno dei macrofagi (Vidal et al., 1995).

Nel 1995 Liu e Collaboratori identificarono *SLC11A1* come gene candidato per la suscettibilità alla tubercolosi nell'uomo e individuarono diversi polimorfismi che facilitarono gli studi genetici sul micobatterio e la suscettibilità nella popolazione umana (Liu et al., 1995). Nell'uomo il gene *SLC11A1* è stato mappato nel braccio corto del cromosoma 2 (HSA2) ed è espresso nella milza, nel fegato e nei polmoni. Risulta espresso abbondantemente anche nei monociti/macrofagi circolanti e nei leucociti polimorfonucleati. Inoltre, la migrazione di macrofagi immaturi nei vari tessuti è associata con un aumento di espressione della proteina *SLC11A1*.

Nel 1996, Feng e Collaboratori identificarono l'omologo bovino di *SLC11A1* del topo, che venne mappato sul cromosoma 2 (BTA2). La proteina *SLC11A1* bovina era espressa principalmente nei macrofagi, nella milza e nei polmoni. Gli studi furono condotti su due linee di bovini: naturalmente resistenti (R) o suscettibili (S) alla brucellosi e furono identificati attraverso prove sperimentali fatte in vivo con *Brucella abortus*. Studi in vitro hanno dimostrato che i macrofagi provenienti da bovini R erano capaci di controllare meglio la replicazione intracellulare di *B. abortus* (Feng et al., 1996).

Nel bovino, il gene *SLC11A1* è formato da 15 esoni, si estende

per una lunghezza di circa 11 kbp (figura 4) e codifica per una fosfoglicoproteina di membrana da 90-100 kiloDalton (kDa).

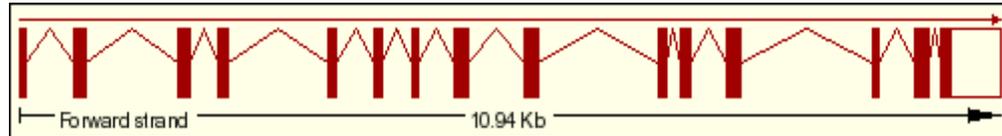


Figura 4. Struttura del gene *SLC11A1* bovino

Nel quindicesimo esone del gene *SLC11A1*, che comprende la regione 3'UTR (*UnTranslated Region*, regione non tradotta), è stata evidenziata la presenza di un microsatellite polimorfico, formato da una serie di ripetizioni del dinucleotide guanina-timina (GTn). Nonostante il significato funzionale del polimorfismo riportato rimanga sconosciuto, la sua presenza è stata associata alla resistenza ad importanti patogeni intracellulari nel bovino.

Struttura della proteina SLC11A1 bovina

Lo studio della sequenza predetta della proteina *SLC11A1*, dedotta dalla sequenza del cDNA, indica che è altamente idrofobica e si compone di 12 domini transmembrana in accordo con le strutture di *SLC11A1* di uomo e topo. Il prodotto di *SLC11A1* del bovino (fig. 5) contiene:

- un dominio SH3-binding motif all'interno di una regione

aminoterminale idrofilica, in posizione aminoacidica 21-24; si ritiene che nella proteina matura questo si localizzi sul lato citoplasmatico della membrana. La funzione del dominio SH3 non è stata ancora del tutto spiegata ma le proteine che lo contengono possono mediare molti processi diversi quali l'aumento della concentrazione locale di proteine, l'alterazione della loro localizzazione subcellulare e l'assemblaggio di grandi complessi multiproteici;

- un sito di glicosilazione in posizione 335 nella regione altamente idrofilica tra i domini transmembrana TM7 e TM8, che si localizza in sede extracellulare;

- quattro siti di fosforilazione PKC sulle serine in posizione 37, 51, 114 e 269 che si localizzano in sede intracellulare;

- un motivo di trasporto di 20 aminoacidi localizzato tra i domini TM8 e TM9 e conservato in *SLC11A1* di topo e uomo. Questo motivo conservato è conosciuto come sistema di trasporto dipendente dal legame di proteine ed si localizza internamente alla membrana.

```

gcttggccatgcccgtgaggggctgcccggcagccagccactgcccagagagctggggctctcATGTCCAGGTGACA 86
                                                                M S G D 4
C0GGCCCCCAAA0CCAGGGAGGGACCCGATATGGCTCCATCTCCAGCCCA0CCAGTCCAGAGCCACAGCAAGCA0CTCC0GGAGGG 172
T G P P K Q G G T R Y G S I S S P P P P P P Q Q A P P G G 33
ACCTACCTAAGTGCAGAGATCC0CATTC0CGATACAGAAATCC0GTAC0NTTC0CC0T0AG0AA0CT0T0GG0C0TTC0AG0GG0C0T0G 258
T Y L E K I P I P D T E S G T F L R K L W A F T G P G 62
ATTCCTCATGAGCATG0CATTTC0TGGAC0CCAGGAA0CATTTGAGT0GGAT0CTTCAGGCTGGGGCTGTGG0CTGGATTC0AA0CT0CTCT 344
F L M S I A P L D P G N I E S D L Q A G A V A G F K L L 90
GGGTCTGCTGTGGCCACAGTGTGG0CTTGGCTTGGCCAG0CACT000T0CC0GGCTGGGGCTGGTGCAGGCAAGG0CA0TGG0C 430
W V L L W A T V L G L L C Q R L A A R L G V V W G K D L G 119
CAGGTCTGC0CATCTCTAC TAC0CTAAGGTGCC00G0CATTC0CTCTGGGTGAC0CATGGAGCTTAG0CATGGTGG0CTCAGACATGCA 516
E V C H L Y Y P K V P R I L L W L T I E L A I V G S D M Q 148
G0AAGTCATTGGCAG0CTATTGCATTGAGTCTGCTCTCC0GG0G0CAATCC0CACTC0GGGGTGGTGGTCTCAT0CC0AG0CTGG 602
E V I G T A I A F S L L S A G R I P L W G G V L I T V V 176
ACACTTTCCTTC0CTCTCC0TGATTA0CTAG0GGTGG0G0A0G0CTTGTGGATTTCTATTATCC0NTAATGG0C0TGG 688
D T P F F E L R L D N Y G L R K L E A P P G F L I T I M A L 205
ACCTTC0GCTATGATAC0TGGTGG0CTCAG0CTCTC0CAG0G0CA0TGGTTC0AGG0C0TGTTC0CT000CT000TCC0CA0G0CTGG 774
T E G Y E Y V V A Q P A Q G A L L Q G L F L P S C P G C G 234
CCAG000GAG0CTCC0CA0G00TGG0CATCATGG000CATCATAT0000CACAACATCTAC0CTGCATTC0CT000TGGTCAAGT 860
Q P E L L Q A V G I I G A I I M P H N I Y L H S S L V K 262
CT0GAGGCTAGAC00G0TCC0GG0000G0G0CATCC0GAG0G0CA0CATGTACTTC0CTGATTTGAAG0C0CA0CTG000CTGTCTGTC 946
S R E V D R R R R A D I R E A N M Y F L I E A T I A L S V 291
TC0TTC0CATCA0CTGTGTGTGTCATGGCTGTCTTGGGCAAG0CCTTCTAC0AG0CAA0CAA0CCAGG0CTGGTTC0ACATCTGTGTGC 1032
S F L I N L F V M A V F G Q A F Y K Q T N Q A A P N I C A 320
CGACAGG0C0TCC0CA0G0TAC0GG0CCGATCTTTC0CCAGG0CA0A0CTGAC0CTGG0CAGTGGACATTTAC0CA0G0G0GGTGA0TC 1119
D S S L H D Y A P I F P R N N L T V A V D I Y Q G G V I 348
TGG0CT000CTTGGTTC0CAG000T0TACATCT0GG000TGGGTCTC0CTGG0TGGTGG0CAG0G0T0CA0CA0TGA000GG0C0C 1204
L G C C L F G P P A I Y I W A V G L L A A G . Q . . S . . T . . M . . T . . R . . T 377
TAG000G0CAG0TTC0TGA0T0G0G0C0TTC0TGA0G0T0G0G0T0C0G0CTTCC000CAGTTC0CTCAGTTC0CTTC0G0C0CAT 1290
X...P...S...Q...E...V...M...E...G...E...L...K...L R W S R F A R V L L T R S C A I 406
CCTG000CAGTTC0CTC0G0CTGTCTTC0AG0G0ACTTGG00G0ACTTC0A0000CTCA00G0C0CTG0CAATGTG0T0CAG0G0CTGC 1376
L P T V L L A V E R D L R D L S G L N D L L N V L O S L 434
TGCCTTC0CTTGG0TGG0C0CATCTC0C0CTCACC0G0ATG000G0C0CTGATG0CAGG0GTTTGG0CAATGG0CTGATGG0CAAA 1462
L L P P A V I P I L L T P T S M P A L M Q E F A N G L V S K 463
GTEATC0CTC0C0CATG0TGGTGG0TGG0TGG000G0TCA000CTTAC0TTC0GTGATCAGCTTAC0TGG0C0G000TCC00CAG0C0TGC 1548
V I T S S I M V L V C A V N L Y F V Y S Y L P S L P H P A 492
CTACTTCAG0CCTGTG0CACTGCTTGG00CAG0CTTAC0TGG0CCTAC0CACTTAC0CTGG0TGG0G0CTTCTCATCACC00G0G0G 1634
Y F S L V A L L A A A Y L G L T T Y L V W T C L I T Q G 520
CCACTTCTTGG000CAG0TCC0CA0CA0G0CTTCTGTATGG0CCTTCTG0AAG0G0ATCAGG0A0G0G0G0G0G0C0TGG0G0TGA 1720
A T L A H S S H Q R F L Y G L P E E D Q E K G R T S G * 548
gctcccacagggcctggccacgggtggaatgagtgggccacagtgccctgtcagacaagggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt 1806
gtgtgtgaaggcagcaagacagacagggagttctggaagctggccaaagtgagttccagagggaactgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt 1892
gectgcccagacaagggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt 1978
tgagttccatagggaactgtctatttccctagctcagatctcagtggtctctgactataaaatggggacaccttaectgtggagtggtgt 2064
aaataagacacttgsacgcagagcctagcacttcagatttaaaaaaaagaaatcataattccaaaagttactgagcactatcaca 2150
ggagtgacctgacagacccacccagctcagggtgggacccaggtccaaaactgatttaaaaataagagtgctgaaaatgctaaataaa 2236
tgctgtgtgtgtcttagtcccagaaaataaaaaaa 2269

```

Figura 5. (da Feng et al., 1996). Sequenza nucleotidica (GenBank accession no. U12862) e sequenza aminoacidica dedotta del cDNA di SLC11A1. Entrambi start codon (ATG) e stop codon (TGA) sono indicati con *. Il presunto SH3-binding motif PXXP è sottolineato (aminoacidi 21-24). Un presunto sito di glicosilazione è indicato mediante doppia linea (aa 235-237), e quattro presunti siti di fosforilazione pre proteine chinasi C sono in grassetto (aa 37, 51, 114, and 269). I segmenti idrofobici corrispondenti ai presunti domini transmembrana (TM) sono sottolineati. Il motivo di trasporto localizzato tra i presunti TM8 e TM9 è sottolineato con una linea punteggiata (aa 370-389).

Le considerazioni sulla struttura della proteina, dedotte dalla sequenza del gene, hanno portato alla costruzione di una possibile

topografia dell'associazione tra proteina e membrana di *SLC11A1* bovino: la parte amminotermine è localizzata nel citoplasma e i 12 domini transmembrana risultano in 5 anse consecutive transmembrana. Questa disposizione inserirebbe il motivo SH3 sulla superficie della membrana citoplasmatica. Il dominio SH3 si continua con due siti di fosforilazione nei domini 2 e 3 e un sito di fosforilazione nei domini 6 e 7, il tutto proiettato verso il citoplasma, i domini 7 e 8 contenenti un sito di glicosilazione extracellulare amminotermine e il sito carbossiterminale nel citoplasma (figura 6).

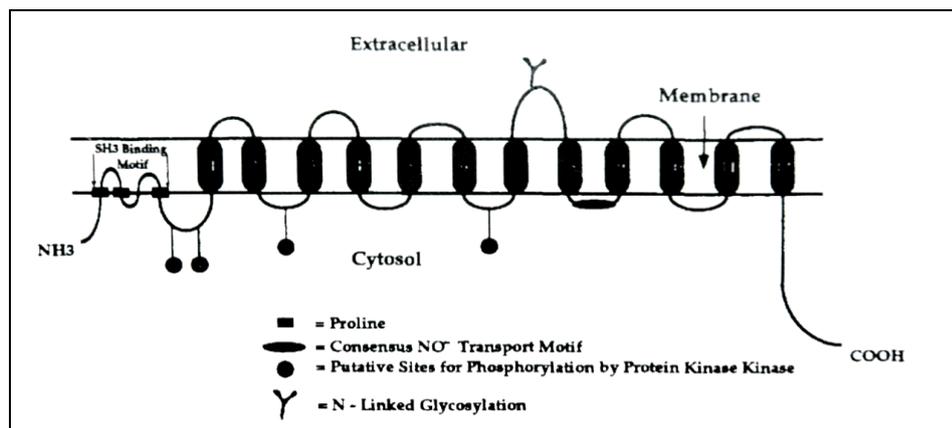


Figura 6. (da Feng et al., 1996). Rappresentazione schematica della struttura della proteina *SLC11A1* bovina. Le proline nel motivo SH3 sono mostrate attraverso quadratini neri sulla faccia intracellulare della membrana. I potenziali siti di fosforilazione della proteinchinasi sono illustrati con cerchietti neri e il presunto sito di glicosilazione, nei domini transmembrana extracellulari, è identificato da una piccola struttura a forma di Y. Le posizioni dei 12 siti transmembrana sono mostrati con la presunta polarità dei domini di membrana che seguono gli spazi citoplasmatico ed extracellulare. Il dominio di trasporto, condiviso con i trasportatori di procarioti ed eucarioti, è rappresentato da un segmento nero, spesso e chiuso, localizzato tra i domini transmembrana TM8 e TM9 (da Feng et al., 1996).

L'omologo bovino del gene *SLC11A1* umano e murino è altamente conservato. Il confronto fra le proteine *SLC11A1* di uomo, topo e bovino, ha evidenziato che esiste un notevole grado di omologia (86,9% residui identici tra topo e bovino; 88,6% residui identici tra uomo e bovino) (Feng et al, 1996). Questo elevato grado di conservazione fra le sequenze del gene *SLC11A1* nelle tre specie considerate (uomo, topo e bovino) permette di dedurre che la funzione fondamentale contro i differenti patogeni intracellulari sia conservata, pur tenendo presente che più geni possono essere attivi nel controllo delle infezioni causate da patogeni virulenti di tipo selvatico (Feng et al., 1996).

3.1 Analisi e caratterizzazione dei microsatelliti

I microsatelliti sono brevi sequenze di 1-7 nucleotidi, ripetute in tandem. Gli alleli dei microsatelliti sono caratterizzati dalla presenza di differenti quantità di unità ripetute. Per questa ragione essi sono utili marcatori per un ampio range di analisi, perché in molti taxa essi mostrano alti livelli di variabilità genetica intraspecifica. Questi marcatori sono anche facilmente rivelabili mediante PCR, producendo risultati altamente riproducibili rispetto ad altri marcatori molecolari. I

microsatelliti sono anche chiamati “simple sequence repeats (*SSR's*)” o “short tandem repeats (*STR's*)”.

L'analisi dei loci STR mediante metodi PCR si è dimostrata informativa per numerose applicazioni a causa dell'alto grado di polimorfismo del numero di ripetizioni presenti nel genoma di molti organismi. I microsatelliti formati dalla ripetizione di due basi (dinucleotide repeat) come ad esempio le ripetizioni (CA)_n sono molto abbondanti nel genoma umano e sono usate routinariamente come marcatori in studi di linkage e per la costruzione di mappe genetiche (Fornage et al., 1992). Anche i microsatelliti formati da ripetizioni di trinucleotidi e tetranucleotidi sono utilizzati per tali studi. Gli STR dinucleotidici sono marcatori genetici essenziali per l'analisi di pedigree e studi di associazione che permettono di verificare l'esistenza di una correlazione tra gli alleli specifici ed una determinata malattia in una popolazione.

I loci STR amplificati PCR sono analizzati mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide e visualizzati mediante fluorescenza o con colorazione argentea (Hays et al., 1992), oppure utilizzando primer marcati con una molecola fluorescente (Sullivan et al., 1992), può essere usata anche l'elettroforesi capillare. Gli alleli amplificati sono visualizzati come bande su gel o sono rappresentati mediante picchi su elettroferogrammi. Tutti questi metodi analitici rivelano, oltre all'allele indagato, un particolare tipo di prodotto di PCR che deriva

dall'amplificazione. Questo prodotto, che differisce in dimensioni dall'allele principale per multipli dell'unità ripetuta, è stato denominato in letteratura in diversi modi: “banda ombra” (shadow band), “prodotto di slittamento della DNA polimerasi” o “banda balbettante” (stutter band) (Litt et al., 1992).

Nel caso di microsatelliti formati dalla ripetizione di dinucleotidi, la stutter band prevalente è in genere due basi più corta della banda dell'allele principale, sono visibili anche stutter bands addizionali che sono più corte di quattro o sei basi. A causa del pattern multibande per ciascun allele, l'interpretazione dei microsatelliti è a volte complicata, in particolare per campioni di DNA che sono miscele di due o più individui o quando due alleli di un singolo individuo hanno dimensioni simili (Litt et al., 1993).

SCOPO DEL LAVORO

Maria Luisa Diaz, Studio della Variazione Genetica al Locus SLC11A1 in *Capra hircus*, tesi di dottorato in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale, Università degli Studi di Sassari.

Scopo del lavoro

Le malattie degli animali da reddito condizionano negativamente le produzioni animali in tutto il mondo. Gli allevatori e altri operatori interessati a promuovere la salute animale possono ridurre gli effetti negativi attuando diverse strategie possibili, come ad es. la chemioterapia, la vaccinazione, il controllo dei vettori della malattia e applicando dei metodi di gestione adeguati. Tuttavia, in molti casi esistono dei problemi per la sostenibilità di tali strategie di controllo della malattia. Questi comprendono principalmente l'impatto ambientale e alimentare, legati alla sicurezza dei trattamenti chimici, e lo sviluppo di resistenza del parassita ai trattamenti applicati. Nel caso degli antibiotici le preoccupazioni riguardano anche i residui nella catena alimentare, con le conseguenti implicazioni per la salute umana, e la comparsa di microrganismi antibiotico-resistenti.

Recentemente, per molte zoonosi, è stata evidenziata l'importanza della componente genetica in relazione alla suscettibilità o resistenza dell'ospite. Infatti, la resistenza naturale alle malattie infettive è legata all'efficienza della risposta immunitaria ed è sotto il controllo genetico.

Di conseguenza è possibile adottare un nuovo strumento di controllo delle zoonosi, rappresentato dalla gestione delle risorse genetiche per migliorare la resistenza o tolleranza trovata nelle popolazioni animali. Questo può essere fatto in diversi modi, a seconda

della natura del problema e delle risorse disponibili. Le strategie possono comprendere la scelta delle razze appropriate per l'ambiente di produzione; l'utilizzo di incroci per introdurre geni in razze che sono ben adattate alle finalità richieste; la selezione per la riproduzione di individui che hanno alti livelli di resistenza alle malattie. Quest'ultimo approccio può essere facilitato se si identificano dei marcatori genetici molecolari associati con i caratteri desiderati, o geni candidati associati con resistenza o suscettibilità a determinate patologie. Il gene *SLC11A1* (*Solute Carrier Family 11 Member A1*) è ritenuto in diverse specie un candidato per caratteri di resistenza, per questa ragione lo scopo del presente lavoro è quello di approfondire l'analisi di tale gene nella specie *Capra hircus*. In particolare verrà analizzata la regione del gene *SLC11A1* corrispondente all'esone 15, che comprende parte della regione 3'UTR e la variabilità genetica del microsatellite (GTn) al 3'UTR in sei razze caprine da latte.

MATERIALI E METODI

Maria Luisa Diaz, Studio della Variazione Genetica al Locus SLC11A1 in *Capra hircus*, tesi di dottorato in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale, Università degli Studi di Sassari.

Materiali e Metodi

Campionamento

Per la ricerca sono state utilizzate 427 capre appartenenti a 6 differenti razze e provenienti da 41 allevamenti, 241 capre di razza Sarda provenienti da 20 allevamenti, 51 capre Maltesi da 5 allevamenti, 54 Saanen da 5 allevamenti, 51 Camosciata delle Alpi da 5 allevamenti, 27 Murciano-Granadina da 3 allevamenti e 30 di razza Nubiana prese da 3 allevamenti. Tutti gli allevamenti erano situati in Sardegna e tutte le capre erano iscritte ai rispettivi libri genealogici e discendevano da differenti padri e madri.

Da ciascun animale sono stati prelevati 10 ml di sangue periferico dalla vena giugulare utilizzando provette contenenti EDTA come anticoagulante (Becton Dickinson, Plymouth, UK).

Estrazione del DNA

Il DNA genomico è stato estratto dai leucociti mediante Puregene Blood Core Kit B (QUIAGEN Sciences, Maryland, USA). Il DNA così ottenuto è stato sottoposto a lettura spettrofotometrica per stabilirne la concentrazione e la purezza.

Disegno dei primer

La coppia di primer inizialmente utilizzata per l'analisi della

regione 3'UTR (esone 15) del gene *SLA11A1* in *Capra hircus* è stata disegnata in base alla sequenza dello stesso gene nel bovino (GenBank U12862) per ottenere un frammento di circa 448 bp:

EX15F: 5'- GTCTGGACCTGTCTCATCACC -3'

EX15R: 5'- AAGTGCTAGGCTCTGCGTTC -3'

Il prodotto di PCR è stato purificato utilizzando Charge Switch PCR Clean-UP Kit (Invitrogen) e sequenziato in entrambe le direzioni per mezzo del ABI Prism 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Dal momento che il sequenziamento diretto di tale frammento di DNA dava dei risultati imprecisi, probabilmente dovuti alla presenza di due microsatelliti polimorfici, il prodotto di PCR è stato clonato su vettore plasmidico pCR2.1 utilizzando il TA cloning kit (Invitrogen, Scotland) e in seguito sequenziato.

Al fine di amplificare selettivamente il microsatellite localizzato all'estremità 5' è stato disegnato un nuovo primer antisenso, denominato 2Ex15R, il quale è stato utilizzato in coppia con il primer senso Ex15F per ottenere un frammento di 233bp:

Ex15F: 5'- GTCTGGACCTGTCTCATCACC -3'

2Ex15R: 5'- ACTCCCTCTCCATCTTGCTG -3'

*Amplificazione del DNA mediante Polymerase Chain Reaction
(PCR)*

Maria Luisa Diaz, Studio della Variazione Genetica al Locus SLC11A1 in *Capra hircus*, tesi di dottorato in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale, Università degli Studi di Sassari.

La PCR è stata condotta su una miscela di reazione del volume finale di 25 µl, in cui 100 ng di DNA genomico sono stati amplificati in presenza di MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, buffer di reazione 1X (20mM Tris-HCl, pH 8.4, 50mM KCl), 0,2 mM di ciascun primer e 1 unità di Taq Polimerasi (Platinum[®] Taq DNA Polymerase, Invitrogen).

Le condizioni termiche di amplificazione, realizzata su Thermal Cycler Mastercycler[®] ep (Eppendorf), prevedevano per entrambi i frammenti una denaturazione iniziale a 94°C per 2,5 minuti, seguita da 35 cicli in cui si susseguivano: una fase di denaturazione a 94°C per 20 secondi, una fase di annealing ad una temperatura di 58 °C, una fase di estensione del DNA a 72 °C per 30 secondi e una fase di estensione finale a 72°C per 10 minuti.

I prodotti della PCR sono stati esaminati mediante elettroforesi su gel di agarosio alla concentrazione del 2% (4,0 V/cm), seguita da colorazione con bromuro d'etidio (0,5 mg/ml), e successiva lettura al transilluminatore UV per visualizzare le bande del frammento di DNA amplificato.

Analisi SSCP

La ricerca di eventuali polimorfismi, nei frammenti di DNA amplificati tramite PCR, è stata realizzata con la tecnica della Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP), usando il dispositivo per elettroforesi verticale D-CODE System for SSCP (Bio Rad Laboratoires,

Hercules, CA). I campioni da analizzare venivano denaturati mescolando 3µl del prodotto di PCR con 7 µl di soluzione denaturante preparata con 95% formamide, 25 mM EDTA, 0.025% xylene-cyanole e 0.025% blu di bromofenolo. Dopo denaturazione al calore (95 °C per 10 minuti) i campioni venivano immediatamente raffreddati in ghiaccio e quindi depositati nei pozzetti del gel di poliacrilamide.

Dopo aver realizzato diverse prove, le condizioni migliori per l'analisi dei diversi frammenti sono risultate le seguenti: gel di poliacrilamide al 8%, con un rapporto acrilamide/bis di 37,5:1, contenente 1,25% di glicerolo. Il tampone elettroforetico era TBE (tris borato-EDTA) 0,5X; TEMED e ammonio persolfato (10%) sono stati utilizzati rispettivamente come iniziatore e catalizzatore. Le condizioni della corsa elettroforetica erano: 25W, 1000V e 150mA per 5 h, alla temperatura costante di 15°C. Le bande ottenute venivano visualizzate al transilluminatore UV dopo colorazione con Sybr-Gold (Invitrogen).

Analisi del Microsatellite

La genotipizzazione del microsatellite è stata effettuata sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi SSCP del frammento amplificato con la coppia di primer Ex15F/2Ex15R contenente solo la serie di ripetizioni GT localizzata all'estremità 5' dell'esone 15.

Al fine di attribuire il numero di ripetizioni GT presente nei soggetti analizzati, da uno a tre ampliconi rappresentativi di ciascun

pattern polimorfico ottenuto in SSCP sono stati riamplicati utilizzando il forward primer Ex15F marcato all'estremità 5' con una molecola fluorescente: 6-carboxyfluorescein (6-FAM), in coppia con il reverse primer 2Ex15R. La genotipizzazione è stata effettuata mediante il sequenziatore automatico ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystem).

Analisi dei Dati

La sequenza nucleotidica è stata analizzata utilizzando i software Bioedit (Hall 1999) e ClustalW (Clustalw.genome.ad.jp/). Il software GenPop (Raimond and Rousset 1995) è stato utilizzato per calcolare le frequenze alleliche e genotipiche e l'equilibrio di Hardy-Weinberg.

In base al genotipo del microsatellite sono state effettuate le seguenti misurazioni della variabilità genetica, utilizzando il software Microsatellite toolkit (<http://animalgenomics.ucd.ie/sdeparck/ms-toolkit/>): frequenze alleliche, eterozigosità osservata (H_o), diversità genica di Nei (H_e) e grado di informatività del polimorfismo (Polymorphic Information Content, PIC). Il coefficiente di differenziazione genetica (G_{ST}) è stato calcolato come una misura della diversità genetica utilizzando il programma FSTAT (Goudet 1995).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Risultati e discussione

Analisi della Sequenza dell'Esone 15 del Gene SLC11A1

La sequenza dell'esone 15 del gene *SLC11A1* in *Capra hircus* amplificato con la coppia di primer Ex15R/Ex15F e clonato, è stata pubblicata su GenBank (acc. no. GU440577).

L'analisi del polimorfismo di conformazione (SSCP) del DNA di questa regione, realizzata su una popolazione di capre appartenenti alle razze Sarda, Maltese, Saanen, Camosciata delle Alpi, Murciano-Granadina e Nubiana, ha messo in evidenza la presenza di differenti pattern polimorfici. Il sequenziamento di campioni rappresentativi per ciascun pattern polimorfico ha rivelato che il polimorfismo osservato era dovuto alla presenza di due microsatelliti costituiti da un numero variabile di ripetizioni (GT)_n. Infatti, nelle capre analizzate non vi era alcuna variabilità nella sequenza nucleotidica esternamente ai due microsatelliti.

Poiché è stato osservato un notevole grado di omologia fra le proteine *SLC11A1* di uomo, topo e bovino (Feng et al., 2006), è stato realizzato un confronto tra la sequenza dell'esone 15 caprino, oggetto della presente ricerca, e le sequenze omologhe di alcuni ruminanti pubblicate in banca dati. La comparazione della sequenza di *Capra hircus* (GU440577) con quelle di *Ovis aries* (NM_001009345), *Bos taurus* (NM_174652), *Bison bison* (U39614) e *Cervus elaphus*

aries e *Cervus elaphus* sono più corte, essendo rispettivamente di 375 bp e 382 bp circa, e in entrambe la ripetizione (GT)_n è unica.

L'allineamento delle sequenze suggerisce che una possibile spiegazione di tutto questo sia una delezione, che nella capra e nella pecora ha rimosso in differenti proporzioni la sequenza localizzata tra le due ripetizioni (GT)_n presenti nel bovino e nel bisonte. Si può quindi ipotizzare che questo sia il risultato di un evento di ricombinazione tra le due sequenze ripetute. Comunque, nella regione 3'UTR del gene *SLC11A1* possono essere accaduti diversi piccoli riarrangiamenti indipendenti, come eventi duplicativi e delezioni, che hanno contribuito alla variabilità del locus *SLC11A1* nei diversi ruminanti.

Sono sempre più numerose le indagini che dimostrano come le regioni non tradotte sono delle importanti regioni regolatrici, sensibili a numerosi elementi trans-agenti (*trans-acting elements*), specialmente i microRNA. Infatti la lunghezza media delle regioni UTR aumenta con la complessità dell'evoluzione animale (Farh et al. 2005). Per questa ragione, la presenza di due microsatelliti polimorfici nella regione 3'UTR del gene *SLC11A1* della capra potrebbe alterare i normali meccanismi di RNA editing che controllano la stabilità, la traducibilità o la localizzazione dell'mRNA (Mattick and Makunin 2006), elementi che possono alterare l'espressione del gene e quindi il suo contributo ai meccanismi di resistenza/suscettibilità ai patogeni.

Analisi del microsatellite

L'analisi SSCP dell'esone 15 amplificato con i primer Ex15F/2Ex15R ha rivelato la presenza di 23 differenti pattern polimorfici (Fig. 8).

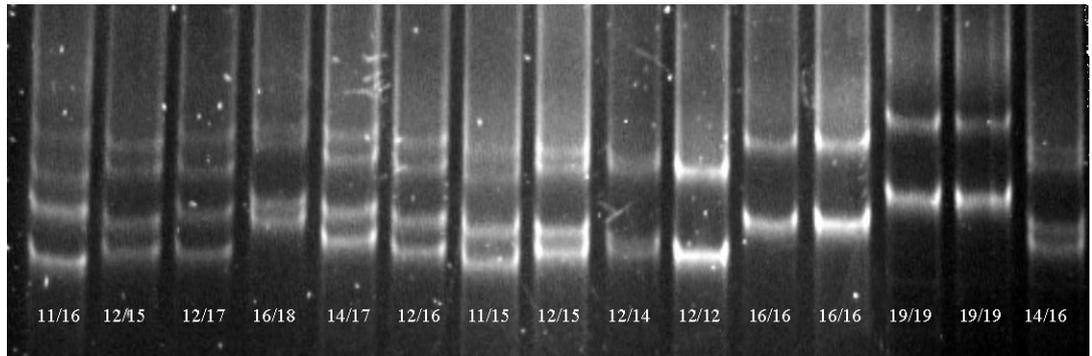


Figura 8. PCR-SSCP del locus *SLC11A1*. I numeri in ciascuna lane indicano il genotipo in relazione al microsatellite.

Tutti i soggetti analizzati sono stati raggruppati sulla base dei profili che assumevano in SSCP. I campioni rappresentativi sono stati sequenziati per la genotipizzazione. I risultati hanno mostrato che i frammenti amplificati avevano dimensioni variabili tra 222 bp e 238 bp, e il numero di ripetizioni GT variava rispettivamente da 11 a 19. E' stato trovato un totale di 8 alleli: GT11, GT12 e GT14-19, l'allele GT13 non è stato trovato in nessun soggetto.

La distribuzione tra razze dei genotipi del microsatellite ha rivelato che GT16/GT16 è il più frequente in tutte le razze analizzate, eccetto che nella Nubiana (Tab.1).

Riguardo gli altri genotipi omozigoti, sono stati trovati solo 12/12 in Sarda e Nubiana, 17/17 in Sarda, Camosciata delle alpi e Nubiana e 19/19 in Sarda e Maltese, con frequenze inferiori al 10%.

Fra i genotipi eterozigoti, il 16/17 prevaleva nelle Sarde, nelle Saanen (con lo stesso valore di 15/16), nelle Camosciata delle Alpi e nelle Nubiane, mentre il genotipo 16/19 mostrava frequenze marcatamente più elevate nelle Maltesi e nelle Nubiane, nelle quali risulta essere il genotipo più frequente.

Tabella 1. frequenze genotipiche del microsatellite al 3'-UTR del gene *SLC11A1*. ¹Frequenza = 0.

Genotipo	Razza						Popolazione complessiva n = 427
	Sarda n = 214	Maltese n = 51	Saanen n = 54	Camosciata delle Alpi n = 51	Murciano- Granadina n = 27	Nubiana n = 30	
GT11/GT15	0.005	-	-	-	-	-	0.002
GT11/GT16	0.014	-	-	-	0.186	-	0.019
GT11/GT17	¹	-	-	0.020	-	-	0.002
GT12/GT12	0.005	-	-	-	-	0.033	0.005
GT12/GT14	0.005	-	-	-	-	-	0.002
GT12/GT15	0.009	-	-	-	-	0.033	0.007
GT12/GT16	0.033	0.039	0.093	0.020	0.186	0.067	0.052
GT12/GT17	0.009	-	-	-	-	0.067	0.009
GT12/GT19	0.005	-	-	-	-	0.033	0.005
GT14/GT15	-	0.020	-	-	-	-	0.002
GT14/GT16	0.065	0.059	0.036	0.039	-	-	0.049
GT14/GT17	0.019	-	-	0.020	-	-	0.012
GT15/GT16	0.037	0.059	0.111	0.020	-	0.033	0.044
GT15/GT17	0.005	-	-	-	-	-	0.002
GT15/GT19	-	-	-	-	-	0.033	0.002
GT16/GT16	0.485	0.431	0.649	0.606	0.554	0.067	0.491
GT16/GT17	0.173	-	0.111	0.177	0.037	0.133	0.133
GT16/GT18	0.005	-	-	-	0.037	-	0.005
GT16/GT19	0.061	0.353	-	-	-	0.301	0.094
GT17/GT17	0.047	-	-	0.098	-	0.033	0.037
GT17/GT19	0.009	-	-	-	-	0.100	0.012
GT18/GT19	-	-	-	-	-	0.067	0.005
GT19/GT19	0.009	0.039	-	-	-	-	0.009

Animali con gli alleli GT12 e GT16 erano presenti in tutte le sei razze, mentre non sono stati trovati alleli razza-specifici (Tab.2).

Tabella 2. frequenze alleliche del microsatellite al 3'-UTR del gene *SLC11A1*. ¹Frequenza = 0.

Allele	Razza						Popolazione complessiva n = 427
	Sarda n = 214	Maltese n = 51	Saanen n = 54	Camosciata delle Alpi n = 51	Murciano- Granadina n = 27	Nubiana n = 30	
GT11	0.009	- ¹	-	0.010	0.093	-	0.012
GT12	0.035	0.019	0.046	0.010	0.093	0.133	0.042
GT14	0.044	0.039	0.018	0.029	-	-	0.033
GT15	0.028	0.039	0.055	0.010	-	0.050	0.030
GT16	0.681	0.687	0.825	0.735	0.778	0.334	0.687
GT17	0.154	-	0.056	0.206	0.018	0.183	0.123
GT18	0.002	-	-	-	0.018	0.033	0.005
GT19	0.047	0.216	-	-	-	0.267	0.068

La maggior parte delle capre presentava l'allele GT16 (68.7%). Gli altri alleli mostravano frequenze molto inferiori (< 15%), tranne GT17 nelle razze Sarda, Nubiana e Camosciata delle Alpi e GT19 nelle Maltesi e nelle Nubiane. Quest'ultima razza esprime una distribuzione più uniforme delle frequenze alleliche mostrando tre alleli con frequenza maggiore del 10% : GT19, GT17 e GT12.

L'allele GT13, che è il più frequente nel bovino, non è stato trovato in nessuna capra utilizzata nel nostro studio. Questo potrebbe indicare che questo allele sia svantaggioso per la specie caprina, nonostante l'allele GT13 sia stato associato con la resistenza alla brucellosi nel bovino (Barthel et al. 2001).

Alcuni Autori hanno realizzato una analisi di entrambi i microsatelliti presenti nella regione 3'UTR del gene *SLC11A1* in capre native greche. Essi hanno identificato la presenza di 4 alleli per il microsatellite al 5' (GT14, 15, 16 e 18) nessuno dei quali associato con la resistenza alla paratubercolosi, mentre un'associazione è stata riscontrata per gli alleli GT7 e GT8 del microsatellite localizzato all'estremità 3' (Liandris et al. 2009).

Nella razza Sarda sono stati trovati 8 alleli del microsatellite, la Camosciata delle Alpi e la Nubiana hanno 6 alleli, mentre la Maltese, la Saanen e la Murciano-Granadina hanno solo 5 alleli (Tab. 3). La razza Sarda presentava il maggior numero di alleli, questo potrebbe essere dovuto all'elevato numero di soggetti analizzati e non alle caratteristiche della razza. Il grado di informatività del polimorfismo (polymorphism information content, PIC) variava tra 0,300 (Saanen) e 0,725 (Nubiana), mentre il PIC per la popolazione globale era 0,481. Ogni razza rispettava l'equilibrio di Hardy-Weinberg per l'analisi del microsatellite analizzato. L'eterozigosità osservata (H_o) variava tra 0,294 nella Camosciata delle Alpi a 0,867 nella Nubiana e l'eterozigosità attesa (H_e) variava tra 0,315 nella Saanen a 0,776 nella Nubiana.

Tabella 3. Equilibrio di Hardy-Weinberg, eterozigosità osservata e attesa e PIC del microsatellite al 3'UTR del gene *SLC11A1*.

	Razza						Popolazione complessiva
	Sarda	Maltese	Saanen	Camosciata delle Alpi	Murciano-Granadina	Nubiana	
	n = 214	n = 51	n = 54	n = 51	n = 27	n = 30	n = 427
n.alleli	8	5	5	6	5	6	8
PIC ^a	0.480	0.432	0.300	0.369	0.355	0.725	0.481
P-HW ^b	0.197	0.635	0.993	0.672	0.996	0.576	-
Ho ^c	0.453	0.529	0.352	0.294	0.444	0.867	0.459
He ^d	0.509	0.484	0.315	0.420	0.384	0.776	0.504
G _{ST} ^e							0.084

^a Informatività del polimorfismo

^b Valore di probabilità per l'equilibrio di Hardy-Weinberg

^c Eterozigosità osservata

^d Eterozigosità di Nei

^e Grado di differenziazione della popolazione

Gli indici di variabilità genetica erano molto diversi all'interno delle popolazioni, ad esempio la razza Nubiana mostrava i valori più alti ed era l'unica razza dove l'allele GT16 non era quello prevalente. Questa differenza potrebbe essere legata alla funzione del gene *SLC11A1*, infatti studi realizzati in Thailandia e nelle Filippine hanno mostrato una minor resistenza ai parassiti nelle razze derivate dalle Anglo-Nubiane e negli incroci di queste razze, confrontate con le capre indigene (Baker and Grey, 2004).

Il valore G_{ST} , che indica la proporzione della variabilità genetica attribuibile alle differenze tra razze, era 0.084; questo implica che il

91.6% della diversità genetica totale era dovuta alle differenze tra le razze analizzate. Inoltre il coefficiente di differenziazione genetica trovato in questo studio ($G_{ST} = 0.084$) e calcolato su un solo microsatellite, è simile ai valori calcolati da altri Autori utilizzando microsatelliti per misurare la diversità genetica in capre di razze svizzere (G_{ST} overall average = 0.084) (Glowatzky-Mullis et al. 2008) e in popolazioni caprine del Sud Italia (0.073) (Iamartino et al. 2005).

CONCLUSIONI

Conclusioni

Il microsatellite analizzato in questo lavoro è risultato essere altamente informativo e può essere utilizzato come marcatore di DNA polimorfico per realizzare analisi di linkage genetico nelle capre. Inoltre, potrebbe essere utilizzato per studi di associazione su resistenza-suscettibilità alle malattie o in studi sulla produttività.

BIBLIOGRAFIA

Maria Luisa Diaz, Studio della Variazione Genetica al Locus SLC11A1 in *Capra hircus*, tesi di dottorato in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale, Università degli Studi di Sassari.

- Alexander J. W.** (1980). *The role of host defence mechanism in the surgical infections*, Surg. Clin. North Am., 60,107.
- Baker R. L.**, Gray G. D. (2004). *Appropriate breeds and breeding schemes for sheep and goats in the tropics*. In: Sani R. A., Gray G. D., Baker R. L. (eds) *Worm Control for Small Ruminants in Tropical Asia*, ACIAR Monograph 113, Canberra, Australia, pp 63-95.
- Balasini D.** (2001). *Zootecnica applicata Ovicaprini*. Edagricole Calderini.
- Barger I.A.** (1989). *Genetic resistance of hosts and its influence on epidemiology*. Rev. Vet. Parasitol. 311: 21-35.
- Barthel R.**, Feng J., Piedrahita J. A., McMurray D. N., Templeton J. A., Adams L. G. 2001. *Stable transfection of bovine Nramp1 gene into murine RAW2647 cells: effects on Brucella abortus survival*. Infect. Immun 69:3110-9.
- Bellamy R.** (1999). *The natural resistance-associated macrophage protein and susceptibility to intracellular pathogens*. Microbes and Infection 1, 23-27.
- Bishop M.D.**, Kappes S.M., Keele J.W., Stone R.T., Sunden S.L.F., Hawkins G.A., Toldo S.S., Fries R., Grosz M.D., Yoo J. and Beattie C.W. (1994). *A genetic linkage map for cattle*. Genetics. 136: 619-39.
- Bittante G.**, Andrighetto I., Ramanzin M. (2005). *Tecniche di*

produzione animale. Liviana Editore, Padova.

- Cameron H. S.**, Hughes E.H., Gregory P.W. (1940). *Studies on genetic resistance in swine to Brucella infection.II. A bacteriology examination to resistant stock*. Cornell Vet., 31: 21-24.
- Canonne-Hergaux, F.**, Zhanh, A.S., Ponka, P., Gros, P. (2001). Characterization of the iron transporter *DMT1 (NRAMP2/DCT1)* in red blood cells of normal and anemic *mk/mk* mice. Blood, 98: 3823-3830.
- Comstock G. W.** (1978). *Tuberculosis in twins, a re-analysis of the Proffit survey*. Am. Rev respir. Dis., 117: 621-624.
- Falascini A.** (1996). *Zootecnica speciale*. Edagricole-Edizioni Agricole.
- Farh K.K.**, Grimson A., Jan C., Lewis B.P., Johnston W. K., Lim L. P., Burge C. B., Bartel D. P. (2005). *The widespread impact of mammalian microRNAs on mRNA repression and evolution*. Science 310:1817-1821.
- Farrar W. L.**, Mizel S. B., Farrar J. J. (1980). *Partecipation of lymphocyte activatory factor(interleukin 1) in the induction of cytotoxic T cell responses*, J. Immunol., 124, 1371-7.
- Faulk W. P.**, Greenwood B.M. (1977). *Infections disease* in E. J. HOLBOROW , W. J. REVES, *Immunology in medicine*, Academic Press, London, p 433.

- Feng J.**, Li Y., Hashad M., Schurr E., Gros P., L. Adams G. and Templeton J. W., (1996). *Bovine Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1 (Nramp 1) Gene*. *Genome research* 6: 956-964.
- Fine P.E.M.** (1981). *Immunogenetics of susceptibility to leprosy, tuberculosis, and leishmaniasis. An epidemiological perspective*. *Int. J. Lepr. other mycobact. Dis.*, 49: 437-454.
- Fornage, M.**, Chan, L., Siest, G., Boerwinkle, E. (1992). *Genomics*, 12, 63-68.
- Fries R.**, Eggen A., Womack J.E. (1993). *The bovine genome map. Mammalian genome*. 4: 405-428.
- Glowatzky-Mullis M.L.**, Muntwyler J., Bäumle E., Gaillard C. (2008). *Genetic diversity measures of Swiss goat breeds as decision-making support for conservation policy*. *Small. Rum. Res.* 74:202-211.
- Gros P.**, Skamene E., Forget A. (1981). *Genetic control of natural resistance to Mycobacterium bovis BCG*. *J. Immunol.* 127: 2417-2421.
- Govoni G.**, Vidal S., Cellier M., Lepage P., Malo D., and Gros P., (1995). *Genomic Structure, Promoter Sequence, and Induction of Expression of the Mouse NRAMP1 Gene in Macrophages*. *Genomics* 27: 9-19.
- Gruenheid S.**, Pinner E., Desjardins M., Gros P. (1997). *Natural resistance to infection with intracellular pathogens: The NRAMP1*

protein is recruited to the membrane of the phagosome. J. Exp. Med. 185:717-730.

Gunshin H., Mackenzie B., Berger U. V., Gunshin Y., Romero M.F., Boron W.F. Nussberger S., Gollan J. L., Hediger M.A. (1997). *Cloning and characterization of a proton-coupled mammalian metal-ion transporter.* Nature 388:10089-10093.

Hays, S.R., Yue, S., Wemmer, D.E., Quesada, M.A., Haugland, R.P., Mathies, R.A., Glazer, A.N. (1992). Nucleic Acids Res., 20: 2803-2812.

Hutt F.B. (1958). *Genetic resistance to disease in domestic animals.* Comstock Publishing Associated, Ithaca, New York, 198 pp.

Iamartino D., Bruzzone A., Lanza A., Blasi M., Pilla F. (2005). *Genetic diversity of Southern Italian goat populations assessed by microsatellite markers.* Small. Rum. Res: 57: 249-255.

Issekutz A.C., Biggar W.D. (1977). *Influence of serum-derived chemotactic factors and bacterial product on human neutrophil chemotaxis.* Infect. Immun. 15: 212-20.

Jacobi A. (1880). *Treatise on diphtheria.* William Wood and Co.. New York. 32-33.

Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.J. (2007). Immunobiologia (3a edizione italiana sulla 6a inglese), Padova, Piccin. ISBN 88-299-1814-8.

- Liandris E.**, Gazuoli M., Ikonopoulou J. (2009). *Characterization of the caprine (Capra hircus) SLC11A1 gene: innate resistance to paratuberculosis*. Online J. Vet. Res. 13: 41-52.
- Litt, M.**, Hauge, X., Sharma, V. (1993). BioTechniques 15: 280-284.
- Liu J.**, Fujiwara M., Buu N.T., Sanchez F.O., Cellier M., Paradis A.J., Frappier D., Skamene E., Gros P., Morgan K., Schurr E., (1995). *Identification of polymorphisms and sequence variants in the human homologue of the mouse natural resistance-associated macrophage protein gene*. Am. J. Hum. Genet. 56: 845-853.
- Lunney J.K.** (1986). *Genetic control of host resistance to diseases*. In *Biotechnology for solving agricultural problems*. (P.C. Augustine, H.D. Danforth and M.R. Bakst. eds). Martinus Nijhoff Publishers. Boston, 285-297.
- MacLeod R.**, Buschman E., Arbuckle L.d., Skamene E. (1995). *Immunogenetics in the analysis of resistance to intracellular pathogens*. Curr. Opin. Immunol., 7: 539-552.
- Marciani P.**, Trotti D., Hediger M. A., Monticelli G. (2004). *Modulation of DMT1 activity by redox compounds*. J. Membr. Biol. 197 (2): 91-99.
- Mattick J. S.**, Makunin I. V. (2006). *Non-coding RNA*. Hum. Mol. Genetics 15, 1: R17-R29.
- Mims C.A.**, White D.O. (1984). *Viral pathogenesis and immunology*. Blackwell. Oxford. 123-167.

- Nelson D. S.** (1976). *Immunobiology of the macrophage*. “Academic Press”, New York, San Francisco, London.
- Nevo Y., Nelson N.** (2004). *The mutation F227I increases the coupling of metal ion transport in DCT1*. J. Biol. Chem. 27951: 53056-53061.
- Nevo Y., Nelson N.** (2006). *The NRAMP family of metal-ion transporter*. Biochimica et Biophysica Acta 1763: 609-620.
- Okubo M., Yamada K., Hosoyamada M., Shibasaki T., Endou H.** (2003) *Cadmium transport by human Nramp2 expressed in Xenopus laevis oocytes*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 187(3): 162-167.
- Regolamento CE 1831/2003**. Online: <http://eur-lex.europa.eu/>.
- Roberts E., Card L.E.** (1926). *The inheritance of resistance to bacillary white diarrhea*. Poult. Sci., 6: 18-23.
- Roitt J.M.** (1977). *Immunity to infection*, in J.M. Roitt, *Essential immunology*, 3^a ed., Blackwell, Oxford.
- Rubino**. L'allevamento caprino. ASSONAPA-Roma.
- Rubino R., Morand-Fehr P., Sepe L.** (2004). *Atlas of goat products*. La biblioteca di Caseus.
- Sacher A., Cohen A., Nelson N.** (2001). *Properties of the mammalian and yeast metal ion transporters DCT1 and Smflp expressed in Xenopus laevis oocytes*. J. Exp. Biol. 2046: 1053-1061.

- Serafini U., Ricci M., Bruno G.** (1980). *Immunità e malattie infettive* in U. SERAFINI, *Compendio di medicina interna*, USES, Firenze, p.350.
- Spooner R.L., Bradley J.S. and Young G.B.,** (1975). *Genetics and disease in domestic animals with particular reference to dairy cattle*. Vet. Rec. 97: 125-130.
- Sullivan K.M., Pope S., Gill P., Robertson, J.** (1992). PCR Methods Appl., 2: 34-40.
- Tortorelli N.** (1983). *Zootecnica speciale*. Edagricole.
- Turk J.L.** (1976). *Spectrum of host response in infections disease* in D.L. Demon, *Infections and immunology in the rheumatic disease*. Blackwell, Oxford.
- Vidal S.M., Malo D., Vogan K., Skamene E., Gros P.** (1993). *Natural resistance to infection with intracellular parasites: Isolation of a candidate for Bcg* Cell 73: 469-485.
- Vidal S.M., Tremblay M.L., Govoni G., Gauthier S., Sebastiani G., Malo D., Skamene E., Olivier M., Jothy S., Gros P.** (1995). *The Ity/Lsh/Bcg locus: Natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the NRAMP gene*. J. Exp. Med. 182: 655-666.
- Wakelin D., Blackwell J.M.** (1988). *Genetics of resistance to bacterial and parasitic infection*. Taylor and Francis, London. 287 pp.

Womack J.E. (1988). *Molecular cytogenetics of cattle: a genomic approach to disease resistance and productivity*. J. Dairy Sci., 71: 1116-1123.