



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO in

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

Direttore: Prof. Sergio Ledda

INDIRIZZO: Riproduzione, Produzione e Benessere Animale (XXVI CICLO)

(Coordinatore: prof. Sergio Ledda)

STUDIO DELL'ESPRESSIONE DEL GENE SREBP-1 E SUE RELAZIONI CON LA COMPONENTE LIPIDICA DEL LATTE OVINO

Docente Guida

Prof. Vincenzo Carcangiu

Direttore

Prof. Sergio Ledda

Tesi di dottorato della

Dott.ssa Sara Bodano

ANNO ACCADEMICO 2012 - 2013

INDICE

PREMESSA	Pag	1
INTRODUZIONE	Pag	4
Componente lipidica del latte	Pag	5
Metabolismo ruminale	Pag	13
Metabolismo lipidico mammario	Pag	28
Geni e secrezione dei grassi nel latte	Pag	36
SREBP-1 e sue funzioni	Pag	38
SCOPO	Pag	53
MATERIALE E METODI	Pag	58
RISULTATI	Pag	72
DISCUSSIONE	Pag	88
CONCLUSIONI	Pag	98
BIBLIOGRAFIA	Pag	101

Premessa

I lipidi sono composti organici di notevole interesse in quanto giocano un ruolo rilevante in diverse funzioni e processi dell'organismo animale. Infatti, essi sono una importante fonte di energia, costituiscono parte essenziale delle membrane cellulari e sono precursori di molecole coinvolte in molti processi biologici quali ormoni steroidi e vitamine, acidi biliari ed eicosanoidi.

Nel mondo animale il fabbisogno organico di lipidi viene fornito attraverso la dieta e, in parte, con la via metabolica endogena. I lipidi rappresentano una forma di energia concentrata per l'organismo animale: un grammo di lipidi fornisce più del doppio dell'energia rispetto alla stessa quantità di glucidi e proteine. Tuttavia questi composti, se assunti in maniera non equilibrata o in dosi eccessive, possono essere causa di patologie metaboliche, soprattutto nei paesi economicamente più sviluppati. Uno squilibrio nella dieta, a favore dei lipidi, porta ai ben noti problemi di obesità e disturbi cardiovascolari dovuti alla deposizione di placche aterosclerotiche a livello dei vasi sanguigni.

La maggior parte degli alimenti di origine animale, tra cui anche il latte, è fonte di acidi grassi saturi e di colesterolo ma povera di acidi grassi insaturi che al contrario dei primi hanno diversi effetti benefici sulla salute umana.

Il latte e i suoi derivati rappresentano attualmente un importante argomento di studio riguardante la salute pubblica, essendo alimenti

largamente consumati e imputati come una tra le principali fonti di ipercolesterolemia nella popolazione. Sulla base di questo si è cercato di modificare la produzione di latte e dei suoi derivati a favore di prodotti con un più basso tenore di grasso e, in particolare, della sua componente satura.

I ruminanti, principali produttori di latte per consumo umano, hanno un limite alla produzione di latte ricco in acidi grassi insaturi, in quanto, a livello ruminale si verifica un processo di bioidrogenazione che porta alla saturazione della maggior parte dei lipidi introdotti con la dieta. Anche la somministrazione, tramite by-pass, di acidi grassi insaturi in alte quantità determina un blocco della produzione a livello mammario di questi lipidi sia nei piccoli che nei grossi ruminanti (Bauman et al., 2008; Sinclair et al., 2010).

Una delle possibili soluzioni per arricchire il latte di acidi grassi insaturi, considerati non nocivi per l'uomo, è quella di aggiungerli durante il processo di lavorazione. In alternativa, lo studio dei geni coinvolti nella secrezione del grasso nel latte potrebbe portare alla selezione di animali geneticamente predisposti alla produzione di discrete quantità di latte ricco in acidi grassi insaturi.

Tuttavia lo studio dell'espressione dei geni implicati nella sintesi degli acidi grassi mammari potrebbe spiegare il meccanismo attraverso il quale viene regolato questo complesso processo, arrivando alla produzione di alimenti in linea con le raccomandazioni sulla salute pubblica, e senza

necessariamente dover arrivare ad un sostanziale cambiamento delle abitudini alimentari dell'uomo.

INTRODUZIONE

Componente lipidica del latte

Il latte ovino contiene una percentuale in grassi che va dal 6 all'8%, con punte del 10-11%; il 98% è rappresentato dai trigliceridi, lo 0,8% dai fosfolipidi, una piccola percentuale di colesterolo, 1,2 diacilglicerolo, monogliceridi e acidi grassi liberi (Secchiari et al., 2002).

Il grasso è una delle componenti più variabili del latte in quanto la sua concentrazione dipende da diversi fattori, inclusi quelli genetici, e quelli legati allo stato fisiologico dell'animale e all'ambiente (Harvatine et al., 2009).

Uno degli aspetti fisiologici più incisivi nella determinazione della concentrazione del grasso è dato dallo stadio della lattazione; concentrazioni elevate si riscontrano nel primissimo stadio di lattazione, a pochi giorni dal parto, per poi scendere nel corso dei primi 50-60 giorni dall'inizio della lattazione, in rapporto inversamente proporzionale alla produzione. La percentuale di grasso tende ad aumentare nuovamente con l'avanzare della lattazione, tanto che la differenza tra il valore minimo e quello massimo di grasso può avere uno scarto di circa il 30%.

I lipidi del latte si trovano sotto forma di globuli sferici che vengono secreti direttamente dalla cellula epiteliale della ghiandola mammaria e riversati nel lume alveolare. Questi globuli di grasso sono costituiti da un core di trigliceridi rivestito da una proteina fortemente polare con una coda

lipidica che prende il nome di membrana del globulo o Milk Fat Globule Membrane (MFGM) (Jensen et al., 2002).

La MFGM permette alle molecole idrofobe come i trigliceridi di rimanere sospese in ambiente acquoso, in quanto la frazione fosfolipidica della membrana agisce come barriera protettiva del core del globulo (Mather et al., 1998). Oltre al suo effetto emulsionante, la membrana del globulo, protegge i trigliceridi dall'azione delle lipasi normalmente presenti nel latte.

Da questo si può dedurre che quanto maggiore è il numero di globuli di grasso presente nel latte e, quindi tanto minore è il loro diametro, tanto maggiore è la presenza relativa di lipidi e in particolar modo di steroli e fosfolipidi (McPherson et al., 1983).

Trigliceridi

I trigliceridi costituiscono la classe più importante e preponderante di lipidi del latte. Essi sono esteri del glicerolo in cui, al posto degli atomi di carbonio dei gruppi carbossilici, sono presenti le catene di tre acidi grassi a media o a lunga catena. La composizione dei trigliceridi è molto importante perché da essa dipendono sia le proprietà tecnologiche del latte sia la digeribilità del grasso.

Fosfolipidi

I fosfolipidi sono presenti in quantità limitata nel latte, ma costituiscono una frazione molto importante nella costituzione della membrana del globulo (Secchiari et al., 2002). Essi sono sintetizzati nella ghiandola mammaria e nel latte sono stati individuati come glicerolfosfatidi e sfingomieline.

I glicerolfosfatidi hanno una struttura simile a quella del grasso propriamente detto ma, a differenza di questo, una delle funzioni del glicerolo è esterificata dall'acido fosforico e questo, a sua volta, è legato ad una base organica azotata (per esempio lecitina e cefalina).

Le sfingomieline, invece, presentano, al posto del glicerolo, un amminoalcol insaturo, la sfingosina. Nel latte la sfingomieline è uno tra i fosfolipidi più rappresentati e sembra avere azione anticancerogena a livello dei tessuti intestinali (Schmelz et al., 1997). Le principali classi di sfingomieline presenti nel latte sono rappresentate oltre che dalla sfingomieline, dalla fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e dal fosfatidilinositolo, e le prime tre sono quelle più rappresentate nella membrana del globulo di grasso (Bitman e Wood, 1990).

Acidi Grassi

Gli acidi grassi sono componenti fondamentali dei lipidi e sono molecole costituite da una catena alifatica, con un solo gruppo carbossilico a

un'estremità. La lunghezza della catena carboniosa riveste un ruolo importante nell'influenzare le caratteristiche fisico-chimiche dell'acido grasso.

Gli acidi grassi possono essere classificati in diversa maniera a seconda dei parametri che vengono presi in considerazione. Tenzialmente si fa una prima distinzione in base alla lunghezza della catena alifatica e quindi in base al numero di atomi di carbonio presenti nel loro scheletro in:

- acidi grassi a catena corta, con un numero di atomi di carbonio compreso tra 4 e 11;
- acidi grassi a media catena, con un numero di atomi di carbonio compreso tra 12 e 15;
- acidi grassi a lunga catena, con 16 o più di atomi di carbonio.

Una seconda classificazione si basa sulla presenza o meno di doppi legami nella catena alifatica. In base a queste caratteristiche gli acidi grassi si distinguono in:

- acidi grassi saturi, quando nella loro struttura chimica non sono presenti doppi legami;
- acidi grassi insaturi quando sono presenti uno o più doppi legami: tra questi si possono distinguere ancora acidi grassi monoinsaturi (MUFA) se è presente un solo doppio legame, e acidi grassi polinsaturi (PUFA) se sono presenti due o più doppi legami.

Tra gli acidi grassi insaturi si annoverano inoltre anche gli acidi grassi essenziali distinti in base alla posizione del doppio legame nel terzo, sesto o nono atomo di carbonio, e che prendono il nome di omega-3 (es. acido linolenico), omega-6 (es. acido linoleico) e omega-9 (es. acido oleico) rispettivamente. A questo gruppo appartengono anche gli acidi grassi coniugati dell'acido linoleico (CLA).

In media il latte ovino contiene il 60% di acidi grassi saturi SFA (il palmitico in quantità maggiore), il 28% di grassi monoinsaturi (MUFA) e il 6% di polinsaturi (PUFA) (Cabiddu et al., 2003, 2005).

I grassi saturi detengono un potere aterogeno, essi infatti tendono ad aumentare la concentrazione plasmatica del colesterolo legato alle lipoproteine a basso peso molecolare (LDL) poiché ne diminuiscono il catabolismo. L'aumento della colesterolemia causa la formazione di placche aterosclerotiche che sono alla base di malattie cardiache e coronariche (Kromhout et al., 2002). Va comunque sottolineata l'importanza di questo sterolo che risulta essere fondamentale per l'organismo umano in quanto precursore di numerosi ormoni, della vitamina D e degli acidi biliari e, costituente fondamentale delle membrane cellulari.

Gli acidi grassi saturi maggiormente incriminati sono il laurico (C12:0), il miristico (C14:0) ed il palmitico (C16:0), mentre altri acidi grassi saturi (butirrico C4:0; fino a caprinico C10:0; stearico C18:0) sono neutrali (Bonanome e Grundy, 1988). Il palmitico, come sopra riportato, è uno degli acidi grassi più presenti nel latte ovino (Tabella 1).

Tabella 1. Composizione acidica del grasso (%) in diverse specie animali. (McGuire et al., 1997; Nudda et al., 2003; Secchiari et al., 2003, modificato).

Acidi grassi		Capra	Pecora	Vacca	Donna
Catena corta					
butirrico	C4	3,00	3,63	3,32	0,4
capronico	C6	2,00	2,36	2,34	0,1
caprilico	C8	3,00	2,95	1,19	0,3
caprinico	C10	9,00	6,66	2,81	0,3
Catena media					
laurico	C12	5,00	3,74	3,39	5,8
miristico	C14	11,00	9,78	11,41	8,6
miristoleico	C14:1	0,12	0,17	1,4	
palmitico	C16	26,00	22,49	29,53	22,6
palmitoleico	C16:1	3,0	2,61	3,38	4,0
Catena lunga					
Stearico	C18	6,00	10,83	9,84	7,7
Oleico	C18:1	20,00	25,19	27,39	36,4
Linoleico	C18:2	3,10	4,17	2,0	8,3
Linolenico	C18:3	1,00	2,62	1,10	0,4
Arachidonico	C20:4	0,32	0,24	0,2	1,0
c9, t11 CLA	C18:2	0,72	1,42	0,58	0,38
t11 18:1 VA	C18:1	1,12	2,30	0,77	-
Rapp. Insaturi/saturi		0,45	0,47	0,55	1,10

Nonostante la preponderante presenza di acidi grassi saturi, il ruolo nutrizionale rivestito dai lipidi del latte è stato parzialmente rivalutato grazie alla naturale presenza in esso di apprezzabili quantitativi di composti biofunzionali. Tra i costituenti presenti nella frazione lipidica dei prodotti lattiero-caseari, per i quali si è evidenziata un'attività benefica per la salute umana figurano i MUFA e CLA.

L'acido oleico (C18:1), rappresenta circa il 15/20% del grasso del latte e determina una riduzione delle malattie cardiovascolari (Hornstra, 1999).

CLA (conjugated linoleic acid) è il termine utilizzato per definire quel gruppo di isomeri dell'acido linoleico (C18:2) che possiede un doppio legame coniugato in diverse posizioni.

La biosintesi dei CLA è strettamente legata ai prodotti della bioidrogenazione ruminale. Il CLA predominante nel latte dei ruminanti è il cis-9, trans-11 CLA, e la maggior parte di esso è di origine endogena. Questo è infatti prodotto a partire dall'acido vaccenico per azione dell'enzima Δ^9 -desaturasi e si stima che più del 70% del cis-9, trans-11 CLA presente nel latte dei ruminanti derivi dalla sintesi mammaria attraverso l'azione dell'enzima SCD (stearoyl-CoA desaturase) (Bauman et al., 2006).

In realtà il sito di sintesi endogena dei CLA sembrerebbe variare a seconda dello stato fisiologico dell'animale e infatti negli animali in fase di accrescimento pare sia riconducibile al tessuto adiposo, mentre negli animali in lattazione il sito d'elezione è rappresentato dalla mammella (Bauman et al., 2001).

Studi condotti sugli effetti dei CLA sull'organismo umano hanno dimostrato che questi composti hanno un'elevata capacità anticancerogena (Singh et al., 1991, Liew et al., 1995), proprietà antiossidanti, effetti antiaterosclerotici (Lee et al., 1994), stimolano il sistema immunitario

(Cook et al., 1993) e riducono la quantità di grasso corporea aumentando invece la massa magra (effetto antilipogenetico) (Park et al., 1997; West et al, 1998).

Metabolismo ruminale

Il successo evolutivo dei ruminanti è dovuto principalmente allo sviluppo di un'attività digestiva che ha permesso loro di utilizzare la gran parte dei polisaccaridi, componenti strutturali dei vegetali. I vertebrati non hanno enzimi che consentano loro di catalizzare l'idrolisi dei legami β , 1-4 glicosidici che legano le molecole del glucosio a formare i polisaccaridi composti. Al contrario protozoi, funghi e alcuni batteri possiedono gli enzimi idonei per la scissione della cellulosa e di altri polisaccaridi. Tale processo è reso possibile negli erbivori dalla presenza di strutture anatomiche, i prestomaci, dove questi microrganismi vivono in simbiosi.

Lo stomaco dei ruminanti, dal punto di vista anatomico, si suddivide in quattro compartimenti specializzati (rumine, reticolo, omaso e abomaso), ognuno dei quali possiede una funzione diversa nel processo digestivo.

In generale si può attribuire ai primi tre compartimenti un'attività meccanica e fermentativa, quest'ultima operata da microrganismi, che costituiscono un complesso ecosistema. L'abomaso possiede invece un'attività secernente ed è in esso che avviene la vera e propria digestione enzimatica. I prodotti finali della fermentazione microbica sono gli acidi grassi volatili, che vengono utilizzati dai ruminanti, previo assorbimento, come principali substrati metabolici.

Nel processo digestivo riveste un ruolo importante la masticazione che, attraverso una ripartizione fisica dell'alimento, fraziona grosse particelle di cibo ingerito in parti più piccole. Inoltre la continua salivazione

e l'assorbimento di acidi grassi volatili prodotti durante la fermentazione, garantiscono una condizione di pH ottimale per la fermentazione microbica dei carboidrati.

La fermentazione microbica dei carboidrati viene completata solo nel grosso intestino (Huhtanen e Sveinbjörnsson, 2006).

I microrganismi ruminali consistono in una popolazione mista e interdipendente di batteri, funghi e protozoi.

I batteri si distinguono, in base al tipo di alimento e alle sostanze che degradano, in primari e secondari. Al primo gruppo si ascrivono i batteri cellulolitici e amilolitici, mentre al secondo gruppo appartengono quei batteri che utilizzano, come substrato, i prodotti finali della degradazione batterica primaria. ovvero il lattato per produrre parte del propionato utilizzato dai propiono-batteri e l'idrogeno per produrre il metano utilizzato dai batteri-metanogeni.

Metabolismo glucidico ruminale

Il ruminante introduce con la dieta sostanze di vario tipo come: zuccheri semplici (fruttosio, glucosio, galattosio e pentosi vari); disaccaridi (saccarosio, maltosio e cellobiosio); polisaccaridi come amidi (polimeri del maltosio) e cellulose (polimeri del cellobiosio); sostanze peptiche (polimeri di acidi uronici); emicellulose (polimeri insolubili di vari zuccheri) e lignina.

A livello ruminale il processo di fermentazione consta di diversi stadi, il primo dei quali è caratterizzato dall'idrolisi dei polisaccaridi che vengono demoliti fino alla formazione di zuccheri semplici. Per quanto riguarda la cellulosa i legami β -glucosidici vengono scissi portando alla formazione di cellulodestrine prima, di cellobiosio poi ed infine di due molecole di glucosio. I monosaccaridi così ottenuti vengono assunti dai microorganismi e convertiti in fruttosio-1,6-difosfato (questo spiega la totale assenza di glucosio nel rumine). Il secondo stadio è la via di Embden-Meyerhof per l'ossidazione anaerobica del fruttosio-1,6-difosfato in piruvato, attraverso il fosfoenolpiruvato. Il piruvato è un intermedio obbligato per la formazione degli acidi grassi volatili, seppure siano necessarie strade differenti per la loro sintesi.

Il terzo stadio comprende le reazioni che portano ai prodotti metabolici finali della fermentazione, dove intervengono anche i batteri metanogenici, i quali richiedono formiato, CO_2 e unità riducenti (2H) per produrre il metano ed una scorta di aminoacidi per soddisfare le loro richieste proteiche.

La degradazione dell'amilosio, dell'amilopectina (legami α -1) e degli zuccheri semplici (per esempio saccarosio e maltosio) avviene per opera di batteri amilolitici. Questi sono caratterizzati da fermentazioni più rapide rispetto a quelle attuate dai batteri cellulolitici, inoltre necessitano non solo di NH_3 , per la sintesi delle proteine, ma anche di alcuni aminoacidi.

I batteri proteolitici rappresentano il 12-38% dei batteri ruminanti totali ed è nella norma che solo la metà delle proteine totali venga scissa all'interno del ruminante.

I protozoi sono rigorosamente anaerobi e perciò le principali vie di fermentazione sono costituite dall'idrolisi e dall'ossidazione anaerobica, che implicano principalmente la rimozione di idrogeno piuttosto che l'aggiunta di ossigeno. Pertanto l'ambiente ruminale necessita di una grande varietà di reazioni di riduzione per riossidare i coenzimi ridotti, come $\text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NADP}^+ + 2 [\text{H}]$; solo in circostanze eccezionali l'idrogeno viene liberato in forma gassosa (Allison, 2002).

I funghi contribuiscono all'attività cellulolitica dei batteri. Infatti le spore, invadendo i tessuti vegetali lesi e gli stomi, producono rizoidi per germinazione che, con l'attività dei loro enzimi proteolitici, sono in grado di penetrare il tessuto vegetale dando accesso a carboidrati fermentescibili non immediatamente disponibili per i batteri.

In questo modo la popolazione di batteri cellulolitici e metanogenici porta alla produzione di CO_2 e CH_4 , di acidi grassi volatili (acetico, propionico e butirrico) e in minore percentuale di altri acidi grassi come l'acido isobutirrico, valerianico, piruvico e lattico.

La formazione di metano e la conversione dell'acido lattico e degli altri acidi metabolici in propionato richiede lo sviluppo di batteri secondari.

Una volta che i microorganismi vengono trasferiti nell'abomaso, le loro proteine, i lipidi, le vitamine e le piccole quantità di amido

immagazzinato sono digeriti e diventano biodisponibili in conseguenza della digestione gastrointestinale.

Gli acidi grassi volatili in genere sono in un rapporto di 70:15:10 rispettivamente per acetato, propionato e butirato.

Metabolismo ruminale delle proteine

Il rumine non produce direttamente delle proteasi per la digestione delle proteine ma ne può disporre grazie alla presenza della microflora che lo popola. La proteolisi batterica avviene mediante l'attività di proteasi extracellulari e porta alla formazione di peptidi che vengono fagocitati e successivamente idrolizzati all'interno della cellula. Ne derivano così i prodotti finali che sono gli aminoacidi, parte dei quali è utilizzata da altri microorganismi per produrre ammoniaca e catene carboniose; queste a loro volta vengono fermentate ad acidi grassi volatili (AGV) a catena ramificata, derivati dagli aminoacidi leucina, isoleucina e valina.

L'ammoniaca prodotta nel rumine non deriva soltanto dalla deaminazione degli aminoacidi, ma anche dalla conversione dei prodotti azotati non proteici di origine alimentare ed endogena. Tali composti azotati non proteici includono amidi vegetali, nitriti e nitrati ed urea endogena.

Nel rumine l'urea viene convertita in ammonio; l'ammoniaca è un'importante substrato per la sintesi delle proteine .

Il regime alimentare dei ruminanti deve garantire una sufficiente quantità di proteina grezza (proteina vera e azoto non proteico) e di carboidrati prontamente fermentabili, in modo tale da assicurare ai microorganismi ruminali le adeguate quantità di aminoacidi, ammoniaca e scheletri carboniosi per la sintesi delle proteine microbiche. Le proteine alimentari e l'azoto non proteico sono sintetizzati in proteine microbiche ad alto valore biologico.

Un'alimentazione troppo ricca in proteine o in urea può portare ad un'elevata produzione di ammoniaca intraruminale che, rappresentando una condizione di potenziale tossicità sia per il rumine che per i microorganismi, determina il blocco della fermentazione (Leek, 2002).

Metabolismo lipidico ruminale

I lipidi introdotti con la dieta vanno incontro, nel rumine, a processi di lipolisi e bioidrogenazione ad opera della microflora ruminale (Palmquist e Jenkins, 1980; Jenkins, 1993).

La dieta dei ruminanti contiene generalmente tra i 20 e 40 g/Kg S.S. di lipidi. I grassi alimentari sono costituiti principalmente da trigliceridi e nel rumine subiscono inizialmente un'idrolisi dei legami esteri che li trasforma in acidi grassi liberi e glicerolo. I batteri coinvolti in questo processo sono *Anaerobio lipolytica* e *Butyrivibrio fibrisolvens* (Hespell e O'Bryan-Shah, 1988). Il primo microorganismo produce un'esterasi e una

lipasi (Jenkins, 1993), che idrolizzano i trigliceridi; il secondo idrolizza i fosfolipidi e i glicolipidi (Harfoot e Hazlewood, 1997). Il livello di idrolisi è solitamente alto (>85%) anche se molti fattori possono influenzarlo (Harfoot, 1981; Doreau e Chilliard, 1997); ad esempio si riduce quando è presente un basso pH ruminale o si somministrano ionofori che inibiscono la crescita e l'attività dei batteri (Van Nevel e Demeyer, 1995; Demeyer e Doreau, 1999).

La bioidrogenazione ruminale dei lipidi

I ruminanti introducono con la dieta alti quantitativi di acidi grassi insaturi, nonostante ciò nei loro prodotti (carne e latte) si riscontrano considerevoli concentrazioni di quelli saturi, per effetto dell'idrogenazione operata dal rumine sui grassi (Figura 2).

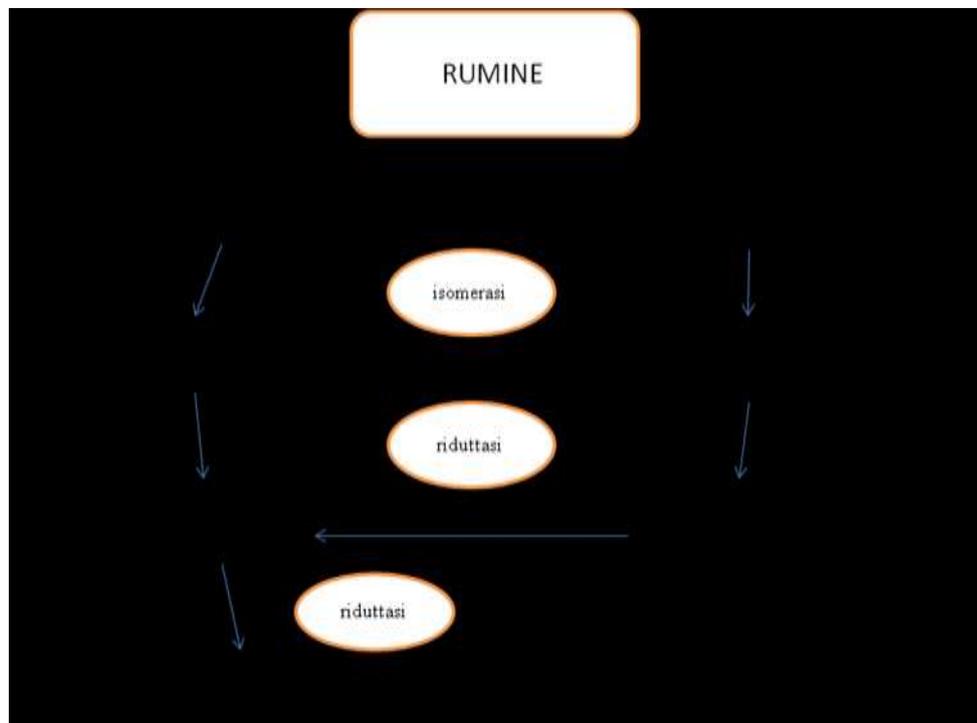
Attraverso il processo della bioidrogenazione gli acidi grassi insaturi, resi liberi dalla lipolisi, vengono trasformati in strutture sature dai microrganismi ruminanti. Sono state identificate due popolazioni batteriche responsabili di queste reazioni (Kemp e Lander 1984): la prima è responsabile della saturazione degli acidi linoleico e α e γ linolenico ad acido vaccenico, la seconda termina il processo di idrogenazione riducendo l'acido vaccenico ad acido stearico (Harfoot e Hazlewood, 1988). Il primo passaggio è catalizzato dall'enzima linoleico isomerasi e porta all'isomerizzazione del doppio legame in posizione cis-12 dell'acido

linoleico (cis-9, cis-12 C18:2), ad acido rumenico (RA; cis- 9, trans-11 C18:2) (Figura 1).

L'enzima linoleico isomerasi è legato alla membrana batterica ed è molto selettivo in quanto individua solo dieni con una stechiometria del tipo cis-9, cis-12 di acidi grassi aventi la funzione carbossilica libera. Il secondo passaggio, che avviene con una cinetica di reazione veloce, è l'idrogenazione del doppio legame cis del diene coniugato che porta alla formazione di acido vaccenico (trans-11 C18:1) (Figura 1). In questa fase è possibile che molecole di acidi grassi insaturi diventino parte integrante della parete del microrganismo, in quanto l'enzima è adeso alla parete cellulare batterica (Mariani e Podestà, 1996).

Lo step finale è l'idrogenazione dell'acido vaccenico ad acido stearico (C18:0). In questo caso la cinetica di reazione è lenta; ciò permette all'acido vaccenico di sfuggire in piccole parti al processo di bioidrogenazione ed essere desaturato dalla mammella ad acido rumenico. L'acido vaccenico raffigura quindi un intermedio comune nella bioidrogenazione dell'acido linoleico e degli acidi α e γ linolenico (Grinari e Bauman, 1999).

Figura 1. Idrogenazione nel rumine degli acidi grassi a catena lunga.
(Harfoot e Hazlewood, 1997, modificato).



Inoltre i doppi legami degli acidi α -linolenico (cis-9, cis-12, cis-15 C18:3) e γ -linolenico (cis-6, cis-9, cis-12 C18:3) sono soggetti nel rumine ad una iniziale isomerizzazione da cui originano trieni coniugati, come l'acido octadecatrenoico coniugato c9,t11,c15 che con successiva idrogenazione è ridotto ad acido vaccenico e in seguito ad acido stearico (C18:0).

Cambiamenti a carico della popolazione batterica ruminale possono far variare il normale processo di bioidrogenazione. Ad esempio una riduzione del pH ruminale induce variazioni nella popolazione batterica e, modifica i prodotti finali della fermentazione (Van Soest, 1994).

Griinari et al., (1998) hanno mostrato come i cambiamenti dell'ambiente ruminale, dovuti alla somministrazione di diete caratterizzate da un basso rapporto foraggi/concentrati, siano correlate a variazioni del contenuto in acido vaccenico nel succo ruminale e, di conseguenza nel latte. In questa situazione il C18:1 trans-10 sostituisce il C18:1 trans-11 diventando l'isomero più abbondante nel grasso del latte.

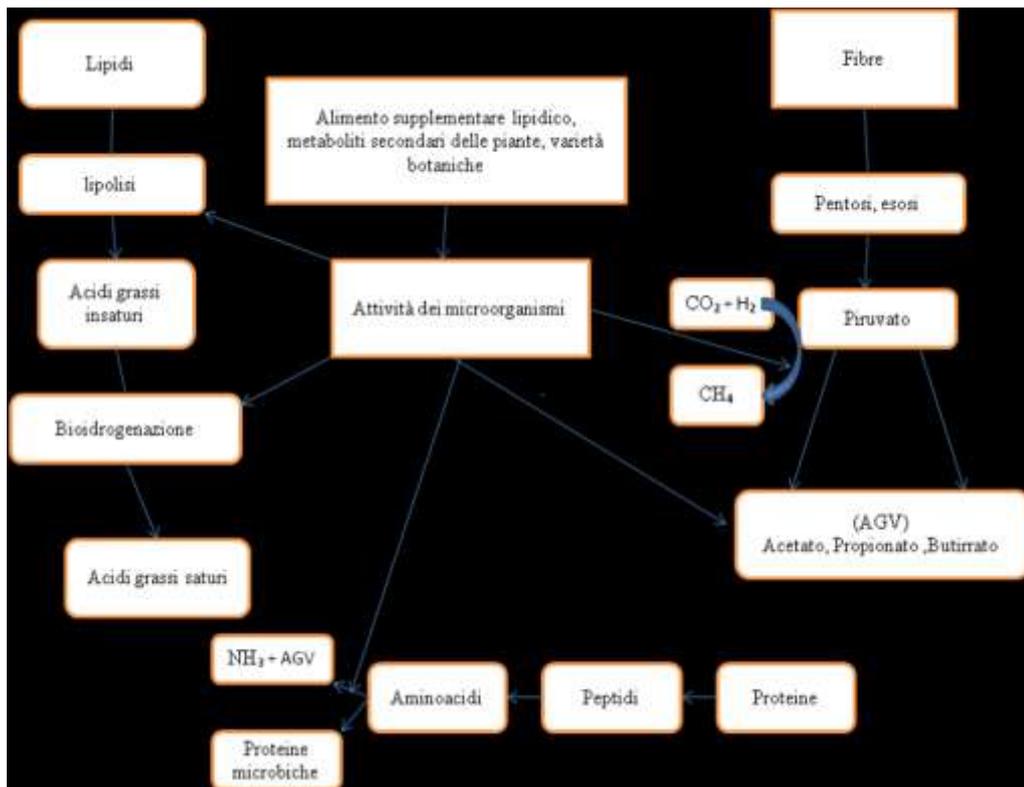
Sono state proposte diverse ipotesi sui meccanismi che portano alla produzione del C18:1 trans-10 (Bauman e Griinari, 2001; 2003). La più plausibile di queste prevede l'azione di una specifica cis-9, trans-10 isomerasi batterica che porterebbe alla formazione dei doppi legami coniugati trans-10, cis-12 come primo intermedio della conversione dell'acido linoleico. Quest'ipotesi è confermata dal fatto che la somministrazione di diete a basso contenuto di fibra induce un aumento della concentrazione di trans-10, cis-12 CLA nel latte. Nel passaggio successivo la riduzione del legame in posizione 12 porta alla formazione del trans-10 C18:1 (Griinari, 2001).

Il trans-10, cis-12 CLA sembra essere di esclusiva sintesi ruminale poiché non è stata dimostrata l'esistenza di una $\Delta 12$ desaturasi nella ghiandola mammaria. Mosley et al., (2007) e Loores e Herbein, (2002) hanno dimostrato, con studi in vitro e in vivo, che anche l'acido oleico durante la bioidrogenazione ad acido stearico porta alla formazione di diversi isomeri trans del C18:1, incluso il trans vaccenico. Ciò suggerirebbe che l'impiego nell'alimentazione dei ruminanti di oli di semi ricchi di acido oleico, quali

quelli di arachide, colza, palma e girasole potrebbe far aumentare il contenuto di CLA nel latte.

Figura 2. Digestione ruminale dei diversi costituenti della dieta.

(Lourenço et al., 2010, modificato).



Acidi grassi volatili.

Gli acidi grassi volatili (AGV) costituiscono la più importante fonte di energia per i ruminanti, fornendo circa il 60-80% dell'energia digeribile assunta con gli alimenti (Figura 2). Una parte di questi viene direttamente

metabolizzata, durante l'assorbimento, dalle cellule della mucosa ruminale a scopi trofici per lo stesso epitelio (Piccione, 2009).

Gli acidi acetico, propionico e butirrico, sono i prodotti principali dell'attività fermentativa del rumine. La fermentazione delle proteine porta alla formazione di questi acidi, dell'acido valerico a 5 atomi di carbonio (pentanoico) e degli acidi grassi ramificati (isoacidi): acidi butirrico e isovalerico.

Nei prestomaci gli AGV vengono prodotti e sono assorbiti attraverso la parete. Gli AGV sono acidi deboli (pK di 4,6); il livello del loro assorbimento aumenta quando il pH ruminale è basso, così che è presente una maggiore quantità di composto in forma indissociata, e quando la lunghezza della catena aumenta.

Circa la metà degli acidi grassi volatili viene assorbita per diffusione passiva in forma indissociata mentre la restante parte è assorbita mediante diffusione facilitata, con scambio di ioni bicarbonato, sotto forma di anioni.

Gli ioni bicarbonato vengono ceduti grazie all'attività dell'anidrasi carbonica, presente nelle cellule dello strato granuloso dell'epitelio prestomacale, che promuove la formazione di acido carbonico, il quale a sua volta si dissocia appunto in ioni bicarbonato e ioni idrogeno.

Gli ioni idrogeno si associano con gli anioni degli acidi grassi volatili per formare acidi grassi volatili indissociati, che diffondono più facilmente attraverso l'epitelio, e lasciano gli ioni bicarbonato liberi nel liquido ruminale. Questo meccanismo ha una duplice funzione: facilitare

l'assorbimento degli acidi grassi volatili e abbassare il pH ruminale attraverso lo scambio di anioni di acidi più forti (AGV) con quelli di un acido più debole (acido carbonico). Quindi, una parte degli AGV prodotti dal rumine è neutralizzata in questo modo; l'altra parte viene neutralizzata attraverso gli alcali salivari.

Negli ovini e subordinatamente nei bovini la maggior parte dell'acido butirrico viene ossidato, nelle pareti prestomacali, nel suo corrispondente corpo chetonico il β -idrossibutirrato (β -OH Bu), mentre il rimanente acido butirrico viene metabolizzato nel fegato.

Nel sangue portale dei ruminanti si riscontra una minore quantità di acido butirrico rispetto a quella esistente nel rumine; questo è spiegato dal fatto che l'acido butirrico viene metabolizzato attivamente dall'epitelio del rumine, che lo utilizza come substrato energetico, dando luogo ai corpi chetonici, rappresentati per l'80% da acido β -idrossibutirrico e in minor misura da acido acetacetico e acetone. La concentrazione dei corpi chetonici nel sangue venoso refluo dal rumine è molto più alta rispetto a quella del sangue arterioso, e questo a riprova della trasformazione operata sull'acido butirrico dell'epitelio ruminale (Piccione, 2009).

Si può dire quindi che l'acido butirrico assorbito si trova in circolo quasi interamente sottoforma di β -idrossibutirrato.

Il β -idrossibutirrato è prontamente metabolizzato dalla maggior parte dei tessuti e utilizzato nella ghiandola mammaria per sintetizzare circa la

metà degli acidi grassi a corta e media catena (C4-C15), caratteristica questa del latte dei ruminanti.

Il 30% circa del propionato viene metabolizzato dalla parete dei prestomaci per formare acido lattico che si trova poi in circolo nel sangue portale. Nel sangue periferico lo si trova invece in bassissime concentrazioni e non può essere utilizzato per esempio per la sintesi degli acidi grassi del latte.

Il lattato ematico e il propionato non metabolizzato sono captati quasi interamente dal fegato. Qui il propionato viene convertito in ossalacetato e utilizzato nel ciclo di Krebs (ciclo degli acidi tricarbossilici) insieme all'acido acetico, oppure viene trasformato in glucosio insieme al lattato. Il glucosio così formato può quindi essere immesso nel circolo oppure depositato nel fegato sotto forma di glicogeno; infatti il propionato è l'unico acido grasso volatile che può essere utilizzato per la gluconeogenesi.

L'acido acetico è l'AGV più abbondante nel sangue periferico e, una volta attivato ad Acetil CoA, entra nel ciclo dell'acido citrico, dove viene ossidato ad CO_2 e H_2O (11 moli di ATP per ogni mole di ac. acetico) ed utilizzato così dalla maggior parte dei tessuti come substrato energetico.

Una piccola quantità di acetato viene metabolizzato a CO_2 dalle pareti prestomacali, per il resto esso rappresenta un precursore degli acidi grassi a lunga catena nel processo lipogenetico del colesterolo e quindi di tutti gli ormoni steroidei delle surrenali e delle gonadi. Nella ghiandola mammaria viene utilizzato come precursore degli acidi grassi del latte.

Altri prodotti finali della fermentazione ruminale sono rappresentati dall'acido lattico, dai gas e dall'ammoniaca.

L'acido lattico in entrambe le forme isomeriche è presente come composto intermedio e transitorio, viene assorbito solo per un 10% dalla parete prestomacale e successivamente metabolizzato nel fegato a piruvato (passando a glucosio e glicogeno).

I tre acidi grassi volatili, nonostante abbiano origine da tre diversi processi metabolici, partono dalla sintesi del fruttosio 6-fosfato e poi del piruvato. Da quest'ultimo si ottiene l'acetato attraverso la via del Metil-malonil CoA e il butirrato dalla via dell'Acetil CoA. Sia l'acetato che il butirrato sono i precursori degli acidi grassi a media e corta catena nel latte e nel tessuto adiposo (Chilliard et al., 2000).

Metabolismo mammario dei lipidi

L'inizio e il mantenimento della lattazione sono dei fenomeni piuttosto complessi, in quanto coinvolgono importanti cambiamenti a livello cellulare e dell'attività enzimatica nella ghiandola mammaria.

La ghiandola mammaria dei ruminanti ha una notevole capacità di convertire nutrienti captati dal circolo ematico in costituenti del latte. Quest'ultimo è riconosciuto come una importante fonte di nutrimento per l'uomo, essendo ricco di proteine di alta qualità, vitamine essenziali e sali minerali. Il grasso è il costituente che fornisce la maggior parte dell'energia del latte, inteso come alimento, ed è responsabile di molte delle sue proprietà sensoriali, fisiche e tecnologiche (Palmquist et al., 1993; Chilliard and Ferlay, 2004).

Il latte bovino, caprino e ovino contiene in genere una quantità di grasso compreso tra i 30 g/kg ed i 110 g/kg, tale quantità può variare in funzione della dieta, della fase di lattazione e del genotipo dell'animale (Chilliard et al, 2003;. Givens e Shingfield, 2006, Pulina et al. 2006).

La frazione lipidica del latte dei ruminanti si ritrova come emulsione sotto forma di globuli sferici. Questi globuli sono composti per il 96-98% da trigliceridi e la quota rimanente è costituita da digliceridi, monogliceridi, acidi grassi liberi ed esteri del retinolo (Jensen, 2002). I trigliceridi del latte sono composti da più di 400 acidi grassi ma principalmente si riscontrano quelli saturi con una catena compresa tra 4 e 18 atomi di carbonio e quelli monoinsaturi e polinsaturi da 16 a 18 atomi di carbonio. Gli acidi grassi

incorporati nei trigliceridi derivano da due differenti processi: per assorbimento degli acidi grassi preformati provenienti dal circolo ematico e per sintesi ex novo dalla mammella. In generale nei ruminanti il primo processo contribuisce per circa il 60% alla formazione dei grassi nel latte mentre il secondo per circa il 40% (Shingfield et al., 2010).

Le cellule epiteliali mammarie sintetizzano gli acidi grassi a corta e media catena a partire dall'acetato e dal butirrato prodotto dal rumine. Tutti gli acidi grassi da 4 a 12 atomi di carbonio, il 95% di quelli a 14 atomi di carbonio e il 50% degli acidi a 16 atomi di carbonio, sono di nuova sintesi; la totalità degli acidi grassi a 18 atomi di carbonio e quelli a catena più lunga invece derivano interamente dai lipidi plasmatici (Chilliard et al., 2000).

Per la sintesi dei lipidi del latte il requisito essenziale è la presenza di due enzimi chiave: l'acetil CoA Carbossilasi e una sintasi degli acidi grassi (FAS) coadiuvati dall'attività riducente dell'NADPH (Barber et al., 1997).

Considerando gli acidi grassi volatili come unità di partenza nella formazione degli acidi grassi di nuova sintesi si può dire che sia il 3-idrossi-butirrato che l'acetato contribuiscono in egual misura alla formazione dell'unità di partenza a 4 atomi di carbonio. L'acetato viene convertito in acetil CoA nel citosol e utilizzato per estendere la catena degli acidi grassi attraverso la via malonil-CoA, mentre il 3-idrossi-butirrato è incorporato direttamente dopo l'attivazione in butirril CoA (Figura 3). La conversione dell'acetato in malonil-CoA è catalizzata da Acetil-CoA-carbossilasi e

questa è considerata la tappa limitante del processo di formazione degli acidi grassi (Bauman e Davis, 1974).

Studi effettuati in vitro hanno dimostrato che gli acidi grassi a lunga catena con 16 o più atomi di carbonio inibiscono la sintesi dei lipidi a livello mammario. Tale risultato sembra essere più evidente in esperimenti in vitro che prevedono l'incubazione delle cellule mammarie con acidi grassi a più lunga catena e/o con un alto grado di insaturazione (Barber et al., 1997).

La somministrazione by pass di acidi grassi a lunga catena porta ad una inibizione dell'Acetil -CoA-Carbossilasi, in quanto la mammella trova substrati già pronti per la formazione dei lipidi del latte, con una conseguente diminuzione della sintesi degli acidi grassi da 8 a 14 atomi di carbonio (Chilliard et al., 2000).

La sintesi di acidi grassi con catene alifatiche da 16 a più atomi di carbonio avviene attraverso l'assorbimento dal circolo ematico degli acidi grassi non esterificati (NEFA) legati alle albumine plasmatiche, oppure da quelli contenuti nei chilomicroni e nelle lipoproteine a densità molto bassa (VLDL), il cui assorbimento è sotto il controllo dell'enzima lipoproteinlipasi (LPL) (Figura 3).

Le VLDL e i chilomicroni vengono ancorati alla parete della cellula mammaria dalla LPL che agisce sui trigliceridi contenuti nelle lipoproteine per liberare NEFA. Per l'azione del LPL è fondamentale la presenza del recettore per le VLDL, infatti la presenza di quest'ultimo è molto

abbondante per tutta la lattazione e, in particolar modo, nel primo mese dopo il parto nei bovini (Tacken et al., 2001; Bionaz e Loor, 2008b).

Diversi studi effettuati con colture cellulari di mammiferi, proteine transgeniche trasportatrici di acidi grassi o con topi knock-out, hanno permesso di individuare una serie di proteine coinvolte nella captazione di acidi grassi a catena lunga come: proteine leganti acil-CoA (ACBP), proteine leganti acidi grassi (FABP), proteine di trasporto degli acidi grassi (FATP), traslocasi degli acidi grassi (FAT/CD36), acil-CoA sintetasi a lunga catena (ACSL) (Doege e Stahl, 2006).

FABP e ACBP sono i principali trasportatori intracellulari degli acidi grassi nelle cellule dei non ruminanti e consentono la destinazione selettiva degli acidi grassi a catena lunga per il metabolismo dei diversi organelli cellulari (Doege e Stahl, 2006). Gli acidi grassi a catena lunga, prima di entrare nelle vie metaboliche intracellulari, vengono attivati dall'enzima ACSL come esteri del CoA, con un meccanismo ATP dipendente, nella superficie interna della membrana plasmatica (Watkins et al., 2007). Nelle bovine in lattazione è stato evidenziato che diverse isoforme di ACSL (ACSL 1, 3, 4 e 5) e di FABP (FABP 1, 3, 4, 5 e 6) vengono trascritte nel tessuto mammario (Bionaz e Loor, 2008a), e che l'espressione di ACSL1, FABP3, FABP4 e FABP5 aumenta di molte volte durante la lattazione, mentre l'espressione ACBP risulta molto più bassa. Questo suggerisce che tale proteina assume un ruolo minore nella lipogenesi mammaria del bovino (Bionaz e Loor 2008b).

La diffusione passiva svolge un ruolo minore nel trasporto degli acidi grassi attraverso le membrane cellulari della cellula mammaria rispetto all'assorbimento proteina-mediato (Doege e Stahl, 2006). Anche se i meccanismi responsabili per il trasporto degli acidi grassi attraverso l'endotelio capillare e lo spazio interstiziale non sono ben conosciuti (Barber et al., 1997; Bernard et al., 2008), è stato suggerito come SLC27A6, ACSL1 e FABP3 siano coinvolte nella regolazione coordinata e incanalino verso la ghiandola mammaria bovina gli acidi grassi per la sintesi dei TAG del latte (Bionaz e Loo, 2008a). Gli acidi grassi a catena lunga che entrano nella cellula mammaria possono essere desaturati ma non ci sono prove che gli acidi grassi preformati subiscano l'allungamento della catena (Chilliard et al., 2000).

Le cellule epiteliali della mammella contengono l'enzima stearoil-CoA desaturasi (SCD), spesso indicato come Δ -9 desaturasi, un enzima che catalizza l'ossidazione degli esteri degli acidi grassi con l'introduzione di un doppio legame in posizione cis tra atomi di carbonio 9 e 10. SCD con l'ausilio del NADH, la flavoproteina b5 reduttasi, l'elettone accettore del citocromo b5 e l'ossigeno molecolare, introduce un unico doppio legame nella catena dell'acido grasso, sia di nuova sintesi che derivante dalla dieta (Palmquist et al., 2005). L'attività di SCD, attraverso la produzione di lipidi a basso grado di fusione come l'acido oleico (OA), è importante anche per mantenere la fluidità del latte e l'efficiente eiezione dello stesso. (Timmen e Patton, 1988). Oltre alla lunghezza della catena, al grado di insaturazione e

alla presenza di doppi legami cis o trans, perché i globuli del latte mantengano la loro fluidità, è necessario che gli acidi grassi vengano esterificati in posizioni tali da garantire loro un punto di fusione uguale o inferiore ai 39°C (Timmen e Patton, 1988).

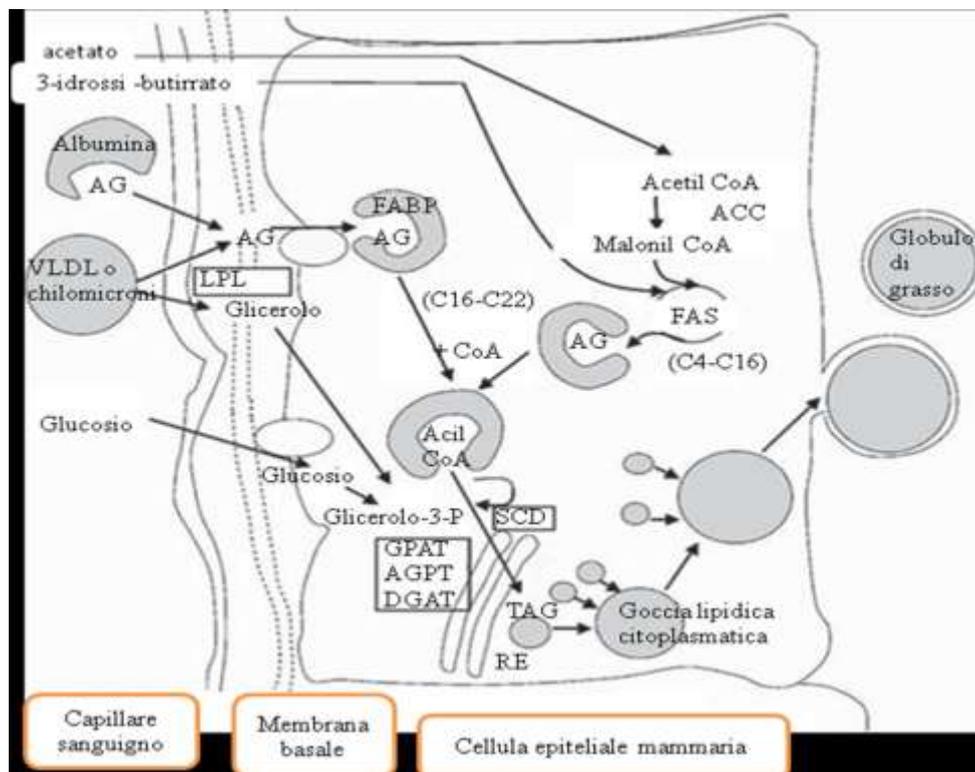
Stearoil e palmitoil-CoA sono i substrati con 18 atomi di carbonio preferiti da SCD per la produzione di acido oleico il quale è il precursore predominante o il prodotto maggiormente formato (Palmquist et al., 2005; Bernard et al., 2008). Circa il 50% degli acidi grassi saturi con 18 atomi di carbonio presenti nella ghiandola mammaria è desaturato, il che risulta essere circa il 50% dell'acido oleico presente nel grasso del latte (Enjalbert et al., 1998; Mosley e McGuire, 2007; Glasser et al., 2008b.). L'attività di SCD contribuisce per circa il 90% alla formazione di cis-9 14:1 e per una frazione compresa tra il 50% e il 56% alla formazione di cis-9 16:1 nel grasso del latte bovino (Mosley e McGuire, 2007). Per la formazione di acidi grassi insaturi SCD si serve anche di un altro discreto numero di acidi grassi saturi come substrati (10:0, 12:0, 14:0, 15:0 e 17:0) (Bauman e Davis, 1974; Shingfield et al., 2008). La sintesi endogena di cis-9, trans-11 CLA (dal 64% al 97%) è ottenuta attraverso l'azione di SCD sul trans-11 18:1 e questa variabilità è correlabile al diverso tipo di alimentazione (Palmquist et al., 2005; Shingfield e Griinari, 2007; Glasser et al., 2008b).

La sintesi ex novo di acidi grassi nella mammella, l'assorbimento di acidi grassi a lunga catena e la formazione dei prodotti di SCD costituiscono

il pool di acidi grassi che servono alla formazione dei TAG che compongono i globuli di grasso del latte (Figura 3).

L'esterificazione degli acidi grassi a glicerolo procede attraverso la via del glicerolo-3-fosfato. La sintesi dei TAG nella cellula epiteliale mammaria è avviata dall'acilazione in posizione sn-1 catalizzata dalla glicerolo-3 fosfato acil-transferasi (GPAT, EC 2.3.1.51). L'esterificazione degli acidi grassi in posizione sn-2 è catalizzata da 1 acilglicerol -3-fosfato acil transferasi (AGPAT, EC 2.3.1.51), mentre la diacilglicerolo aciltransferasi 1 (DGAT1, EC 2.3.1.20) catalizza il trasferimento di una porzione acile da acil-CoA a sn-1, 2 diacilglicerolo come fase finale nella sintesi di TAG. Nel tessuto mammario bovino sono espresse otto isoforme di AGPAT di cui AGPAT6, AGPAT1 e AGPAT3 sono le più abbondanti, con una quota pari rispettivamente al 60%, 18% e 10% dell'mRNA totale espresso (Bionaz e Loor, 2008a). L'espressione della AGPAT6 è la più abbondante durante la lattazione ed è aumentata di circa 15 volte nel tessuto mammario di bovine al 60° giorno di lattazione rispetto al giorno 15 pre partum (Bionaz e Loor, 2008a).

Figura 3. Sintesi dei grassi del latte nella ghiandola mammaria (Shingfield et al., 2010, modificato).



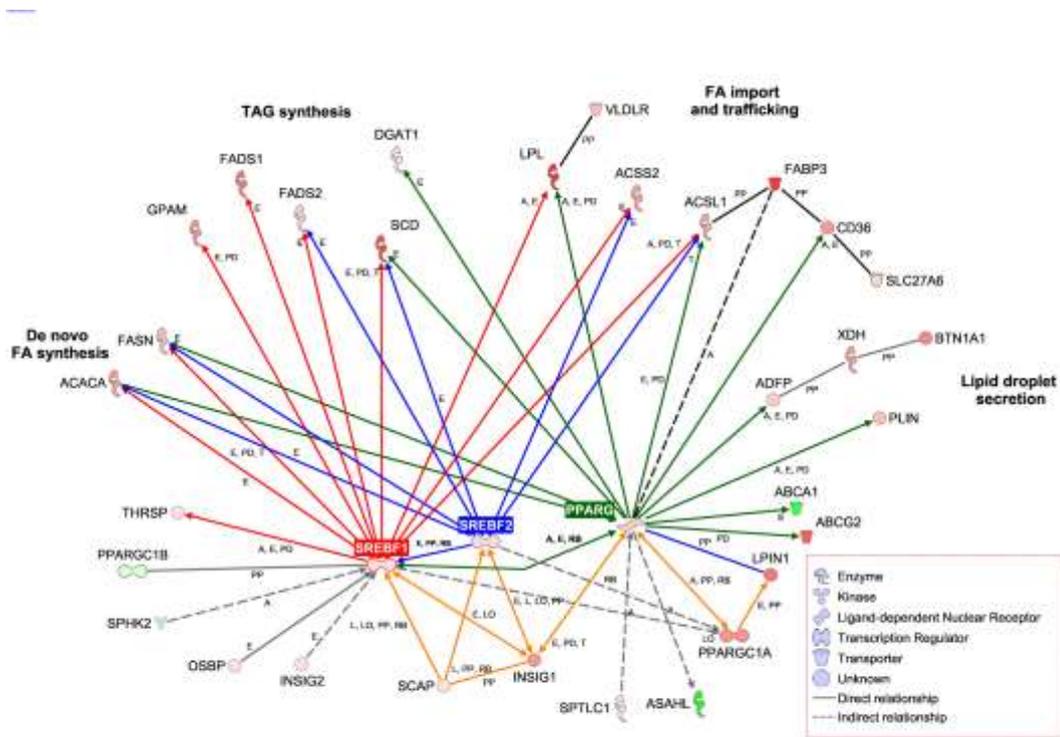
Nonostante l'aggiunta sequenziale alla struttura del glicerolo, gli acidi grassi non sono distribuiti in modo casuale durante la sintesi dei trigliceridi. Infatti gli acidi grassi saturi a media e lunga catena (da 10:0 a 18:0) rappresentano una quota compresa tra il 56% e il 62% di quelli esterificati a sn-1 e sn-2, mentre 18:0 è esterificato preferibilmente a sn-1 e 8:0, 10:0, 14:0 a sn-2 (Jensen, 2002). Una elevata quantità di acidi grassi a corta catena (circa il 44%) e l'acido oleico (27%) sono collocati in posizione sn-3 nei TAG del grasso del latte. L'esterificazione degli acidi grassi con un punto di fusione relativamente basso a sn-3 è importante per la regolazione e il mantenimento della fluidità del grasso nel latte (Hawke e Taylor, 1995).

Geni e secrezione dei grassi nel latte

La somministrazione di diete con alti contenuti di grassi nei ruminanti può influenzare moderatamente il contenuto di grasso nel latte, in quanto la mammella ne regola la sintesi. Questo discorso è valido anche per quanto riguarda gli acidi grassi mono e polinsaturi. Infatti se da una parte la somministrazione di piccole quantità di acidi grassi protetti dalla degradazione ruminale consente di aumentare sensibilmente la presenza di questi nel latte, dall'altra parte elevate quantità nella dieta nei ruminanti causa la depressione della produzione del grasso totale del latte (Bauman et al., 2011). Pertanto è opinione comune che il miglioramento del contenuto di acidi grassi nel latte possa essere effettuato solamente attraverso la conoscenza perfetta del metabolismo mammario dei lipidi e dei geni coinvolti in tale sintesi.

Il processo di secrezione dei grassi mammari è piuttosto complesso e coinvolge un numero notevole di geni che agiscono a diversi livelli nel processo di sintesi mammaria del latte. Possiamo distinguere sommariamente tre gruppi di geni in base all'azione principale che questi svolgono durante il processo di formazione dei grassi del latte (Figura 4).

Figura 4. Geni coinvolti nella secrezione mammaria dei lipidi e loro relazioni. La figura mostra che i geni SREBPs svolgono un importante ruolo nel controllo degli acidi grassi mammari. (Bionaz e Loor, 2008).



Il primo gruppo comprende geni che modulano l'espressione dei fattori di trascrizione come SCAP, INSIG-1, PPARGC1A, PPARG, LPIN1. Al secondo gruppo appartengono quelli che assolvono una funzione molto importante che è quella della regolazione della trascrizione, tra cui SREBPs e PPARG. Al terzo gruppo appartengono la maggior parte dei geni le cui funzioni sono quelle di regolare la sintesi dei grassi saturi e insaturi, trasportare i lipidi dal circolo ematico alla mammella e sovrintendere alla

formazione del globulo di grasso; tra questi citiamo i più importanti: ACACA, FASN, FADS1 e 2, SCD, LPL, ACSS1, DGAT1.

Da quanto sopra riportato si evidenzia come un ruolo centrale venga svolto da SREBPs nel controllare la trascrizione della maggior parte dei geni che coordinano e regolano la sintesi degli acidi grassi del latte. L'espressione e la trascrizione di SREBPs sono sotto il controllo di altri due geni PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) e INSIG-1 (Insulin-induced gene 1) e dunque tutti e tre i geni svolgono un ruolo centrale nella secrezione dei grassi mammari (Bionaz e Loor, 2008b).

SREBP-1 e sue funzioni

Negli ultimi anni la ricerca ha fatto dei grandi passi avanti nel cercare di comprendere i meccanismi attraverso i quali la cellula capta i cambiamenti del livello del colesterolo e regola il metabolismo lipidico. È ormai assodato che i geni SREBPs (sterol regulatory element binding protein) siano fondamentali nella regolazione della sintesi dei lipidi del latte nel bovino (Bionaz e Loor, 2008 a e b), mentre nell'ovino questo meccanismo è poco conosciuto.

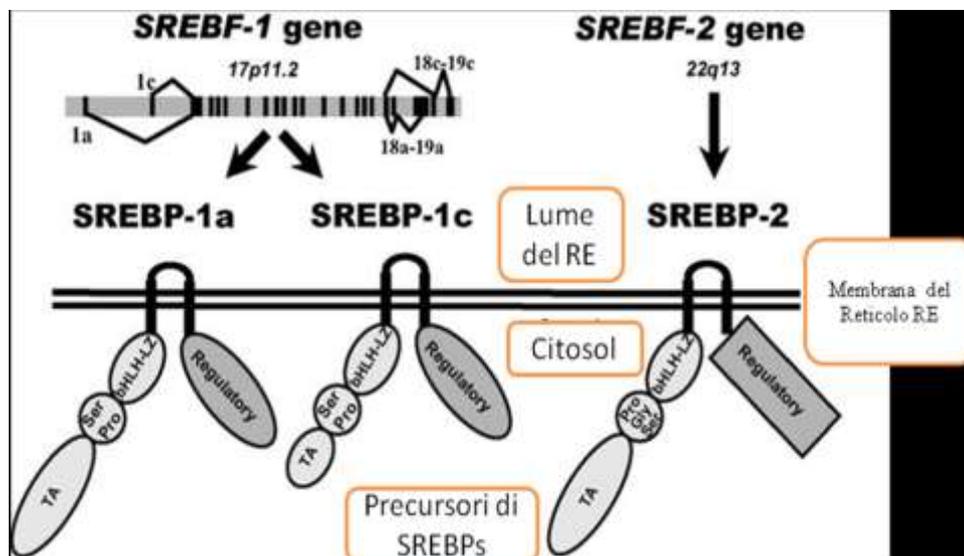
Tre isoforme di SREBPs – SREBP-1a, SREBP-1c and SREBP-2 sono state identificate e caratterizzate (Hua et al., 1995b; Miserez et al., 1997). Queste isoforme regolano l'espressione di più di 30 geni necessari per la captazione e la sintesi di acidi grassi, colesterolo, fosfolipidi e

trigliceridi nelle cellule animali comprese quelle mammarie (McPherson and Gauthier, 2004; Cecchinato et al., 2012).

SREBPs, come suddetto, sono considerati i principali regolatori della colesterologenesi e della lipogenesi e quindi sono studiati perché svolgono un importante ruolo nel controllo dell'omeostasi lipidica (Eberlé et al., 2004).

SREBPs codifica per dei fattori di trascrizione (SREBPF) sintetizzati come precursori inattivi composti da una catena di 1150 aminoacidi che rimangono adesi alla membrana del reticolo endoplasmatico (Hua et al., 1995a). Ogni precursore di SREBPF è strutturalmente organizzato in tre domini. Il primo dominio è costituito dalla regione NH-terminale di 480 aa, contenente: domini di transattivazione, una regione ricca in serina e prolina e la regione bHLH-LZ (basic-helix-loop-helix-leucine zipper) per il legame con il DNA e la dimerizzazione. Il secondo dominio consta di due segmenti idrofobici trans-membrana, interrotti da una breve ansa di circa 30 aa, che si proietta nel lume del reticolo endoplasmatico. Il terzo dominio, COOH-terminale, da una regione di circa 590 aa dove si trovano domini regolatori (Lee et al., 2003; Nagoshi et al., 1999, 2001) (Figura 5).

Figura 5. Localizzazione delle tre isoforme del gene SREBP nel reticolo endoplasmatico (Eberlè et al., 2004, modificato).

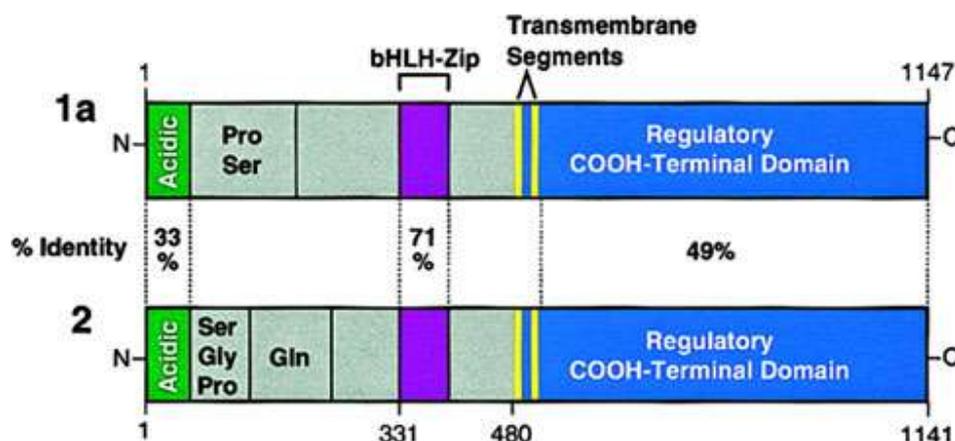


Le proteine codificate da SREBPs svolgono diversi ruoli nell'ambito del metabolismo lipidico, ed è proprio per questo motivo che vengono sintetizzate come proteine di membrana inattive per poi essere attivate tramite processi di proteolisi. Al momento dell'attivazione, il precursore proteico di SREBP, ancorato al reticolo endoplasmatico, subisce due step di scissione per rilasciare il dominio NH₂-terminale attivo. Il dominio bHLH-LZ contiene un segnale di localizzazione nucleare, che si lega direttamente alla importina (recettore di importazione nucleare) la quale permette il trasporto di SREBPs all'interno del nucleo.

Una volta che viene trasportato all'interno del nucleo SREBPs promuove l'attivazione di diversi geni coinvolti nella colesterogenesi e lipogenesi.

In diverse specie di mammiferi un unico gene (SREBF-1) sintetizza le isoforme SREBP-1a; SREBP-1c; mentre l'isoforma SREBP-2 è prodotta da un altro gene (SREBF-2). Questi geni sono localizzati nel cromosoma umano rispettivamente in posizione 17p11.2 e 22q13 (Miserez et al., 1997). Mentre nel bovino risulta localizzato nel cromosoma 19 (47,043,850-47,097,593).

Figura 6. Struttura delle isoforme 1a e di SREBP (Daemen et al., 2013).



Le proteine sintetizzate dai geni SREBP-1 e SREBP-2 mostrano omologia nella loro struttura per il 47% (Figura 6). I trascritti di SREBP-1a e 1c sono prodotti con l'utilizzo di siti di inizio alternativi e differiscono nel loro primo esone per 84 nucleotidi (esone 1a ed esone 1c) mentre gli altri esoni sono comuni in entrambe le isoforme. L'omologo di SREBP-1a nel

ratto è stato chiamato inizialmente adipocyte determination and differentiation dependent factor 1 (ADD1), proprio per il suo presunto ruolo nella differenziazione degli adipociti (Daemen et al., 2013).

SREBP-1a, come attivatore di trascrizione, è più potente rispetto a SREBP-1c a causa della lunghezza del suo dominio NH₂-terminale. In ogni caso SREBP-1c è l'isoforma più espressa nella maggior parte dei tessuti del topo e in quelli umani, soprattutto a livello di fegato, tessuto adiposo bianco (WAT), muscolo scheletrico, ghiandola surrenale e cervello. L'isoforma SREBP-1a è invece maggiormente espressa nelle linee cellulari e tessuti con un'elevata capacità di rigenerazione cellulare, come la milza e l'intestino (Shimano et al., 1997; Shimomura et al., 1997).

È stato dimostrato che SREBP-1a stimola i geni che regolano l'allungamento e la desaturazione degli acidi grassi. SREBP-1c invece è principalmente coinvolto nella regolazione dell'adipogenesi, innescando l'espressione di geni per la sintesi di enzimi richiesti per l'allungamento degli acidi grassi e per la sintesi dei trigliceridi e dei fosfolipidi, quale ad esempio la glicerolo 3-fosfato aciltransferasi (Edwards 2000).

Esperimenti effettuati su topi transgenici, hanno dimostrato infatti che la sovraespressione di SREBP-1a, nelle cellule epatiche (Horton et al., 2003a), determina un incremento marcato dell'espressione dei geni coinvolti nella sintesi del colesterolo, come per esempio la 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) sintasi, HMG-CoA reduttasi, squalene sintasi ma anche di quelli coinvolti nella sintesi di acidi grassi, come per esempio l'acetil-

CoA carbossilasi (ACC), sintasi degli acidi grassi (FAS) e la stearyl-CoA desaturasi-1(SCD), determinando quindi l'accumulo sia del colesterolo che dei trigliceridi (TG) (Shimano et al 1996; Horton, et al., 2003b).

Altri studi, effettuati su topi, hanno dimostrato che, in epatociti isolati, la sovraespressione dell'isoforma SREBP-1c induce non solo l'espressione dei geni della lipogenesi, ma anche di quelli della glucochinasi (GK), che è necessaria per l'utilizzo del glucosio nel fegato ed è regolata dall'insulina a livello trascrizionale (Eberlé et al., 2004).

L'importanza dell'isoforma SREBP-1c è stata dimostrata anche in seguito a studi effettuati con la delezione di SREBP-1c su omologhi ricombinanti, che hanno messo in evidenza una diminuzione nell'espressione basale dei geni che codificano per gli enzimi coinvolti nella sintesi di acidi grassi e trigliceridi (Liang et al., 2002).

La trascrizione di SREBP-1c è promossa dall'insulina e soppressa dal glucagone, mentre a livello postrascrizionale è promossa principalmente dagli steroli, i quali inibiscono il processo proteolitico dei precursori di SREBP legati alla membrana del R.E. (Eberlé et al., 2004).

SREBP-2 controlla principalmente l'espressione dei geni coinvolti nella colesterologenesi. La sovraespressione dell'isoforma SREBP-2, nel fegato di topi, causa preferenzialmente l'induzione di geni coinvolti nella biosintesi del colesterolo e una moderata induzione dei geni coinvolti nella sintesi degli acidi grassi (Foretz et al., 1999 a e b).

Oltre ad indurre l'attività di geni coinvolti nella sintesi di colesterolo e degli acidi grassi, SREBPs aumentano l'espressione di geni coinvolti nella generazione di NADPH, che è un importante cofattore per la sintesi lipidica (Horton et al., 2002).

L'attività di SREBPs è controllata a diversi livelli: trascrizionale, postrascrizionale (clivaggio proteolitico dei precursori), postrasduzionale.

I precursori di SREBP sono trattenuti nella membrana del reticolo endoplasmatico attraverso uno stretto legame con SCAP (cleavage activating protein) (Nohturfft et al., 1998).

Quando ci sono le condizioni appropriate SCAP accompagna il precursore di SREBP dal reticolo endoplasmatico (R.E.) fino all'apparato del Golgi.

Affinché SREBP possa attivare i suoi geni target nel nucleo, quando ancora è legato al reticolo endoplasmatico, è necessario che il dominio N-terminale venga rilasciato. Quindi prima di tutto SREBP viene trasportato all'interno dell'apparato del Golgi ed è qui che avvengono due fondamentali processi proteolitici. Gioca un ruolo fondamentale in questo processo la proteina di membrana SCAP (SREBP cleavage-activating protein), la quale regola il clivaggio di SREBP (Daemen et al., 2013).

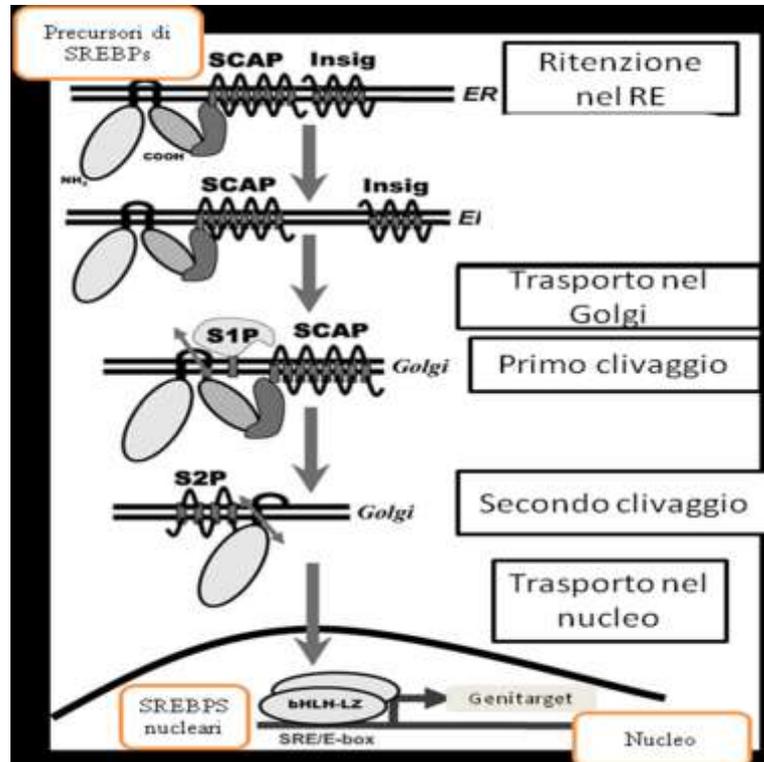
SCAP possiede un dominio N-terminale di 730 aminoacidi, il quale possiede otto regioni che attraversano la membrana separate da corti anelli idrofili, i quali includono un dominio sterolo-sensibile SSD (sterol-sensing domain). L'altro dominio C-terminale consiste invece in una regione

idrofila di 546 aminoacidi che contengono 4 ripetizioni di triptofano-aspartato (WD) (Yang et al., 2002).

Legame tra SREBP e SCAP

Le due isoforme di SREBP (1 e 2) formano un complesso con SCAP nella membrana del reticolo endoplasmatico, dove la regione WD di SCAP lega il dominio C-terminale di SREBP. Quando la concentrazione di steroli nella cellula è ottimale, il colesterolo lega direttamente il dominio sterolo-sensibile (SSD) di SCAP, il quale subisce un cambiamento conformazionale. Questa modificazione conformazionale favorisce il legame di SCAP con un'altra proteina INSIG, che fa sì che si blocchi il trasferimento del complesso SCAP-SREBP verso l'apparato del Golgi, dove ha luogo l'attivazione proteolitica (Yang et al., 2002).

Figura 7. Fasi dell'attivazione di SREBPs attraverso il clivaggio proteolitico (Eberlè et al., 2004, modificato).



Quando la concentrazione di steroli nella cellula è insufficiente, il complesso SREBP-SCAP si muove verso l'apparato del Golgi attraverso le vescicole rivestite (COPII) per azione di una sequenza aminoacidica di SCAP.

SCAP possiede una lunga ansa che si proietta verso il citoplasma tra le eliche di membrana 6 e 7. In questa ansa è presente un esapeptide chiamato (MEDADL), che è fondamentale per far sì che le proteine Sec23 e Sec24 di COPII leghino il complesso SREBP-SCAP. In realtà perché i

gruppi di questo complesso entrino nelle vescicole è necessaria l'attività di una piccola GTPase, chiamata Sar1, che si lega alla membrana del reticolo endoplasmatico GTP dipendente (Sun et al., 2005).

Il legame di Sar1 avvia il legame con Sec23-24 che recluta a sua volta Sec13/31, questo eterodimero forma il rivestimento della vescicola così che questa possa staccarsi dal RE (Sun et al., 2005). L'interazione di SCAP con INSIG causa una modificazione nella conformazione di SCAP tale da inibire l'interazione di MEDADL con Sec23-24.

Un'altra proteina di membrana chiamata ring finger protein 139 (TRC8) è stata identificata come regolatrice nel sistema di SREBP, infatti questa possiede un dominio sterolo-sensibile (SSD) e un RING finger motif che codifica per una ligasi E3. TRC8 è in grado di legarsi a SREBP-2 e formare insieme a SCAP un complesso TRC8- SREBP- SCAP, il quale impedisce a SCAP di legarsi a SEC23/24 impedendo quindi che il complesso sia muova verso l'apparato del Golgi (Irisawa et al., 2009).

Dopo la fusione delle vescicole COPII con l'apparato del Golgi, il dominio N-terminale di SREBPs viene rilasciato grazie all'attività di proteolisi intramembranaria. Il processo proteolitico avviene ad opera di due proteasi S1P (site-1 protease) e S2P (site-2 protease), dove prima interviene S1P che scinde il legame leucina-serina dell'ansa di SREBP che da verso il lume, successivamente interviene S2P che invece idrolizza il legame leucina-cisteina del dominio N-terminale che attraversa la membrana. Da questo processo di scissione ne risulta che il segmento N-terminale si stacca

dal precursore inattivo di SREBP e migra verso il nucleo per attivare i geni target (Brown e Goldstain 1999) (Figura 7).

Le due proteasi di cui si è appena parlato non sono specifiche per SREBPs e sono coinvolte in clivaggi di altre proteine trans membrana (Brown et al., 2000).

Goldstein J.L. et al., (2006) hanno dimostrato che i processi di attivazione di SREBPs possono essere controllati dalla concentrazione di steroli nella cellula, e che in presenza di alte concentrazioni di questi, il complesso SREBP-SCAP, viene trattenuto nella membrana del reticolo endoplasmatico. Quando invece la concentrazione di steroli diminuisce, lo stesso complesso, si sposta verso l'apparato del Golgi dove ha luogo il clivaggio enzimatico.

Il colesterolo lega direttamente il dominio sterolo-sensibile di SCAP e ne modula la sua conformazione, suggerendo che l'interazione proteina-proteina sia coinvolta nel trattenere il complesso SREBP-SCAP nel reticolo endoplasmatico (Radhakrishnan et al., 2004).

La scoperta di INSIG (insulin induced gene), come partner di SCAP, coinvolto nel blocco del complesso SREBP-SCAP nel reticolo endoplasmatico, aiuta a far capire qualcosa in più su questo meccanismo. Quando i livelli di steroli sono alti, SCAP interagisce fortemente con INSIG trattenendo SREBP-SCAP nel R.E. (Yang et al., 2002; Yabe et al., 2002). Questo tipo di processo sterolo sensibile non si riferisce a tutte e tre le

isoforme di SREBP e infatti altri fattori, tra cui l'insulina, sembrano essere coinvolti nel clivaggio.

In merito a questo processo, diversi studi effettuati anche in vivo hanno messo in evidenza che l'isoforma SREBP-1c è principalmente regolata dai cambiamenti nello stato nutrizionale, fattore che invece non ha effetti sull'espressione dell'isoforma SREBP-2 (Shimomura et al., 1997).

Eberlè et al., (2004) hanno dimostrato che l'insulina di per se è in grado di modulare immediatamente la concentrazione di SREBP-1c all'interno del nucleo. Finora, il meccanismo attraverso il quale l'insulina agisce sul clivaggio di SREBP-1c non è ben chiaro, ma parrebbe che la proteina Insig sia responsabile dei diversi effetti dell'insulina sugli steroli nei confronti del clivaggio delle due isoforme di SREBP-1c e 2.

La trascrizione di SREBP-1c può essere attivata anche dal recettore X degli epatociti α (LXR). Questo è un recettore ormonale nucleare, particolarmente espresso nel fegato che viene attivato dagli ossisteroli (derivati del colesterolo) (Lehmann et al., 1997; Janowski et al., 1999).

L'attività trascrizionale di SREBP maturo (nSREBP) è regolata da modificazioni strutturali o dall'interazione con altre proteine.

È stato dimostrato da alcuni studi che, nel nucleo, le proteine di SREBP sono modificate per ubiquitinazione e rapidamente degradate dal proteosoma 26S (Hirano et al., 2001). In presenza di inibitori del proteosoma, gli nSREBPs sono stabilizzati e l'espressione dei loro geni target si intensifica. Inoltre i fattori di trascrizione di SREBP sono

ubiquitinati e degradati mediante una via trascrizione-dipendente che coinvolge il proteosoma, il quale interrompe così il segnale di trascrizione. Entrambi questi risultati richiedono una transattivazione funzionale e un dominio che lega SREBPs al DNA (Sundqvist e Ericsson., 2003).

SREBP-1 e 2 sono modificati da un altro piccolo modulatore ubiquitina-correlato (SUMO)-1, il quale non ha effetti di ubiquitinazione e quindi di stabilità delle proteine, ma piuttosto reprime la loro attività trascrizionale (Hirano et al., 2003).

SREBP-1c possiede, nella sua regione N-terminale, aminoacidi leggermente più acidi, rispetto a SREBP-1a e questo probabilmente spiegherebbe il fatto che come attivatore trascrizionale è relativamente più debole (Eberlé et al., 2004).

SREBP Target

Una volta trasportato nel nucleo, trasporto mediato da un'importina che interagisce con il BHLH-LZ (Nagoshi et al., 1999), nSREBPs attivano diversi geni coinvolti nella sintesi dei lipidi e del colesterolo e geni enzimatici lipogenici (Tabella 2).

I geni coinvolti nella sintesi del colesterolo contengono l'elemento SREs (sterol regulatory element) che è identico, o relativamente simile, alla sequenza originale di SRE trovata nella LDL.

Oltre ad attivare i geni target, i trascritti di SREBPs inducono la trascrizione del gene SREBP stesso, stimolano la produzione di nuovi SREBP e innescano un meccanismo di feedback positivo.

Tabella 2. Geni attivati da SREBPs (Shimano, 2001).

Geni attivati da SREBPs	
GENE	Sequenza promotrice SRE
Metabolismo del colesterolo	
LDL recettore	ATCACCCAC
HMG CoA sintetasi	CTCACCCAC GCCACCCTAC
HMG CoA riduttasi	ACCGCACCAT CTCTACCAC
Farnesil difosfato sintetasi	CTCACAGAG
Squalene sintetasi	ATCACGCCAG CTAGTGTGAG
SREBP-2	ATCACCCAC
Lanosterol 14 ^α -dimetilasi (Cyp51)	ATCACCTCAG
Metabolismo degli acidi grassi	
Acetil CoA carbossilasi	CCAT - - - - TCAC
Acido grasso sintetasi	GCCACGCCAC GTCAGCCCAT
Stearoil CoA desaturasi-1 e 2	AGCAGATTGTG
Acil CoA binding protein (Diazepam)	CTCGCCCGAG
SREBP1	CTCACCCGAG
ATP citrato ligasi	TCAGGCTAG
Enzima Mulic	TCACCCGTCGGTG
PPAR gamma	ATCACTTGAG
Acetil CoA sintetasi	ATTCATGTGACAT ATCACTCCAC
Sintesi dei trigliceridi	
Glicerol-3-fosfato aciltransferasi	CTCAGCCTAG CTCACCCAG GACACCCAG
Metabolismo delle lipoproteine plasmatiche	
Lipoprotein lipasi	CTCCCCCAA
Recettore HDL (SRBI)	GCCACCTGCA

Nonostante SREBPs attivi principalmente i geni target, esistono dei geni con sequenze SRE che vengono repressi da SREBPs, come per esempio microsomal trigliceride transfer protein (MTTP) (Sato et al., 1999) e caveolina (Bist et al., 1997). L'inibizione di alcuni geni attuata da SREBP potrebbe essere dovuta ad un effetto indiretto, come l'attivazione di un repressore.

L'attivazione dei geni target da parte di SREBP richiede diversi cofattori, infatti nelle vicinanze della sequenza SRE (generalmente 15 basi) di SREBP, promotore dei geni target, si trovano i siti NF-Y oppure Sp1. NF-Y e Sp1 sono legati a SREBP e pare siano coinvolti nel reclutamento dei meccanismi di trascrizione di base, incluso il CPB (Shimano 2001) (Tabella2).

SCOPO

Il latte è un liquido prodotto dalla mammella dei mammiferi nel quale si trovano molte sostanze sospese o in soluzione. (Brunelli, 2008). Questo liquido biologico nei ruminanti è composto, per circa l'80%, da acqua e per il restante 20% è costituito da lipidi, proteine, lattosio, vitamine e sali minerali.

La composizione del latte dei ruminanti possiede una notevole variabilità legata a fattori di diverso tipo quali la specie, lo stato nutrizionale, lo stadio di lattazione, le condizioni di allevamento e anche il profilo genetico dell'animale (Chilliard et al., 2003).

La miscela di tutte le sostanze costituenti il latte fa di questo un alimento completo, caratterizzato da un determinato livello energetico e un alto valore nutritivo, unico nel suo genere. Per questo motivo il latte è tra gli alimenti più consumati dall'uomo e proviene per quasi la totalità dai ruminanti. Inoltre da esso si ottengono diversi prodotti caseari, anche questi di largo consumo da parte dell'uomo.

Tra i costituenti del latte, le proteine e il grasso sono quelli che assumono la maggiore importanza sia per il loro valore nutrizionale che per il ruolo che rivestono nel processo di trasformazione casearia.

Gli acidi grassi dei lipidi animali, giocano quindi un ruolo importante sul metabolismo (assieme a glucidi e proteine) data la loro funzione strutturale e soprattutto energetica. Tuttavia, nonostante il latte

abbia una quantità di grasso in percentuale piuttosto bassa esso incide in modo sostanziale sull'apporto lipidico giornaliero assunto dall'uomo.

Il latte come altri alimenti di origine animale possiede un'alta concentrazione di acidi grassi saturi (fonte di colesterolo) e per questo spesso viene considerato potenzialmente dannoso per la salute umana. Tale fatto ha portato spesso a una limitazione nel consumo del latte e dei suoi derivati senza valutare le peculiarità benefiche che questi prodotti posseggono. Infatti il latte vanta la presenza di un'altra classe di acidi grassi, quelli insaturi (mono e poli), le caratteristiche dei quali possono portare effetti positivi sulla salute umana.

Nel latte ovino si riscontra normalmente una quantità di acidi grassi insaturi di circa il 30% e tra questi sono compresi anche i CLA che, come noto, hanno effetti anticancerogeni e antiaterogenici. Pertanto, l'assunzione in quantità non eccessive del latte e dei suoi derivati è fonte di principi nutritivi non svantaggiosi per la salute umana.

Da diversi anni si studia il modo per incrementare la quantità di acidi grassi insaturi nel latte; inizialmente si è cercato di potenziare la qualità del latte, a favore di questo tipo di molecole, attraverso la somministrazione degli stessi nella dieta dell'animale. Tuttavia, come è noto, il rumine satura quasi la totalità degli acidi grassi assunti con la dieta, pertanto la formazione di quelli insaturi rimane a carico della mammella.

Si è tentata poi una via di somministrazione alternativa degli acidi grassi insaturi "by passando" il rumine, ma anche con questa tecnica, si

ottenevano incrementi contenuti di questa classe di acidi grassi nel latte. Infatti, la somministrazione di acidi grassi insaturi, soprattutto di quelli a lunga catena e polinsaturi, determina una diminuzione della sintesi di tutti gli acidi grassi; fenomeno conosciuto con il termine inglese di Milk Fat Depression (MFD).

Questa inibizione alla produzione di acidi grassi mammari è dovuta ad una sorta di feedback determinata dall'alta concentrazione dei lipidi a lunga catena di provenienza dal circolo ematico. Nei ruminanti questo fenomeno si esprime in modo differente a seconda della specie e sembra sia dovuto all'inibizione dell'espressione di alcuni geni coinvolti nella sintesi degli acidi grassi (Bauman et al., 2008).

SREBP-1 è uno dei geni influenzati dalla somministrazione di acidi grassi insaturi e considerando il ruolo cruciale che possiede nella sintesi dei lipidi mammari risulta di particolare interesse studiarne l'espressione.

Per studiare l'espressione dei geni nella ghiandola mammaria occorre prelevare cellule epiteliali della mammella dalle quali estrarre l'RNA. Il campione di cellule può essere ottenuto mediante biopsia del parenchima mammario o dalle cellule somatiche del latte. Il secondo metodo è quello che evita traumatismi alla mammella, i quali possono scaturire in patologie dell'organo, ma d'altra parte la quantità di RNA estratto può non essere sufficiente per studi di espressione genetica. Questo metodo, meno invasivo, è stato validato sulle bovine e sulla capra ma non sulla pecora.

Gli scopi della presente tesi sono molteplici. Il primo obiettivo è quello di mettere a punto un metodo per l'estrazione dell'RNA dalle cellule somatiche del latte che sia semplice, ripetibile, rapido e possibilmente economico.

Il secondo obiettivo è quello di studiare quanto il gene SREBP-1 venga espresso nella ghiandola mammaria di ovini nel primo periodo della lattazione.

Il terzo obiettivo è analizzare lo spettro acidico del latte degli ovini esaminati e correlarlo con l'espressione del gene SREBP-1.

MATERIALE E METODI

La ricerca si è articolata in tre fasi consecutive; nella prima è stata messa a punto l'estrazione dell'RNA a partire dal latte ed è stata valutata la resa di RNA in rapporto alla quantità di latte utilizzata; nella seconda fase sono stati scelti gli allevamenti, sono stati eseguiti i prelievi di latte e si è proceduto con l'estrazione dell'RNA e l'impiego dell'RT-PCR. Nell'ultima fase è stata eseguita la qPCR e l'analisi dello spettro acidico.

Prima fase

Animali e prelievi

Nella prima fase è stato identificato e scelto un allevamento sito nel Comune di Sassari che presentava caratteristiche manageriali moderne, sia nelle strutture che nella conduzione degli animali. La scelta dell'allevamento è stata condizionata anche dal fatto che gli animali possedessero un bassa concentrazione di cellule somatiche nel latte.

Gli animali durante il giorno andavano al pascolo su erbai di leguminose e graminacee. La sera venivano ricoverati nell'ovile e ricevevano un'integrazione di concentrato di 300g per capo al giorno. Il concentrato conteneva il 20,4% di proteina grezza e 12,5 MJ ME/kg DM. Durante la notte il fieno e l'acqua erano somministrati ad libitum.

Sono stati scelti 15 animali che avevano partorito, nei primi 10 giorni di dicembre, un solo agnello che veniva svezzato a 30 giorni di età. A partire dal 25 gennaio a cadenza settimanale sono stati effettuati prelievi di

latte individuali dalla mungitura mattutina. Al primo prelievo a ciascun animale sono stati prelevati 500 ml di latte, al secondo 300 ml, al terzo 150 ml, e al quarto 300ml. Da ciascun animale, nei quattro campionamenti, sono stati prelevati altri 10 ml di latte ed utilizzati per la conta delle cellule somatiche e della carica microbica; analisi svolta presso il laboratorio ARA (Figura 9). Il latte subito dopo il prelievo è stato refrigerato e trasportato presso il nostro laboratorio. I contenitori per la raccolta del campione di latte prima di essere utilizzati venivano immersi overnight in una soluzione contenente NaOH 0,1N EDTA 0,1% .

Figura 8 e 9. Raccolta dei campioni e pesatura del latte.



Analisi di laboratorio

Le diverse quantità di latte prelevate durante i campionamenti sono state utilizzate per stabilire quale fosse l' aliquota necessaria per ottenere una quantità di RNA idonea per effettuare analisi di espressione genica. Quindi i campioni individuali di latte sono stati trattati tutti nello stesso modo a

prescindere dalla quantità prelevata. I campioni individuali sono stati esaminati entro 4 ore dal prelievo, eccetto una aliquota di 150 ml dell'ultimo prelievo che è stata refrigerata a 4°C ed analizzata dopo 24 ore dal prelievo. Il campione è stato stoccato per tempi differenti per valutare se la resa all'estrazione subisse variazioni dovute al tempo di estrazione.

Estrazione dell'RNA

I campioni in laboratorio, sono stati sottoposti a centrifugazione (2000 rpm per 15 minuti a 6°C) e successivamente il grasso affiorante è stato allontanato tramite aspirazione con pompa a vuoto mentre il restante surnatante per rovesciamento (Figura 10).

Figura 10 e 11. Aspirazione del grasso e lavaggio del pellet con PBS.



Il pellet di cellule ottenuto è stato riunito in un'unica aliquota utilizzando la soluzione di lavaggio costituita da 10 ml di PBS 1X a pH 7,4 (Phosphate Buffered Saline) addizionato con EDTA(Ethylene-D-amine-Tetra-Acetic-Acid) 0.5mM e DPCB(D-Ethyl-Pyro-Carbonate) 0.1% (Figura

11). Tale aliquota successivamente è stata sottoposta a centrifugazione a 2000 rpm per 15 min a 6°C.

Eseguito un secondo lavaggio in PBS, si è proceduto con l'estrazione dell'RNA dal pellet di cellule ottenuto, utilizzando un Kit commerciale (*PerfectPure RNA Tissue Kit, 5 Prime GmbH, Hamburg, Germany*).

Il principio di funzionamento del Kit consisteva nella lisi delle cellule con una soluzione contenente TCEP (tris2-carbossietilfosfato) e l'utilizzo contemporaneo del vortex (2 min) con la finalità di rompere le membrane cellulari, diminuire la viscosità del campione, eliminare l'attività di RNasi endogene. Una serie di processi di filtrazione e lavaggio in colonnine permetteva poi l'allontanamento dei residui cellulari, delle proteine ed altri contaminanti dall'RNA legato alla colonnina. Nell'ultimo passaggio l'RNA legato alla colonnina è stato eluito in un volume finale di 50 µl (Figura 12 e 13).

La qualità e la purezza dell'RNA sono state verificate tramite lettura allo spettrofotometro ed elettroforesi in gel di agarosio. L'integrità dell'RNA (sub-unità 28S e 18S) è stata valutata attraverso elettroforesi in gel di agarosio denaturante.

Per la preparazione del gel sono stati utilizzati 3,75 ml di formammide aggiunti al gel ancora caldo. 2 µl di soluzione denaturante contenente 1mg/ml blu bromofenolo, (Pharmacia Biothec, Uppsala, Sweden) 25mM di EDTA (pH 8), 95% formammide (SIGMA-ALDRIC Corporation, St. Louis, Missouri, USA) sono stati aggiunti a 16 µl del

campione estratto. Il campione è stato portato alla temperatura di 70 C° per 10 min e, mantenuto poi in ghiaccio, è stato caricato nel pozzetto del gel. La corsa elettroforetica è stata eseguita in buffer TAE 1X a 100V per 45min in camera elettroforetica verticale Mini-Protean 3 cell Biorad.

Seconda fase

Animali e prelievi

Per la seconda fase è stato identificato un allevamento nella provincia di Sassari che presentava buone caratteristiche manageriali, sia per quel che riguarda le strutture sia per la conduzione degli animali. Questi, durante il giorno, pascolavano su erbai di leguminose e graminacee. La sera venivano ricoverati nell'ovile e ricevevano una integrazione di concentrato del commercio di 300g per capo al giorno. Il concentrato conteneva il 20,4% di proteina grezza e 12.5 MJ ME/kg DM; acqua e fieno venivano fornite ad libitum. Sono stati scelti 20 animali che avevano partorito nei primi sette giorni di dicembre, un solo agnello svezzato a 30 giorni di età. Da ciascun animale sono stati effettuati due prelievi di latte individuale di 250ml dalla mungitura mattutina, il primo a 40 giorni dal parto e il secondo a 70 giorni dal parto. Da ogni campione di ciascun animale sono stati separati 50 ml di latte e utilizzati per la conta delle cellule somatiche, della carica microbica e per la determinazione della concentrazione di grasso, proteine e lattosio, analisi svolta presso il laboratorio ARA. Inoltre in occasione dei due prelievi è stata misurata la quantità di latte prodotta da

ciascun animale nelle due mungiture giornaliere (Figura 8). Il latte subito dopo il prelievo è stato refrigerato a 4°C e trasportato presso il nostro laboratorio. Infine, altri 10 ml sono stati utilizzati per la determinazione degli acidi grassi. I contenitori per la raccolta del campione di latte prima di essere utilizzati sono stati immersi overnight in una soluzione contenente NaOH 0,1N EDTA 0,1%.

Estrazione dell'RNA

L'estrazione dell'RNA è stata eseguita con il metodo messo a punto nella prima fase (Figura 12 e 13).

Figura 12 e 13. Estrazione dell'RNA con Kit commerciale.



RT-PCR

Per la reazione di retrotrascrizione è stato utilizzato il kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) che prevede l'uso di primers universali in grado di sintetizzare tutto l'RNA messaggero.

La reazione è stata condotta in un volume di reazione di 20 μ l contenente per ciascun campione 4 μ l di 5X buffer iScript, 1 μ l di iScript trascrittasi inversa, 8 μ l di acqua priva di RNA e DNA, 7 μ l di RNA estratto, concentrazione di circa (500-600ng) utilizzando il protocollo Biorad: 5min a 25° C, 30 min a 42° C, 5 min a 85° C, raffreddamento a 4° C. La reazione di retrotrascrizione è stata eseguita in un Eppendorf Mastercycler ep gradient S.

Il cDNA ottenuto è stato conservato a -20° C per poi utilizzarlo in studi di espressione genica in Real Time PCR.

Le coppie di primers per il gene SREBP-1 ovino sono state testate in PCR qualitativa utilizzando i primers specifici messi a punto da Bionaz e Loor, (2008b) per il bovino.

I 20 μ l di miscela di reazione erano così costituiti: 2 μ l Buffer10X; 0,3 μ l MgCl₂ (50mM); 0,8 μ l di ciascun primer (10pmoli/ μ l); 1,6 μ l dNTPs (1,25mM), 0,2 μ l di taq Invitrogen (5U/ μ l); 12,3 μ l di acqua priva di RNA e DNA; 2 μ l del campione. Il protocollo di reazione prevedeva: 2min a 50° C, 10min a 95° C, 40 cicli di 15sec a 95° C (denaturazione) ed 1 min a 60° C (annealing ed estensione).

I prodotti di PCR sono stati analizzati in gel di agarosio al 1,5%. Per verificare il giusto appaiamento dei primers con le sequenze “target” ovine, i prodotti di PCR sono stati sequenziati in entrambe le direzioni.

Il cDNA è stato utilizzato come target con i primers scelti e sequenziato in entrambe le direzioni, e la sequenza nucleotidica è stata

confrontata con sequenze depositate nel database pubblico NCBI - BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Terza fase

qPCR

Prima di iniziare ad eseguire la PCR quantitativa utilizzando RealMasterMix SYBR ROX (5 PRIME GmbH, Amburgo, Germania), 125 μ l di soluzione SYBR ROX, sono stati aggiunti e miscelati accuratamente in un singolo tubo da 1,0 ml di 2.5X RealMasterMix SYBR ROX.

La reazione di PCR quantitativa è stata eseguita in un volume di 12 μ l contenente 8 μ l di qPCR mastermix (5 μ l di RealMaster mix Syber Rox (5 PRIME); 0,4 μ l di Forward e Reverse primers (10pmol/ μ l); in concentrazione finale di 330nM, 2,2 μ l di H₂O DNA/RNA-free); 4 μ l di cDNA diluito 1:3. La reazione è stata condotta nella piastra semiskirted Eppendorf nel termociclatore Eppendorf RealPlex ep gradient S. I campioni per il gene target e per il gene “housekeeping” sono stati analizzati in triplicato.

Il programma di PCR prevedeva 2 min at 95° C; ciascun ciclo includeva denaturazione a 95° C per 15 sec ed un ciclo comprendente (annealing + estensione) a 60° C della durata di 1 min (40 cicli) (Figura 14).

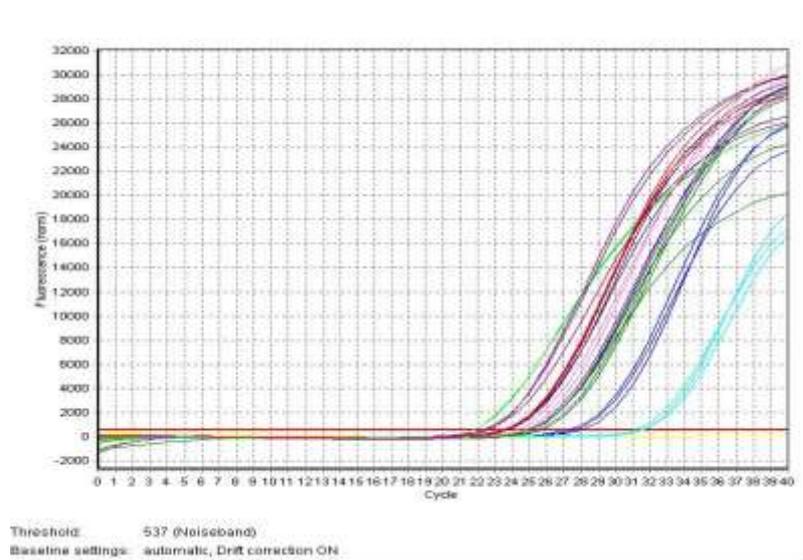
Inoltre è stata utilizzata l’analisi della curva di melting per controllare la specificità dell’amplificazione ed escludere la formazione di dimeri di primer.

Il livello di espressione del gene SREBPF1 (Sterol regulatory element binding Transcription Factor 1) è stato valutato attraverso il metodo del $\Delta\Delta C_t$ che permette di calcolare i livelli di espressione relativa del gene target rispetto all'espressione del gene UXT ($\Delta C_t = \text{media aritmetica del } C_t \text{ del gene housekeeping} - C_t \text{ del gene target}$).

I dati sono stati normalizzati utilizzando il software GenEx. I valori di espressione del gene sono espressi in fold change $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001) rispetto ad un campione preso come riferimento di espressione (nel nostro studio CCS <100.000 e percentuale di grasso 5,37) e poi trasformati in scala logaritmica in maniera da rendere i dati statisticamente confrontabili.

Il gene UXT è stato preferito rispetto al G6PDH come “reference gene” poiché ha un'espressione medio-bassa nella ghiandola mammaria bovina e la sua espressione non cambia significativamente durante la lattazione come evidenziato in altri studi (Bionaz e Loor, 2007).

Figura 14. diagramma della fluorescenza dei cicli di amplificazione con andamento sigmoide; numero di cicli di PCR e grado di fluorescenza.



Analisi degli acidi grassi

La determinazione del profilo acidico della frazione lipidica è stata effettuata in duplicato per ciascuno dei campioni. L'estrazione dei lipidi a freddo è stata eseguita in via preliminare secondo la metodica proposta da Bligh e Dyer nel 1959; la susseguente trans-esterificazione degli acidi grassi, invece, è stata portata a compimento in accordo con la metodica consigliata da Molto-Puigmartí', (2007).

Dal campione di latte, dopo essere stato attentamente omogenato, è stato prelevato 1 ml e raccolto in una falcon. A questo sono stati aggiunti 3,75 ml di cloroformio-metanolo (1:2) e sono stati agitati mediante vortex per 10 min. Successivamente sono stati aggiunti 1,25 ml di cloroformio puro e agitati per 1min. Infine sono stati aggiunti 1,25 ml di H₂O mQ e

nuovamente agitati per 1min. Il campione così preparato è stato centrifugato a 2000 rpm per 10min a temperatura ambiente ottenendo tre fasi in cui i lipidi si trovavano nello strato più basso. Successivamente la fase lipidica è stata filtrata dopo essere stato aggiunto sodio solfato anidro (per eliminare l'eventuale acqua presente) e cloroformio per bagnare il filtro. È stato poi pesato il campione, portato a secco, al netto della provetta.

Per la derivatizzazione ai campioni è stato aggiunto esano nel rapporto di 1:1 e portati a secco sotto corrente di azoto. In seguito sono stati aggiunti 500 µl di sodio metossido in metanolo 0,5 M e vortexati per 1 min. Il campione è stato incubato per 10 min a 80°C e successivamente raffreddato a 25°C e aggiunti 500 µl di boro-trifluoride in metanolo (14% p/V). Questa soluzione, dopo essere stata vortexata, ha subito un altro processo di incubazione a 80°C per 3 min e poi è stata raffreddata. Nella fase successiva sono stati aggiunti altri 500µl di esano, e dopo aver agitato per un minuto, sono stati aggiunti 1000µl di una soluzione satura di cloruro di sodio e sono stati lasciati a riposo per ottenere la separazione della fase lipidica, situata nella parte superiore. La parte lipidica è stata prelevata e lavata con 200µl di esano e quindi il campione è stato portato a secco sotto corrente di azoto e conservato a -20°C fino al momento della successiva analisi.

Attraverso la gas cromatografia capillare (Thermo-Trace GC 2000, munito di rivelatore a ionizzazione di fiamma) sono stati analizzati i campioni di metil esteri degli acidi grassi ottenuti attraverso i passaggi

precedenti. Per l'analisi è stata utilizzata una colonna capillare della lunghezza di 100m e del diametro di 0,25mm, e spessore del film di 0,25 μm (RT-2560, Restek).

Come gas di trasporto è stato utilizzato l'azoto con il flusso di 0,6ml al minuto. Il volume di campione usato corrispondeva a 0.5 μl iniettati secondo modalità split (1:20). La temperatura dell'iniettore era di 250°C mentre quella del forno partiva da 70°C (mantenuto per 3 min) per portarsi a 240°C con incrementi di 3°C/minuto. Il rilevatore a ionizzazione di fiamma era tarato alla temperatura di 250°C.

I dati ottenuti sono stati acquisiti mediante il software Azur. Gli esteri metilici degli AG sono stati identificati attraverso la comparazione con una miscela di 37 acidi grassi standard (Supelco, Bellefonte PA). Per individuare gli acidi grassi polinsaturi sono stati utilizzati i seguenti standards: una miscela di C18:2; standard individuali di cis- 5,8,11,14,17; C20:5, cis-4,7,10,13,16,19 C22:6 (Supelco); C18:3 cis-6,9,12; C18:3 cis-9,12,15 (Matreya Inc., Pleasant Gap, PA). Gli acidi grassi monoinsaturi C18:1 sono stati identificati mediante uno standard commerciale (Supelco).

Analisi statistica

Per l'analisi statistica dei dati ci si è avvalsi del software open source R (R-project). La differenza tra le medie delle concentrazioni di RNA ottenute dai campioni estratti a 4 e 24 ore è stata valutata utilizzando una

ANOVA. Le relazioni tra la concentrazione dell'RNA, la produzione (g/die) e le CCS sono state analizzate utilizzando il test di Pearson. Il test della correlazione di Pearson è stato utilizzato inoltre per verificare la presenza di relazione tra l'espressione del gene SREBP, i diversi costituenti del latte, il contenuto di grassi (saturi, mono e polinsaturi), il rapporto acidi grassi saturi e insaturi e infine il contenuto di CLA. Le correlazioni, sia positive che negative, sono state considerate statisticamente significative per $P < 0,05$. Per testare le differenze statistiche tra l'espressione del gene nei due campionamenti e la sua influenza sui costituenti del latte è stata utilizzata un'Analisi della Varianza a una via. Anche in questo caso i valori di $P < 0,05$ sono stati considerati significativi. Le differenze della concentrazione media di RNA dei due campionamenti effettuati nella seconda fase è stata stimata attraverso il test di t-Student.

RISULTATI

Risultati prima fase

Il metodo messo a punto per l'estrazione dell'RNA è risultato affidabile, ripetibile e di facile esecuzione. Inoltre la ricerca ha consentito di ridurre al minimo il volume di latte utilizzato per l'estrazione e di ottenere una quantità di RNA adeguata per essere impiegata per gli studi di espressione genica a livello mammario. Infine i risultati mostrano che la conservazione del latte a 4°C non compromette, se non in piccola parte, la resa all'estrazione dell'RNA.

Nella tabella 3 sono mostrati la quantità totale e la concentrazione dell'RNA estratto dalle diverse quantità di latte utilizzato (500 ml, 300 ml, 150 ml), in relazione al diverso tempo di estrazione dopo il prelievo (4h o 24h) e il valore delle cellule somatiche.

Tabella 3. Media della conta delle cellule somatiche (SCC), concentrazione dell'RNA e della resa dell'RNA totale in differenti quantità di latte, estratto dopo 4h o dopo 24h (per i campioni da 150ml) in pecore di razza sarda.

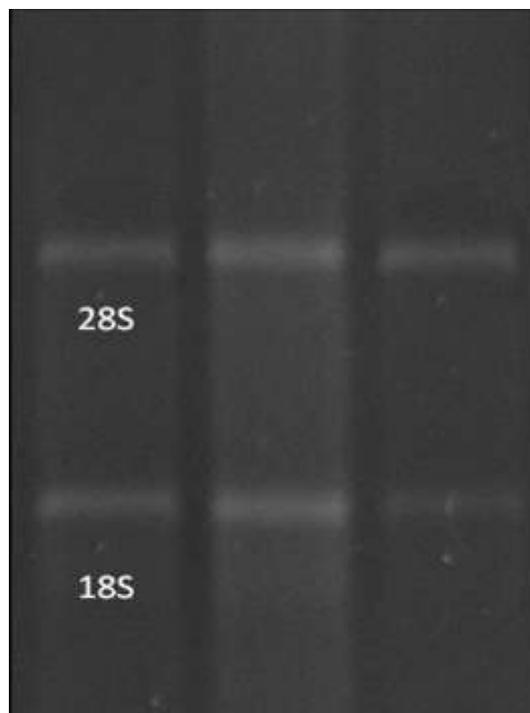
Quantità di latte (ml)	500	300	150	150
Tempo di estrazione dal prelievo (h)	4	4	4	24
N° di campioni	15	15	15	15
SCC ($\times 10^3$)	95 \pm 31.5	96 \pm 31.4	97.4 \pm 31.9	98 \pm 30.6
RNA (μ g/ml)	220 \pm 46.7	130 \pm 45.7	73.5 \pm 30.1	68 \pm 33.8
Totale di RNA (μ g)	11 \pm 3.1	6.5 \pm 2.6	3.7 \pm 1.5	3.4 \pm 1.4

Il numero di cellule somatiche è risultato inferiore nei campioni di latte del primo prelievo rispetto a quello riscontrato nel secondo prelievo.

Le diverse quantità di latte utilizzate per l'estrazione: 500, 300 e 150 ml, hanno fornito una resa di RNA all'estrazione decrescente. Tuttavia 150 ml di campione di latte forniscono una quantità di RNA abbastanza elevata per poter affrontare studi di espressione genica nella mammella.

La migrazione elettroforetica dell'RNA ha mostrato due bande distinte e chiaramente visibili, una di 28S e l'altra di 18S, privo di contaminazione da DNA genomico (Figura 15). La purezza del RNA estratto è stata misurata attraverso il biofotometro a UV: il rapporto A260/A280 era inferiore a 1.9, il rapporto A260/A230 era intorno a 2.2 per tutti i campioni.

Figura 15. Elettroforesi di RNA in gel denaturante al 1,5%.



Dall'analisi statistica è emerso che la quantità dell'RNA totale estratto era correlata positivamente con il numero di cellule somatiche di ciascun campione ($p < 0.001$) (Tabella 4).

Inoltre non è stata trovata una correlazione tra la produzione di latte e l'RNA totale estratto, né tra la produzione di latte e la conta delle cellule somatiche (Tabella 4).

Tabella 4. Correlazione tra i valori di SCC, produzione di latte e concentrazione di RNA.

	Concentrazione RNA	SCC
Milk yield	R=0.18	R=0.16
SCC	R=0.73***	

***=P<0,001

Risultati seconda fase

La quantità di latte prodotta da ciascun animale è risultata sostanzialmente diversa e non correlata con la concentrazione dei diversi parametri analizzati. Infatti, la concentrazione di grasso, proteine e lattosio sono risultate piuttosto differenti tra i diversi animali. La produzione media di latte è risultata superiore a 1000 g; il grasso e le proteine hanno presentato concentrazioni superiori al 6 % (Tab. 5).

L'estrazione dell'RNA è avvenuta secondo il metodo messo appunto nella prima fase e qualità e quantità di RNA sono risultate uguali nelle due sessioni di analisi. La sequenza del cDNA ottenuto comprendeva, come previsto, l'ultima parte dell'esone 16 e l'inizio dell'esone 17 del gene SREBPF1. Inoltre è stato amplificato lo stesso segmento del gene anche da DNA genomico per stimare la corrispondenza. I prodotti di amplificazione dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio si presentavano come una singola banda di 67-bp, per il cDNA e di 514bp per il DNA genomico(Figura 16). Tale differenza è dovuta alla presenza di parti non codificanti nell'amplificato del DNA genomico.

Tabella 5. Quantità di latte prodotta, concentrazione di grasso, proteine e lattosio in 20 pecore analizzate.

Soggetto	Produzione (gr)	Grasso (%)	Proteine (%)	Lattosio (%)
1	1342	5.33	6.84	4.97
2	1339	4.93	5.80	5.19
3	1354	5.84	6,90	4.47
4	1553	6.13	6.56	5.17
5	1262	5.85	5.94	5.02
6	854	5.93	5.97	4.85
7	977	6.81	6.51	5.09
8	1315	6.06	6.00	4.82
9	1051	6.04	6.29	4.90
10	780	7.13	8.33	4.97
11	943	6.10	6.27	5.05
12	1217	7.58	6.59	5.07
13	974	7.52	7.05	4.98
14	1034	5.11	7.01	5.24
15	811	5.37	6.69	4.88
16	1303	4.78	5.96	5.20
17	2282	5.50	5.22	5.21
18	991	7.06	6.10	5.15
19	1315	5.80	6.60	5.11
20	725	6.03	5.91	5.27
mean	1171	6.05	6.43	5.03
sd	±349.2	±0.8	±0.6	±0.2

Figura 16. Corsa elettroforetica in gel d'agarosio al 1,5% del prodotto di PCR di SREBP-1 utilizzando DNA genomico e cDNA ottenuto dall'RNA estratto dai campioni di 150ml di latte. *Fila 1 e 2:* DNA genomico (514bp); *Fila 3:* Marker DNA 100bp; *Fila 4:* cDNA (67bp).



Dall'allineamento del segmento amplificato con la sequenza depositata in banca dati di SREBPF1 della capra (GenBank accession number DQ483057.1) o del bovino (GenBank accession number GQ477182) non sono emerse differenze (Figura 17 e 18).

Figura 17. Allineamento della sequenza del DNA genomico.

```

Ovis aries      CCAGCTGACAGCTCCATTGACAAGGTAAGGGCTGGGGCCGGGGCCCTGGCCCATCTCAGG
Capra hircus   CCAGCTGACAGCTCCATTGACAAGGTAAGGGCTGGGGCCGGGGCCCTGGCCCATCTCAGG
Bos taurus     CCAGCTGACAGCTCCATTGACAAGGTAAGGGCTGGGGCCGGGGCCCTGGCCCATCTCAGG
*****

Ovis aries      GGCCTTGGCCTTTTCCACTCCCTGGATGGTCCCCCTTGGGCTGCAGAAGACTGCAGGGTCA
Capra hircus   GGCCTTGGCCTTTTCCACTCCCTGGATGGTCCCCCTTGGGCTGCAGAAGACTGCAGGGTCA
Bos taurus     GGCCTTGGCCTTTTCCACTCCCTGGATGGTCCCCCTTGGGCTGCAGAAGACTGCAGGGTCA
*****

Ovis aries      GCCAACAGCACAGGACGGGTGACCAGCCGGCCTTGCCCTTCTGGCAAAGGCTTGGGTCCAG
Capra hircus   GCCAACAGCACAGGACGGGTGACCAGCCGGCCTTGCCCTTCTGGCAAAGGCTTGGGTCCAG
Bos taurus     GCCAACAGCACAGGACGGGTGACCAGCCGGCCTTGCCCTTCTGGCAAAGGCTTGGGTCCAG
*****

Ovis aries      GGGAGAGTGGCTGCTCCCTCTGGCCTCAGTGTGCCCCCCCCAGGAGGAGGGTGGGGTGA
Capra hircus   GGGAGAGTGGCTGCTCCCTCTGGCCTCAGTGTGCCCCCCCCAGGAGGAGGGTGGGGTGA
Bos taurus     GGGAGAGTGGCTGCTCCCTCTGGCCTCAGTGTGCCCCCCCCAGGAGGAGGGTGGGGTGA
*****

Ovis aries      ACATGTGGCAGGGCCCTCCTTGGAGGCTGCCGCGCAGGCCGGTGGGGGCATGGGGGCCG
Capra hircus   ACATGTGGCAGGGCCCTCCTTGGAGGCTGCCGCGCAGGCCGGTGGGGGCATGGGGGCCG
Bos taurus     ACATGTGGCAGGGCCCTCCTTGGAGGCTGCCGCGCAGGCCGGTGGGGGCATGGGGGCCG
*****

Ovis aries      GAGAGCGGGCGGCCCCGCGGTGCATTGCTGTTGCATTGCATGTGTGAGGCAGGTGCAGTG
Capra hircus   GAGAGCGGGCGGCCCCGCGGTGCATTGCTGTTGCATTGCATGTGTGAGGCAGGTGCAGTG
Bos taurus     GAGAGCGGGCGGCCCCGCGGTGCATTGCTGTTGCATTGCATGTGTGAGGCAGGTGCAGTG
*****

Ovis aries      CCTCGGCAGTGCAGCCCCGAGCCGGCCCCCTGGCACCGCGGGCCCCCAGCCTTCTCTCCA
Capra hircus   CCTCGGCAGTGCAGCCCCGAGCCGGCCCCCTGGCACCGCGGGCCCCCAGCCTTCTCTCCA
Bos taurus     CCTCGGCAGTGCAGCCCCGAGCCGGCCCCCTGGCACCGCGGGCCCCCAGCCTTCTCTCCA
*****

Ovis aries      CAGCCAGAGGCCCTGACCCCTGCCCTGCCCTGCCCTACCCACCACCCCCAGGCCATGCAG
Capra hircus   CAGCCAGAGGCCCTGACCCCTGCCCTGCCCTGCCCTACCCACCACCCCCAGGCCATGCAG
Bos taurus     CAGCCAGAGGCCCTGACCCCTGCCCTGCCCTGCCCTACCCACCACCCCCAGGCCATGCAG
*****

Ovis aries      CTGCTCCTGTGTGACCTGCTCCTTGTGGCGCGCA
Capra hircus   CTGCTCCTGTGTGACCTGCTCCTTGTGGCGCGCA
Bos taurus     CTGCTCCTGTGTGACCTGCTCCTTGTGGCGCGCA
*****

```


Tabella 6. Media (\pm SD) dei due prelievi per ciascuna pecora di SCC, concentrazione di RNA e resa dell'RNA totale estratto da 150ml di latte, e Ct value nella pecora di razza sarda.

Campione	SCC (x 10 ³)	RNA (μ g/ml)	total RNA (μ g)	Ct value
1	92	68.5	3.4	26.7 \pm 0.12
2	97	68.8	3.4	26.7 \pm 0.18
3	122	94.0	4.7	27.1 \pm 0.16
4	77	42.0	2.1	26.9 \pm 0.20
5	86	74.3	3.7	27.1 \pm 0.15
6	83	45.0	2.3	26.8 \pm 0.17
7	86	47.6	2.4	26.8 \pm 0.15
8	63	46.0	2.3	26.4 \pm 0.13
9	98	116.0	5.8	26.8 \pm 0.19
10	71	47.0	2.4	27.0 \pm 0.12
11	150	90.1	4.5	26.9 \pm 0.19
12	162	84.0	4.2	26.7 \pm 0.20
13	64	42.0	2.1	26.8 \pm 0.12
14	64	52.0	2.6	26.9 \pm 0.15
15	81	44.0	2.2	26.7 \pm 0.17
16	114	135.0	6.8	26.9 \pm 0.11
17	68	65.0	3.3	26.9 \pm 0.16
18	82	71.0	3.6	26.8 \pm 0.14
19	122	106.0	5.3	26.8 \pm 0.18
20	165	132.0	6.6	26.8 \pm 0.11
Mean	97.4	73.5	3.7	26.7 \pm 0.12

La tabella 7 mostra la media dei valori in percentuale degli acidi grassi del latte, nei due prelievi,. I risultati evidenziano che nel latte della pecora di razza Sarda l'acido grasso più rappresentato è quello palmitico (C16:0) tra quelli saturi, l'acido oleico (C18:1) tra i monoinsaturi e l'acido linoleico (C18:2) tra i polinsaturi. La quantità di acidi grassi inoltre subisce poche variazioni tra i due prelievi effettuati.

Tabella 7. Composizione dello spettro acidico nei due prelievi effettuati nella pecora di razza Sarda.

Acido Grasso	media 1° prelievo	media 2° prelievo
C:4	0,00	0,01
C 6	0,09	0,53
C 8	1,14	1,50
C 10	7,24	8,74
C 11	0,01	0,13
C 12	4,09	5,40
C 13	0,59	0,05
C 14	12,18	13,24
C 15	2,43	1,49
C 16	26,86	29,74
C 17	0,71	0,78
C 18	12,36	9,64
C 20	0,29	0,20
C 21	0,14	0,09
C 22	0,20	0,10
C 23	0,09	0,06
C 24	0,03	0,04
C 14 1	0,17	0,32
C 15 1	0,00	0,00
C 16 1	1,12	1,13
C 17 1	0,58	0,14
C 18 1 T	4,84	3,53
C 18 1 C	19,58	17,46
C 20 1	0,01	0,07
C 22 1	0,00	0,00
C 24 1	0,01	0,01
C 18 2 Tn6	0,74	0,44
C 18 2 Cn6	1,66	1,86
C 18 3n6	0,00	0,01
C 18 3n3	1,13	1,17
C 20 2	0,04	0,03
C 20 3n6	0,00	0,01
C 20 3n3	0,00	0,00
C 20 4n6	0,11	0,08
C 22 2	0,09	0,05
C 20 5n3	0,03	0,02
C 22 6n3	0,01	0,04
CLA 9-11	1,43	1,65
CLA 10-12	0,00	0,00

Le tabelle 8 e 9 riportano i valori in percentuale nel latte delle diverse classi di acidi grassi, della concentrazione dei grassi, proteine, lattosio, della CCS e del fold change relativo all'espressione del gene SREBP-1 nei due prelievi effettuati.

Tabella 8. Concentrazione nel latte degli acidi grassi saturi, insaturi, mono e poli insaturi, CLA, delle produzioni e della % di grassi, proteine, lattosio, del numero di Cellule Somatiche e il fold change del gene SREBP-1 nel latte di pecora Sarda.

camp	saturi	insaturi	Mono	poli	CLA	Prod.gr	grasso%	Prot%	Latt,%	SCC	srebp
1	66,84	20,52	16,14	4,38	1,24	1342	5,3	6,8	5,0	92,0	1,15
2	71,52	20,73	18,12	2,61	1,62	1339	4,9	5,8	5,2	64,0	1,25
3	67,93	28,70	24,69	4,02	1,53	1354	5,8	6,9	4,5	97,0	1,68
4	67,67	22,36	19,09	3,26	1,52	1009	5,9	6,1	4,8	88,0	1,48
5	64,21	31,60	26,93	4,67	1,68	1553	6,1	6,6	5,2	47,0	1,69
6	65,38	28,36	25,28	3,08	1,88	1262	5,9	5,9	5,0	69,0	1,37
7	61,65	30,76	27,53	3,22	2,06	854	5,9	6,0	4,9	35,0	2,01
8	68,91	25,55	22,48	3,07	1,39	1315	6,1	6,0	4,8	73,0	1,89
9	65,19	24,16	21,45	2,72	1,49	780	7,1	8,3	5,0	66,0	1,14
10	66,10	25,05	22,23	2,82	2,65	1217	7,6	6,6	5,1	53,0	1,00
11	68,63	21,18	18,39	2,80	0,98	1121	6,0	6,6	4,8	91,0	1,96
12	64,88	20,08	24,75	3,33	1,49	974	7,5	7,1	5,0	68,0	1,75
13	62,95	29,86	24,70	5,15	2,04	1034	5,1	7,0	5,2	88,0	1,69
14	68,81	24,55	22,38	3,16	1,44	1056	6,0	6,5	4,7	94,0	1,27
15	64,19	24,23	22,45	3,02	1,39	1084	6,2	6,4	4,8	89,0	1,49
16	66,20	25,65	22,44	2,92	1,65	1230	6,2	6,6	5,0	94,0	2,08
17	69,33	22,18	20,39	2,84	1,80	1198	6,4	6,8	4,7	93,0	1,46
18	65,81	26,15	23,07	3,64	1,50	1184	5,9	6,9	5,0	93,0	1,58
19	62,75	21,86	23,99	4,15	2,15	1067	5,8	6,8	5,0	87,0	1,07
20	67,53	27,70	24,88	3,92	1,63	1361	5,7	7,0	4,3	95,0	1,04

Tabella 9. Concentrazione degli acidi grassi saturi, insaturi, mono e poli insaturi, CLA, delle produzioni e della concentrazione di grassi, proteine, lattosio, del numero di Cellule Somatiche e il fold change del gene SREBP-1 nel latte di pecora Sarda.

camp	saturi	insaturi	Mono	poli	CLA	Prod.gr	grasso%	Prot%	Latt,%	SCC	srebp
1	70,01	28,22	26,34	4,01	1,37	1326	5,4	6,7	4,9	95,0	1,20
2	69,86	28,60	22,95	5,65	1,46	1289	4,7	5,9	5,4	82,0	1,24
3	68,84	28,15	24,87	4,56	1,28	1321	5,5	6,8	4,8	91,0	1,58
4	72,49	26,22	22,90	3,33	1,29	1112	5,6	6,3	4,7	92,0	1,49
5	69,41	28,80	24,77	4,03	1,80	1629	6,3	6,4	5,2	84,0	1,65
6	67,66	27,54	25,90	4,61	1,57	1354	6,2	5,8	5,2	75,0	1,38
7	67,48	27,10	26,40	4,42	1,34	1003	6,0	5,9	4,6	45,0	0,89
8	69,75	28,98	25,90	3,08	1,29	1425	6,2	6,0	4,9	80,0	1,99
9	66,47	33,37	29,22	4,15	1,16	880	6,9	6,5	5,3	59,0	1,29
10	67,35	30,47	27,84	4,31	1,28	1187	7,6	6,7	5,2	68,0	1,00
11	66,56	32,10	28,53	3,58	1,39	1154	6,5	6,8	4,7	84,0	1,87
12	68,12	30,25	27,12	4,67	1,16	980	7,4	7,0	4,7	61,0	1,86
13	63,16	34,81	31,19	4,25	2,03	1024	5,9	6,8	5,0	74,0	1,80
14	70,18	28,77	25,47	3,30	1,05	1028	5,8	6,7	4,8	86,0	1,38
15	69,38	29,58	26,50	3,95	1,10	1099	6,1	6,5	4,6	79,0	1,39
16	74,19	24,91	21,36	3,54	0,95	1369	6,3	6,9	4,9	88,0	1,88
17	67,40	30,58	27,59	2,99	2,02	1254	6,6	6,7	4,8	81,0	1,47
18	70,27	28,92	25,28	3,64	0,80	1203	5,8	6,8	4,9	84,0	1,68
19	66,58	91,95	28,41	3,54	1,49	1049	6,0	7,0	5,0	79,0	0,91
20	64,62	33,58	28,35	5,23	1,80	1374	6,4	6,9	4,5	88,0	1,19

Tra i due prelievi non sono state registrate differenze tra gli animali per le diverse categorie degli acidi grassi.

Il rapporto tra gli acidi grassi saturi e insaturi presenta un leggero cambiamento, anche se non significativo, tra i due prelievi (Tabella 10). Gli indici di desaturazione risultano quasi uguali tra i due prelievi se si esclude quello tra C14:1/C14:0, dove si è registrata una leggera variazione al limite della significatività ($P < 0.058$) (Tabella 10). Anche per quanto riguarda l'indice aterogenetico (AI) non si è registrata alcuna variazione tra i due prelievi.

Tabella 10. Rapporto tra acidi grassi saturi e insaturi, indice di desaturazione e l'indice aterogenetico.

	I° Prelievo	II° Prelievo
Saturi/Insaturi	2,55	2,25
coeff satur 14:1/14	0,014	0,024
coeff satur 16:1/16	0,042	0,038
coeff satur 18:1/18	1,976	2,177
AI	3,06	2,90

Nelle tabelle 11 e 12 sono riportate le correlazioni tra l'espressione del gene SREBP-1, gli acidi grassi saturi, insaturi, monoinsaturi, polinsaturi, CLA, rapporto saturi/insaturi, il grasso prodotto, la concentrazione del grasso, il lattosio e le proteine nei due prelievi analizzati.

Dall'analisi statistica è risultato, in entrambi i prelievi, che l'espressione del gene SREBP-1 è altamente correlata ($P < 0,001$) con la quantità di grasso prodotta. Invece non si è riscontrata nessuna associazione tra le concentrazioni del grasso e l'espressione del gene suddetto. Inoltre non sono state trovate relazioni tra le diverse classi di acidi grassi e l'espressione genetica del gene SREBP-1 e, tra quest'ultima e i restanti parametri del latte, analizzati in entrambi i prelievi.

Tabella 11. Correlazioni nei due prelievi tra l'espressione del gene (espresso in fold change) e la produzione di grasso giornaliera, la concentrazione del grasso, delle proteine e del lattosio.

	Fat yield	%fat	%prot	%latt
Fold change I prelievo	0,56***	-0,03	-0,25	0,05
Fold change II prelievo	0,54***	-0,01	-0,11	-0,32

***= $P < 0,001$

Tabella 12. Correlazioni nei due prelievi tra l'espressione del gene (espresso in fold change) e i grassi saturi, insaturi, monoinsaturi, polinsaturi, CLA e il rapporto saturi/insaturi.

	saturi	insaturi	monoinsaturi	polinsaturi	CLA	saturi:insaturi
Fold change I prelievo	-0,12	0,27	0,25	-0,02	-0,29	-0,24
Fold change II prelievo	0,26	0,35	-0,27	-0,26	-0,14	0,42

DISCUSSIONE

Uno degli obiettivi fondamentali di questo studio era quello di trovare un metodo di estrazione dell'RNA dal latte ovino. Questo è stato messo a punto e si è mostrato affidabile, ripetibile e di veloce esecuzione. Inoltre, la metodica utilizzata mostra che 150 ml di latte sono sufficienti per ottenere un'elevata quantità e qualità di RNA. Infatti la media di concentrazione dell'RNA ottenuta è di 70µg/ml molto più alta di quanto riportato da Murrieta et al., (2006). Questi Autori utilizzando 200 ml di latte bovino ottenevano 20µg/ml di RNA. Invece, Boutinaud et al., (2002), da 300 ml di latte di capra ottenevano una concentrazione di 1,2µg/ml di RNA che risulta molto più bassa di quanto ottenuto nel presente studio.

Le differenze nella quantità di RNA ottenuta nelle diverse specie animali potrebbero dipendere da diversi fattori. In primo luogo, il metodo di estrazione utilizzato nel presente studio era diverso da quello usato dagli autori sopra citati e questo potrebbe avere condizionato la resa. In secondo luogo, la quantità di RNA estratto è risultata direttamente correlata al numero di cellule somatiche del latte e questo si accorda con quanto riscontrato da Boutinaud et al., (2002). Infatti nel latte bovino Murrieta et al., (2006) hanno trovato una media di cellule somatiche di 22.000 cellule/ml, che giustifica la minore concentrazione di RNA estratto.

Nelle capre solitamente il numero di cellule somatiche nel latte è molto variabile; Dulin et al., (1983) e Boutinaud et al., (2002), nel loro studio hanno trovato una media di 50.000 cellule/ml di latte, che è al limite

inferiore per quanto riguarda il latte di capra (Boutinaud e Jammes, 2002; Paape et al., 2007). I livelli più alti di cellule somatiche nella capre hanno sicuramente influenzato la quantità di RNA ottenuto dal latte in questa specie rispetto a quello ottenuto dal latte bovino. Nel presente studio i livelli di cellule somatiche riscontrate erano mediamente di 97.000/ml e questo ha portato a una quantità di RNA estratto superiore rispetto alle bovine e alle capre. Tuttavia, rispetto a quanto ottenuto da Boutinaud et al., (2002), nelle capre si attendeva una quantità doppia di RNA estratto, in quanto il numero di cellule somatiche da noi riscontrato nelle pecore era il doppio; la quantità di RNA ottenuto nel presente studio invece è risultata molto più elevata. Questo fatto non fa altro che confermare che il metodo messo a punto è estremamente preciso e garantisce una resa molto efficiente.

Infine la temperatura durante il trasporto dei campioni al laboratorio e il tempo che intercorre tra il campionamento e l'analisi può aver influenzato le diverse quantità di RNA ottenute nelle altre ricerche rispetto al presente studio.

Di conseguenza, le cellule somatiche del latte forniscono una quantità di RNA sufficiente per lo studio dell'espressione dei geni mammari negli ovini. L'utilizzo del latte per ottenere l'RNA presenta sicuramente alcuni vantaggi di indubbia importanza. Il primo è che non si creano lesioni alla mammella per ottenere cellule tissutali indispensabili per l'estrazione di RNA. Il secondo vantaggio è che non si compromette la funzionalità dell'organo, infatti, anche se la ferita per ottenere cellule del parenchima

mammario è molto piccola, potrebbe essere una via d'ingresso per germi che possono arrecare danno alla mammella. Altro vantaggio deriva dalla possibilità di fare prelievi ripetuti per lo studio di espressione dei geni mammari senza causare problemi all'animale. Infine questo metodo salvaguarda il benessere animale in quanto evita qualsiasi intervento traumatico su di esso.

La retro trascrizione e la PCR da cDNA, utilizzando primer specifici del gene SREBP-1, ha confermato che l'RNA che abbiamo ottenuto da latte intero è eccellente nella qualità e quantità. Inoltre il confronto dell'RNA estratto nel presente studio e quello ottenuto dall'estrazione dalle cellule mammarie di bovino non si riscontrano grandi differenze (Bionaz e Loor, 2007; Feng et al., 2007).

L'allineamento delle sequenze ottenute sia del cDNA che del DNA genomico con le sequenze bovine e caprine, depositate in banca dati, non ha mostrato differenze. Questo fatto lascia intuire che questo tratto di gene sia ben conservato, in quanto assolve ad una funzione molto importante nella regolazione della secrezione degli acidi grassi.

Un altro obiettivo principale è stato quello di rilevare l'espressione del gene SREBP-1 nella ghiandola mammaria durante l'inizio della lattazione utilizzando le cellule somatiche come fonte di RNA. I risultati ottenuti mostrano che nell'ovino il gene è altamente espresso; questo suggerisce che anche nella pecora da latte il gene SREBP-1 svolge un ruolo importante nella secrezione di grasso nel latte. Infatti la sintesi e la

secrezione di grasso nel latte dalla ghiandola mammaria comporta una integrazione di diversi processi biochimici coordinati da diversi geni lipogenici (Liang et al., 2002; Horton et al., 2003b). Il gene SREBP-1 è altamente espresso nella ghiandola mammaria bovina in lattazione e molti degli enzimi chiave coinvolti nella lipogenesi sono regolati da SREBP-1 (Bionaz e Loor, 2008b). Nei topi, all'inizio della lattazione, l'espressione del gene SREBP-1 risulta aumentata e l'inattivazione di questo gene determina una diminuzione del 41% della concentrazione di grasso del latte (Rudolph et al., 2007).

I livelli di espressione del gene SREBP-1 osservati nel presente studio possono essere confrontati solo con quelli osservati nei bovini (Bionaz e Loor, 2008b), poiché non ci sono ricerche di espressione mammaria di questo gene in pecore durante la lattazione. L'espressione del gene SREBP-1 osservata a 30 giorni negli ovini di razza Sarda è maggiore di quella riscontrata a 30 giorni di lattazione nelle bovine (Bionaz e Loor, 2008). Considerando che le bovine producono una quantità giornaliera di grasso nel latte superiore rispetto alla pecora, l'aspettativa di questo studio era che l'espressione di questo gene fosse maggiore nel bovino rispetto all'ovino. Tuttavia, la concentrazione di grasso nel latte della pecora di razza Sarda è circa il doppio rispetto al latte del bovino e questo può aver portato ad una maggiore espressione di SREBP-1 nell'ovino..

I risultati della presente ricerca suggeriscono anche che il gene SREBP-1 sia indispensabile per l'elevata sintesi dei lipidi nella ghiandola

mammaria della pecora. Infatti una più elevata espressione del gene SREBP-1 è stata trovata in pecore che producono la maggiore quantità di grasso (g/die). Questo gene controlla la sintesi di nuovi acidi grassi nella ghiandola mammaria, e il picco di nuova sintesi di questi lipidi come si riscontra nelle bovine, partendo da acetato e butirrato, si osserva intorno a 30 giorni di lattazione (Bionaz e Looor, 2008b). Pertanto, si potrebbe ipotizzare che anche nella pecora la maggiore sintesi ex novo degli acidi grassi nel latte si verifichi nello stesso periodo determinando gli alti valori di espressione del gene SREBP-1 all'inizio della lattazione.

I risultati ottenuti in questo studio non hanno mostrato relazioni tra l'espressione del gene SREBP-1 e la concentrazione di grasso nel latte nonostante gli animali tra loro presentassero differenze nella percentuale di grasso nel latte. Infatti nello studio erano comprese pecore con una concentrazione di grasso del 4,73% e altre del 7,13%. Questo suggerisce che l'elevata espressione del gene SREBP-1 è necessaria per la produzione del grasso nel latte, ma la regolazione della concentrazione di grasso è probabilmente dovuta all'intervento di altri geni che sono coinvolti nella captazione e nella sintesi dei lipidi. Infatti, questo gene influenza l'espressione di diversi geni che sono coinvolti nella captazione dei grassi dal circolo ematico, nella sintesi dei trigliceridi e nella sintesi ex novo dei grassi (Bionaz e Looor 2008 a e b). A sua volta il gene SREBP viene regolato da altri geni che stimolano la sua espressione in base alla quantità di lipidi presenti all'interno della cellula (Dong e Tang, 2010). Da ciò si può

ipotizzare che questo gene sovrintenda l'avvio della sintesi lipidica nel suo complesso e tuttavia siano presenti altri meccanismi regolatori dell'espressione del singolo gene che possano influenzare la concentrazione del grasso nel latte.

I costituenti del latte analizzati nel presente studio presentano i valori che comunemente si riscontrano nella pecora di razza Sarda (Mura et al., 2013).

Infatti, si riscontrano alte concentrazioni di grasso e di proteine che sono caratteristiche di questa razza.

Lo spettro acidico ha mostrato, come aspettato, un'elevata percentuale di acidi grassi saturi rispetto a quelli insaturi. I livelli riscontrati si discostano di poco da quanto riportato da Cabiddu et al., (2005) sempre nella pecora Sarda. Tali differenze potrebbero essere legate alle diverse essenze pascolative, come anche questi ultimi AA hanno dimostrato o, al diverso apporto di concentrati e di pascolo messo a disposizione degli animali (Tsiplakou e Zervas, 2008). Infatti questi ultimi AA riscontrarono che gli animali alimentati esclusivamente con fieno e concentrati presentavano alte concentrazioni degli acidi grassi da C:6 a C:14 e basse di quelli a più lunga catena e questo rapporto si invertiva con l'alimentazione al pascolo.

Tuttavia i valori riscontrati nella presente ricerca risultano alquanto differenti, per diversi acidi grassi, rispetto a quanto osservato in altre razze alimentate al pascolo e tale fatto potrebbe essere riconducibile ad una

differenza di razza (Tsiplakou e Zervas , 2008). I valori degli acidi grassi monoinsaturi, polinsaturi e dei CLA sono quasi simili a quanto riscontrato da (Cabiddu et al., 2005) in animali che venivano alimentati al pascolo con erbe in fase fenologica differente. Le uniche differenze con questi ultimi AA sono da ascrivere alla diversa fase di crescita delle essenze pascolative (Cabiddu et al., 2005). Invece i valori riscontrati in razze ovine diverse da Tsiplakou e Zervas, (2008) differiscono da quanto osservato in questo studio sia per quanto riguarda gli acidi grassi saturi che per quelli mono e poli insaturi. Queste differenze sono di difficile spiegazione in quanto gli ovini dello studio sopra citato avevano concentrazioni di grasso nel latte elevato (circa 8%) e questo potrebbe essere dovuto al differente regime alimentare.

La concentrazione riscontrata in questa ricerca per i CLA non raggiunge la dose che dovrebbe essere introdotta con l'alimento dall'uomo per ottenere effetti benefici sulla sua salute. Infatti, sono evidenti questi effetti quando viene somministrato almeno una quantità pari o superiori a 0,8 g/die di CLA con una riduzione del colesterolo LDL (Pintus et al., 2013). Tuttavia per ottenere gli effetti anti tumorali e anti arteriosclerosici si devono somministrare quantità più alte superiori ai 3 g/die (Dhiman et al., 2005). Pertanto, anche se l'apporto di CLA non è sufficiente, il latte o i prodotti derivati da esso, può fornire comunque una quota importante di questi acidi grassi alla dieta dell'uomo.

Il rapporto saturi/insaturi si accorda con quanto riscontrato in diverse razze di ovini e le piccole differenze sono legate alla dieta fornita agli

animali (Nudda et al., 2006; Tsiplakou e Zervas, 2013). Inoltre il rapporto è sbilanciato verso gli acidi saturi come aspettato in quanto il latte ovino ne è ricco.

L'indice di desaturazione è risultato in accordo con quanto riscontrato sia negli ovini di razza Sarda che in altre razze Europee (Cabiddu et al., 2005; Tsiplakou e Zervas, 2008, 2013). Tuttavia gli indici di desaturazione riscontrati nella presente ricerca risultano differenti con quanto osservato nelle bovine da Mele et al., (2009). La maggiore differenza si riscontra con il rapporto tra C18:1/C18:0, infatti nel presente lavoro risulta essere circa doppio rispetto a quanto osservato nelle bovine, e tale discrepanza, è dovuta all'elevata quantità degli acidi C18:1 rispetto a quelli C18:0. Tuttavia il miglior indicatore della attività di desaturazione è il rapporto tra C14:1/C14:0 in quanto il C14:0 è il prodotto di nuova sintesi della mammella mentre gli altri possono essere assorbiti dal circolo ematico. Infatti questo indicatore nelle bovine risulta correlato alla quantità di CLA presente nel latte (Lock e Garnsworthy, 2003). Tuttavia nella presente ricerca non è stata riscontrata nessuna relazione tra questo indice e il quantitativo di CLA presente nel latte.

Il valore dell'indice aterogenetico riscontrato è abbastanza alto rispetto a quello che si riscontra nella carne di agnelli di razza Sarda e nel latte di ovini di altre razze Europee. Tale valore indica che il latte ovino ha una bassa quantità di acidi mono e polinsaturi. Questo fatto conferma che molti dei prodotti di origine animale hanno un'elevata presenza di acidi

grassi saturi e, se assunti in modo sconsiderato, possono essere dannosi per l'uomo (Williams e Stanko, 2000). Malgrado ciò i prodotti lattiero caseari forniscono altre molecole con caratteristiche utili alla salvaguardia della salute umana.

CONCLUSIONI

Alla luce dei dati raccolti e analizzati in questo studio, è stato possibile mettere a punto, anche negli ovini, un metodo per l'estrazione dell'RNA dal latte. È stato verificato che 150 ml di campione di latte con un numero medio di cellule somatiche inferiore a 100.000 sono sufficienti ad ottenere una buona resa all'estrazione. I campioni analizzati a 4 ore dal prelievo non hanno mostrato sostanziali differenze rispetto agli stessi processati dopo 24 ore, per quanto concerne le caratteristiche qualitative e quantitative dell'RNA estratto. Pertanto il metodo si è dimostrato di facile esecuzione, affidabile ed efficiente, poiché fornisce una ottima qualità e quantità di RNA.

Attraverso questo stesso metodo in futuro sarà possibile studiare l'espressione dei geni del tessuto mammario in diverse fasi della lattazione senza determinare lesioni alla struttura. Questo procedimento garantisce infatti il rispetto del benessere animale ed evita possibili vie di accesso ai germi patogeni che potrebbero danneggiare la funzionalità dell'organo.

Partendo dall'RNA estratto dalle cellule somatiche del latte, con la tecnica messa a punto in questo studio, è stato possibile quantificare, per la prima volta nell'ovino, l'espressione del gene SREBP-1, che ha mostrato una relazione diretta con la quantità di grasso prodotta giornalmente dalla pecora di razza Sarda nelle prime fasi della lattazione; tuttavia, le differenti classi di acidi grassi non sono risultate essere in relazione con l'espressione del gene studiato.

I dati relativi allo spettro acidico del latte hanno confermato che, negli ovini di razza Sarda, tra la componente lipidica è presente un elevato livello di acidi grassi saturi ma che, d'altra parte, il latte può fornire una discreta quota di CLA alla dieta dell'uomo.

Gli importanti risultati raggiunti in questa ricerca costituiscono un punto di partenza per ulteriori studi di espressione di diversi geni implicati nella sintesi delle componenti del latte, al fine di chiarire il complesso meccanismo di sintesi dei vari costituenti.

Lo studio dell'espressione dei geni INSIG, SCAP e PPARG e la relazione tra questi e SREBP potrebbe chiarire i meccanismi di attivazione della sintesi dei lipidi nella mammella. Indagare anche sulle relazioni esistenti tra l'espressione di questi geni pretrascrizionali e quelli coinvolti nella formazione degli acidi grassi insaturi potrebbe fornire informazioni utili al fine di migliorare la qualità del latte ovino.

Un ulteriore sviluppo per il futuro di questa ricerca potrebbe essere quello di studiare la sequenza dei geni allo scopo di evidenziare la presenza di mutazioni che possono essere legate alle differenti espressioni dei geni coinvolti nella sintesi degli acidi grassi mammari.

BIBLIOGRAFIA

- Allison MJ. (2002). Microrganismi del rumine dell'intestino tenue e dell'intestino crasso. In: *Fisiologia degli animali domestici* : Swenson MJ, Reece WO. Idelson Gnocchi, Napoli, pp 450-462.
- Barber MC, Clegg RA, Travers MT, Vernon RG. (1997). Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Bioch. Bioph. Acta* 1347: 101–126.
- Bauman DE, Davis CL. (1974). Biosynthesis of milk fat. In *Lactation: a comprehensive treatise*. Larson BL, Smith VR. (eds.). Academic Press, Inc., New York. vol. 2, pp. 31–75.
- Bauman DE, Griinari JM. (2001). Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livest. Prod. Sci.* 70:15–29.
- Bauman DE, Griinari JM. (2003). Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition* 23:203–227.
- Bauman DE, Harvatine KJ, Lock AL. (2011). Nutrigenomics, rumen-derived bioactive fatty acids, and the regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 31:299-319.
- Bauman DE, Mather IH, Wall RJ, Lock AL. (2006). Major advances associated with the biosynthesis of milk. *J. Dairy Sci.* 89:1235–1243.

- Bauman DE, Perfield JW, Harvatine KJ, Baumgard LH. (2008). Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: lactation and the ruminant model. *J. of Nutr.* 138:403–409.
- Bernard L, Leroux C, Chilliard Y. (2008). Expression and nutritional regulation of lipogenic genes in the ruminant lactating mammary gland. In: *Bioactive components of milk, advances in experimental medicine and biology*. Bosze Z. (ed.). Springer, New York, US. Vol. 606: pp. 67–108.
- Bionaz M, Loor JJ. (2007). Identification of reference genes for quantitative real-time PCR in the bovine mammary gland during the lactation cycle. *Physiol Genom* 29:312–319.
- Bionaz M, Loor JJ. (2008a). ACSL1, AGPAT6, FABP3, LPIN1, and SLC27A6 are the most abundant isoforms in bovine mammary tissue and their expression is affected by stage of lactation. *J. Nutr.* 138:1019–1024.
- Bionaz, M, Loor JJ. (2008). Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics* 9:366.
- Bist A, Fielding PE, Fielding CJ. (1997). Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10693–10698.

- Bitman J, Wood DL. (1990). Changes in milk fat phospholipids during lactation. *J. Dairy Sci.* 73:1208-1216.
- Blygh EG, Dyer WJ, (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian J. Biochem. Physio.* 37: 911-917.
- Bonanome A, Grundy SM. (1988). Effect of dietary steric acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *N. Engl. J. Med.* 318: 1244-1248.
- Boutinaud M, Jammes H. (2002). Potential uses of milk epithelial cells: a review. *Reprod. Nutr. Develop.* 42:133–147.
- Boutinaud M, Rulquin H, Keisler DH, Djiane J, Jammes H. (2002). Use of somatic cells from goat milk for dynamic studies of gene expression in the mammary gland. *J. Anim. Sci.* 80:1258–1269.
- Brown MS, Goldstein JL. (1999): A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:11041–11048.
- Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans, *Cell.* 100:391–398.
- Brunelli E. (2008). Le proteine del latte. *Il Latte* 10:78-80.

- Cabiddu A, Decandia M, Addis M, Piredda G, Pirisi A, Molle G. (2005). Managing Mediterranean pastures in order to enhance the level of beneficial fatty acids in sheep milk. *Small Rumin. Res.* 59:169–180.
- Cabiddu A, Decandia M, Molle G, Pinna G, Addis M, Spada S, Pirisi A, Piredda G. (2003). Effects of different pasture on CLA content in sheep milk and cheese. *Ital. J. Anim. Sci.* 2(Suppl.1):518–520.
- Cecchinato A, Ribeca C, Maurmayr A, Penasa M, De Marchi M, Macciotta NPP, Mele M, Secchiari P, Pagnacco G, Bittante G. (2012). Effects of β -lactoglobulin, stearoyl-coenzyme A desaturase 1, and sterol regulatory element binding protein gene allelic variants on milk production, composition, acidity, and coagulation properties of Brown Swiss cows 1. *J. Dairy Sci.* 95:450–454.
- Chilliard Y and Ferlay A. (2004). Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Repr. Nutr. Develop.* 44/5:467-492.
- Chilliard Y, Ferlay A, Mansbridge RM, Doreau M. (2000). Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Annales de Zootechnie*, 49: 181–205.
- Chilliard Y, Ferlay A, Rouel J, Lamberet G. (2003). A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *J. Dairy Sci.* 86:1751–1770.

- Cook ME, Miller CC, Park Y, Pariza MW. (1993). Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. *Poult. Sci.* 72:1301-1305.
- Daemen S, Kutmon M, Evelo CT. (2013). A pathway approach to investigate the function and regulation of SREBPs. *Genes Nutr.* 8:289–300.
- Demeyer D, Doreau M. (1999). Targets and means for altering meat and milk lipids, *Proc. Nutr. Soc.* 58:593–607.
- Dhiman TR, Nam SH, Ure AL. (2005). Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45:463-482.
- Doerge H, Stahl A. (2006). Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology*, 21:259–268.
- Dong XY, Tang SQ. (2010). Insulin-induced gene: a new regulator in lipid metabolism. *Peptides*, 31:2145-2150.
- Doreau M, Chilliard Y. (1997). Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. *British J. Nutr.* 78(suppl. 1):S15–S35.
- Dulin AM, Paape MJ, Berkow S, Hamosh M, Hamosh P. (1983). Comparison of total somatic cells and differential cellular composition in milk from cows, sheep, goats, and humans. *Fed. Proc.* 42:1331.

- Eberlè D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Fougelle F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86:839–848.
- Edwards PA, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A. (2000): Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta* 1529:103–113.
- Enjalbert F, Nicot MC, Bayourthe C, Moncoulon R. (1998). Duodenal infusions of palmitic, stearic or oleic acids differently affect mammary gland metabolism of fatty acids in lactating dairy cows. *J. Nutr.* 128:1525–1532.
- Feng S, Salter AM, Parr T, Garnsworthy PC. (2007). Extraction and quantitative analysis of stearyl-coenzyme A desaturase mRNA from dairy cow milk somatic cells. *J. Dairy Sci.* 90:4128-4136.
- Foretz M, Guichard C, Ferre P, Fougelle F. (1999b). Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2737–12742.
- Foretz M, Pacot C, Dugail I, Lemarchand P, Guichard C, Le Lièvre X, Berthelie-Lubrano C, Spiegelman B, Kim JB, Ferré P, Fougelle F. (1999a). ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol. Cell. Biol.* 19:3760-3768.

Genex. www.multid.se.

Givens DI, Shingfield KJ. (2006). Optimizing dairy milk fatty acid composition. In: Improving the fat content of foods. Williams C, Buttriss J. (eds.). Woodhead Publishing, Cambridge, UK. pp.252–280.

Glasser F, Ferlay A and Chilliard Y. (2008a). Oilseed lipid supplements and fatty acid composition of cow milk: a meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 91:4687–4703.

Glasser F, Ferlay A, Doreau M, Schmidely P, Sauvant D, Chilliard Y. (2008b). Long-chain fatty acid metabolism in dairy cows: a meta-analysis of milk fatty acid yield in relation to duodenal flows and de novo synthesis. *J. Dairy Sci.* 91:2771–2785.

Griinari JM, Bauman DE. (1999). Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In *Advances in conjugated linoleic acid research*. Yurawecz. MP, Mossoba MM, Kramer JKG, Pariza MW, Nelson GJ. (eds.). AOCS Press, Champaign, IL. vol. 1:pp. 180–200.

Griinari JM, Dwyer DA, McGuire MA, Bauman DE, Palmquist DL, Nurmela KV. (1998). Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:1251–1261.

- Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell*. 124:35–46.
- Harfoot CG. (1981). Lipid metabolism in the rumen. In: *Lipid Metabolism in Ruminant Animals*. W.W. Christie (ed.). Pergamon Press Ltd., Oxford, UK. pp. 21-55.
- Harfoot CG, Hazlewood GP. (1988). Lipid metabolism in the rumen. In *The rumen microbial ecosystem*. Hobson PN. (ed.). Elsevier Applied Science Publishers, London, UK. pp. 285–322.
- Harfoot CG, Hazlewood GP. (1997). Lipid metabolism in the rumen. In: Hobson P.N. and Stewart D.S. (eds.) *The Rumen Microbial Ecosystem (Second Edition)*. Chapman and Hall, London, UK. pp. 382-426.
- Harvatine KJ, Boisclair YR, Bauman DE. (2009). Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal* 3:40-54.
- Hawke TW, Taylor JC. (1995). Influence of nutritional factors on the yield, composition and physical properties of milk fat. In *Advanced dairy chemistry volume 2: lipids* Fox PF. (ed.), Chapman and Hall, London, UK. pp. 37–88.
- Hespell RB, O'Bryan-Shah PJ. (1988). Esterase activities in *Butyrivibrio fibrisolvens* strains. *Appl Environ. Microbiol.* 54:1917-1922.

- Hirano Y, Yoshida M, Shimizu M, Sato R. (2001). Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 276:36431–36437.
- Hirano Y, Murata S, Tanaka K, Shimizu M, Sato R. (2003). Sterol regulatory element-binding proteins are negatively regulated through SUMO-1 modification independent of the ubiquitin/26 S proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 278:16809–16819.
- Hornstra G. (1999). Lipids in functional foods in relation to cardiovascular disease. *Lipids*, 12:S456-S466.
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver, *J. Clin. Invest.* 109:1125–1131.
- Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, Goldstein JL. (2003a). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 100:12027–12032.
- Horton JD, Shimomura I, Ikemoto S, Bashmakov Y, Hammer RE. (2003b). Overexpression of SREBP-1a in mouse adipose tissue produces adipocyte hypertrophy, increased fatty acid secretion, and fatty liver. *J. Biol. Chem.* 278:36652–36660.

- Hua X, Sakai J, Ho YK, Goldstein JL, Brown MS. (1995b). Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection, *J. Biol. Chem.* 270: 29422–29427.
- Hua X, Wu J, Goldstein JL, Brown MS, Hobbs HH. (1995a) Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics.* 25:667-673.
- Huhtanen P, Sveinbjörnsson J. (2006). Evaluation of methods for estimating starch digestibility and digestion kinetics in ruminants. *Anim. Feed Sci. Tech.* 130/1-2:95-113.
- Irisawa M, Inoue J, Ozawa N, Mori K, Sato R. (2009). The sterolsensing endoplasmic reticulum (ER) membrane protein TRC8 hampers ER to Golgi transport of sterol regulatory element binding protein-2 (SREBP-2)/SREBP cleavage-activated protein and reduces SREBP-2 cleavage. *J. Biol. Chem.* 284:28995–29004.
- Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ, Mangelsdorf DJ. (1999). Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:266–271.

- Jenkins TC. (1993). Lipid metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 76:3851-3863.
- Jensen RG. (2002). The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000, *J. Dairy Sci.* 85:295-350.
- Kemp P and Lander DJ. (1984). Hydrogenation in vitro of alpha-linoleic acid to stearic-acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. *Journal of General Microbiology*, 130, 527-533.
- Kromhout D, Menotti A, Kesteloot H, Sans S. (2002). Prevention of coronary heart disease by diet and lifestyle: evidence from prospective cross-cultural, cohort, and intervention studies. *Circulation*, 105:893-898.
- Lee KN, Kritchevsky D, Pariza MW. (1994). Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*, 108/1:19-25.
- Lee SJ, Sekimoto T, Yamashita E, Nagoshi E, Nakagawa A, Imamoto N, Yoshimura M, Sakai H, Chong KT, Tsukihara T, Yoneda Y. (2003). The structure of importin-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor. *Science* 302:1571-1575.
- Leek BF. (2002). La digestione nei ruminanti. In: *Fisiologia degli animali domestici* : Swenson MJ, Reece WO. Idelson Gnocchi, Napoli, pp 416- 449.

- Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA, Willson TM. (1997). Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J. Biol. Chem.* 272:3137–3140.
- Liang G, Yang J, Horton JD, Hammer RE, Goldstein JL, Brown M.S. (2002). Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element binding protein-1c. *J. Biol. Chem.* 277:9520–9528.
- Liew C, Shut HAJ, Chin SF, Pariza MW, Dashwood RH. (1995). Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo(4,5-f)quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms. *Carcinogenesis*, 16:3037-43.
- Livak K, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))}. *Methods*. 25:402-408.
- Loor JJ, Lin X, Herbein JH. (2002). Dietary trans-vaccenic acid (trans11-18:1) increases concentration of cis9,trans11-conjugated linoleic acid (rumenic acid) in tissues of lactating mice and suckling pups. *Reprod Nutr Dev.* 42:85-99.

- Lock AL, Garnsworthy PC. (2003). Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and 9 D-desaturase activity in dairy cows. *Livestock Product. Sci.* 79:47–59.
- Lourenco M, Ramos-Morales E, Wallace RJ. (2010). The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal* 4:1008–1023.
- Mariani PM, Podestà A. (1996). *Biochimica e biotecnologia del ruminante*. Piccin Editore, Padova.
- Mather IH, Keenan TW. (1998). Origin and secretion of milk lipids. *J. Mamm. Gland Biol. Neopl.* 3: 259-273.
- McGuire MK, Park Y, Behre RA, Harrison LY, Shultz TD, McGuire MA. (1997). Conjugated linoleic acid concentrations of human milk and infant formula. *Nutr. Res.* 17:1277-1283.
- McPherson R, Gauthier A. (2004). Molecular regulation of SREBP function: The Insig-SCAP connection and isoform-specific modulation of lipid synthesis. *Biochem. Cell. Biol.* 82:201–211.
- Mc Pherson A, Kitchen BJ. (1983). Reviews of the progress of Dairy Science: The bovine milk fat globule membrane-its formation, composition, structure and behaviour in milk and dairy products. *J. Dairy Res.* 50: 07-133.

- Miserez AR, Cao G, Probst LC, Hobbs HH. (1997). Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein 2 (SREBF-2). *Genomics* 40:31–40.
- Mele M, Dal Zotto R, Cassandro M, Conte G, Serra A, Buccioni A, Bittante G, Secchiari P. (2009). Genetic parameters for conjugated linoleic acid, selected milk fatty acids, and milk fatty acid unsaturation of Italian Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 92:392-400.
- Moltó-Puigmartí C, Castellote AI, López-Sabater MC. (2007). Conjugated linoleic acid determination in human milk by fast-gas chromatography. *Anal. Chim. Acta.* 602:122-130.
- Mosley SA, Mosley EE, Hatch B, Szasz JI, Corato A, Zacharias N, Howes D, McGuire MA. (2007). Effect of varying levels of fatty acids from palm oil on feed intake and milk production in Holstein cows. *J Dairy Sci.* 90:987-993.
- Mosley EE, McGuire MA. (2007). Methodology for the in vivo measurement of the delta9-desaturation of myristic, palmitic, and stearic acids in lactating dairy cattle. *Lipids* 42:939–945.
- Mura MC, Daga C, Bodano S, Paludo M, Luridiana S, Pazzola M, Dettori ML, Vacca GM, Carcangiu V. (2013). Development of a RNA extraction method from milk for gene expression study in the mammary gland of sheep. *Mol. Biol. Rep.* 40:2169-2173.

- Murrieta CM, Hess BW, Scholljegerdes EJ, Engle TE, Hossner KL, Mossand GE, Rule DC. (2006). Evaluation of milk somatic cells as a source of mRNA for study of lipogenesis in the mammary gland of lactating beef cows supplemented with dietary high-linoleate safflower seeds. *J. Anim. Sci.* 84:2399-2405.
- Nagoshi E, Imamoto N, Sato R, Yoneda Y. (1999). Nuclear import of sterol regulatory element-binding protein-2, a basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-Zip)-containing transcription factor, occurs through the direct interaction of importin beta with HLHZip. *Mol. Biol. Cell.* 10:2221–2233.
- Nagoshi E, Yoneda Y. (2001). Dimerization of sterol regulatory element-binding protein 2 via the helix-loop-helix-leucine zipper domain is a prerequisite for its nuclear localization mediated by importin beta, *Mol. Cell. Biol.* 21:2779–2789.
- National Center for Biotechnology Information
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.
- Nohturfft A, Brown MS, Goldstein JL. (1998). Topology of SREBP cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain, *J. Biol. Chem.* 273:17243–17250.
- Nudda A, Battacone G, Usai MG, Fancellu S, Pulina G. (2006). Supplementation with extruded linseed cake affects concentrations of

- conjugated linoleic acid and vaccenic acid in goat milk. *J. Dairy Sci.* 89:277-82.
- Nudda A, Mele M, Battacone G, Usai MG, Macciotta NPP. (2003). Comparison of conjugated linoleic acid (CLA) content in milk of ewes and 148 goats with the same dietary regimen. *Ital. J. Anim. Sci.* 2(Suppl. 1): 515-517.
- Paape MJ, Wiggans GR, Bannermana DD, Thomasc DL, Sanders AH, Contreras A, Moroni P, Miller RH. (2007). Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small. Rum. Res.* 68:114–125.
- Palmquist DL, Beaulieu AD, Barbano DM. (1993). Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 76/6:1753-177.
- Palmquist DL, Jenkins TC.(1980). Fat in lactation rations. Review. *J. Dairy Sci.*, 63:1-14.
- Palmquist DL, Lock AL, Shingfield KJ, Bauman DE. (2005). Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. In *Advances in food and nutrition research*. Taylor S. (ed.). Elsevier Academic Press, USA. Vol. 50:pp. 179–217.
- Park Y, Albright KJ, Storkson JM, Cook ME, Pariza MW. (1997). Effect of conjugated linoleic acid and body composition in mice. *Lipids*, 32:853-853.

- Piccione G. (2009). Fisiologia della digestione e dell'assorbimento. Fisiologia Veterinaria. Clement MG. Point Veterinaire Italie, Milano. pp. 527-595.
- Pintus S, Murru E, Carta G, Cordeddu L, Batetta B, Accossu S, Pistis D, Uda S, Elena Ghiani M, Mele M, Secchiari P, Almerighi G, Pintus P, Banni S. (2013). Sheep cheese naturally enriched in α -linolenic, conjugated linoleic and vaccenic acids improves the lipid profile and reduces anandamide in the plasma of hypercholesterolaemic subjects. *Br. J. Nutr.* 109:1453-1462.
- Pulina G, Nudda A, Battacone G, Cannas A. (2006). Effects of nutrition on the contents of fat, protein, somatic cells, aromatic compounds and undesirable substances in sheep milk. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:255–291.
- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Radhakrishnan A, Sun LP, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL. (2004). Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain, *Mol. Cell.* 15:259–268.

- Rudolph MC, McManaman JL, Phang T, Russell T, Kominsky DJ, Serkova NJ, Stein T, Anderson SM, Neville MC. (2007). Metabolic regulation in the lactating mammary gland: a lipid synthesizing machine. *Physiol. Genomics*. 28:323-336.
- Sato R, Miyamoto W, Inoue J, Terada T, Imanaka T, Maeda M. (1999). Sterol regulatory element-binding protein negatively regulates microsomal triglyceride transfer protein gene transcription. *J. Biol. Chem*. 274:24714–24720.
- Schmelz EM, Bushnev AS, Dillehay DL, Liotta DC, Merrill AH Jr. (1997). Suppression of aberrant colonic crypt foci by synthetic sphingomyelins with saturated or unsaturated sphingoid base backbones. *Nutr. Cancer*. 28:81-5.
- Secchiari P, Antongiovanni M, Mele M, Serra A, Buccioni A, Ferruzzi G, Paoletti F, Petacchi F. (2003). Effect of kind of dietary fat on quality of milk fat from italian friesland cows. *Liv. Prod. Sci*. 83: 43-52.
- Secchiari P, Mele M, Serra A, Paoletti F. (2002). Le frazioni lipidiche del latte e della carne dei ruminanti. In : *Latte e carne dei ruminanti: componente lipidica e salute umana*. Atti Accademia dei Georgofili, pp. 7-95.

- Shimano H. (2001). Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog. Lipid. Res.* 40:439–452.
- Shimano H, Horton JD, Hammer RE, Shimomura I, Brown MS, Goldstein JL. (1996). Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J. Clin. Invest.* 98:1575–1584.
- Shimano H, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL. (1997). Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells, *J. Clin. Invest.* 99:846–854.
- Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. (1997). Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J. Clin. Invest.* 99: 838–845.
- Shingfield KJ, Bernard L, Leroux C, Chilliard Y. (2010). Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants *Animal*.4:1140-66.
- Shingfield KJ, Chilliard Y, Toivonen V, Kairenius P, Givens DI. (2008). Trans fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk. In *Bioactive*

- components of milk, advances in experimental medicine and biology. Z. Bosze (ed.). Springer, New York, US.vol. 606:pp. 3–65.
- Shingfield KJ, Griinari JM. (2007). Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 109: 799–816.
- Sinclair LA, Weerasinghe WM, Wilkinson RG, de Veth MJ, Bauman DE. (2010). A supplement containing trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid reduces milk fat yield but does not alter organ weight or body fat deposition in lactating ewes. *J. Nutr.* 140:1949-55.
- Singh H, Beckman K, Poulos A. (1991). Peroximal β -oxidation of branched chain fatty acids in rat liver-Evidence that carnitine palmitoyltransferase –I prevents transport of branched chain fatty acids into mitochondria. *J. Biol. Chem.* 269: 9514-20.
- Sun LP, Li L, Goldstein JL, Brown MS. (2005). Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro. *J. Biol. Chem.* 280:26483–26490.
- Sundqvist A, Ericsson J. (2003). Transcription-dependent degradation controls the stability of the SREBP family of transcription factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:13833–13838.
- Tacken PJ, Hofker MH, Havekes LM, van Dijk KW. (2001). Living up to a name: the role of the VLDL receptor in lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 12: 275–279.

- Timmen H, Patton S. (1988). Milk fat globules: fatty acid composition, size, and in vivo regulation of fat liquidity. *Lipids*, 23:685–689.
- Tsiplakou E, Zervas G. (2008). The effect of dietary inclusion of olive tree leaves and grape marc on the content of conjugated linoleic acid and vaccenic acid in the milk of dairy sheep and goats. *J. Dairy Res.* 75:270-278.
- Tsiplakou E, Zervas G. (2013). Changes in milk and plasma fatty acid profile in response to fish and soybean oil supplementation in dairy sheep. *J. Dairy Res.* 80:205-213.
- Van Nevel C, Demeyer DI. (1995). Lipolysis and biohydrogenation of soybean oil in the rumen in vitro: inhibition by antimicrobials. *J. Dairy Sci.* 78:2797-2806.
- Van Soest PJ. (1994). Nutritional ecology of the ruminant. Comstock Pub., Ithaca.
- Watkins PA, Maiguel D, Zhenzhen J, Pevsner J. (2007). Evidence for 26 distinct acyl-coenzyme A synthetase genes in the human genome. *J. Lipid Res.* 48:2736–2750.
- West DB, DeLany JP, Camet PM, Blohm F, Truett AA, Scimeca J. (1998). Effect of conjugated linoleic acid and body fat and energy metabolism in the mouse. *Am. J. Physiol. Reg. I.*, 44: R667-672.

- Williams GL, Stanko R L. (2000). Dietary fats as reproductive nutraceuticals in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 77: 1-12.
- Yabe D, Brown MS, Goldstein JL. (2002). Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:12753–12758.
- Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, Goldstein JL, Brown MS. (2002). Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell*. 110:489–500.