

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**



**DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA E
PRODUZIONI ANIMALI**

**Dottorato di Ricerca in
AMBIENTE, PREVENZIONE E MEDICINA PUBBLICA
INDIRIZZO IGIENE AMBIENTALE
XXVIII CICLO**

**INFLUENZA DEL REGIME ALIMENTARE SULLE CARATTERISTICHE
DIETETICO-NUTRIZIONALI DEL LATTE DI CAPRA**

Tutor Chiar.^{ma} Prof.^{ssa}

Raffaella Tudisco

Candidata Dott.^{ssa}

Laura Addi

Coordinatore

Chiar.^{mo} Prof.

Claudio Buccelli

Aprile 2016

INDICE

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE	4
Composizione acidica del latte	7
Lipidi negli alimenti dei ruminanti	7
Metabolismo lipidico nel rumine	9
Sintesi di acidi grassi microbici nel rumine	10
Sintesi del grasso del latte	11
CLA	13
Contenuto di CLA nel latte	16
Origine dei CLA nei prodotti dei ruminanti	17
Bioidrogenazione ruminale	18
Sintesi endogena	21
Stearoyl-CoA desaturasi (SCD, $\Delta 9$ -desaturasi)	23
Fattori che influenzano la composizione acidica nel latte	27
Latte di capra	29
MiRNA	32

CAPITOLO 2: Primo Contributo Sperimentale

INTRODUZIONE	40
MATERIALI E METODI	45
Animali, diete e management	45
Analisi del latte	47
Prelievo del sangue e analisi relative	51
Analisi statistica	51
RISULTATI	53
Latte	53
Sangue	60
DISCUSSIONE	52

CAPITOLO 3: Secondo Contributo Sperimentale

INTRODUZIONE	67
MATERIALI E METODI	70
Animali, diete e management	70
Analisi del latte	73
Analisi statistica	76
RISULTATI	77
DISCUSSIONE	84

CAPITOLO 4

CONCLUSIONE 90

BIBLIOGRAFIA 92

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

La produttività ha rappresentato l'obiettivo primario della ricerca agricola, sia per il comparto strettamente vegetale che per quello degli animali in produzione zootecnica, nel corso del 20° secolo. Nel caso dell'allevamento degli animali destinati alla produzione di latte, l'adozione di tecnologie innovative, in particolare per quanto concerne l'alimentazione dei soggetti, ha determinato un aumento della produzione totale che è risultata raddoppiata negli ultimi 50 anni. Analoga attenzione non è stata, tuttavia, posta agli aspetti nutrizionali delle derrate che al contrario, in alcuni casi hanno fatto registrare un trend negativo. Ciò ha determinato, nei confronti dei prodotti di origine animale, una disaffezione via via crescente del consumatore che, al contrario, ha mostrato sempre maggiore interesse per le interazioni tra qualità delle derrate alimentari e salute. In particolare, nel secolo scorso veniva enfatizzato il ruolo negativo sulla salute dell'uomo operato dalla componente lipidica degli alimenti e soprattutto della sua frazione satura che, secondo alcune sperimentazioni di tipo epidemiologico, avrebbe aumentato il livello di colesterolo plasmatico. Nel 1989, La Nutrition Committee of the American Heart Association ha, invece, sottolineato l'esistenza di diversi effetti biologici dei singoli acidi grassi nei confronti di una serie di variabili relative al rischio di malattie cardiovascolari (Kris-Etherton et al, 2001). Circa il 60% degli acidi grassi nel grasso del latte sono saturi, ma solo l'acido laurico (12:0), miristico (14:0) e palmitico (16: 0) hanno mostrato di aumentare i livelli ematici di colesterolo totale e colesterolo LDL (Kris-Etherton e Yu, 1997; Nicolosi, 1997); essi rappresentano solo circa il 25% degli acidi grassi nella frazione lipidica del latte. Ulteriori ricerche hanno poi dimostrato che essi determinano anche un incremento del colesterolo HDL, associato ad un ridotto rischio di CHD.

In realtà è stato evidenziato uno stretto legame esistente tra acidi grassi saturi (SFA) e alcuni acidi grassi *trans* della dieta con l'aumento del colesterolo e l'insorgenza di patologie cardio-vascolari, solo quando la loro assunzione avviene in dosi elevate e per lunghi periodi di tempo. Anche per i prodotti di origine animale, pertanto, viene oggi consigliato un consumo ragionato, calibrato in funzione del fabbisogno calorico giornaliero dell'uomo e dell'effettiva quantità di nutrienti ad azione negative. E' innegabile, infatti, che i prodotti di origine animale e, in particolare quelli lattiero-caseari, presentano importanti nutrienti e siano annoverabili tra gli alimenti a più alta densità calorica. In particolare il latte delle specie ruminanti è il veicolo d'elezione di calcio, selenio, fosforo e proteine ad alto valore biologico. Ciò fa sì che tale alimento sia da considerarsi completo e prezioso per la dieta dell'uomo in genere e per quella di consumatori con particolari esigenze nutrizionali, quali i neonati e i bambini in fase di accrescimento, gli anziani e le donne prossime alla menopausa. E' noto l'effetto positivo derivante dall'assunzione di latte e dei prodotti lattiero caseari per la prevenzione dell'osteoporosi e di alcune forme di cancro al colon (Hasler, 1998; Secchiari et al, 2002).

Negli ultimi decenni, numerosi gruppi di ricerca hanno effettuato sperimentazioni volte a chiarire il ruolo esercitato da alcune molecole cosiddette "bioattive" presenti negli alimenti sul mantenimento dello stato di salute e sulla prevenzione delle malattie dell'uomo. In merito, almeno tra le fasce di mercato più elevate, ad orientare le scelte alimentari del consumatore è stato coniato il termine di "alimento funzionale", usato per indicare qualsiasi componente della derrata in grado di fornire un beneficio per la salute al di là di quelli apportati in funzione del suo contenuto in nutrienti (Milner, 1999). Per essere considerato un alimento funzionale, il componente bioattivo deve essere consumato come costituente naturale della dieta anzichè assunto come integratore alimentare,

enfaticamente il legame tra alimentazione e stato di salute. Al fine di tutelare la salute pubblica sono stati promossi programmi di ricerca atti ad individuare le cause scientificamente correlabili con patologie quali obesità, aterosclerosi ed ipertensione che affligge circa il 30% dei cittadini italiani singolarmente e/o in modo associato.

Inizialmente l'identificazione dei componenti bioattivi è stato un obiettivo importante nel campo della ricerca effettuata sugli alimenti vegetali; oramai da qualche anno, anche per quanto concerne il comparto lattiero-caseario, viene approfondito lo studio sul ruolo svolto dai lipidi di origine animale nella induzione/prevenzione di quelle patologie legate alla cattiva alimentazione e/o a scorretti stili di vita, quali la sindrome metabolica (SM), il cancro al colon, le malattie cardio-vascolari (CHD), l'aterosclerosi e l'obesità anche infantile.

Tra le componenti funzionali della frazione lipidica del latte, di sicuro interesse sono gli isomeri dell'acido linoleico coniugato, meglio noti con l'acronimo CLA. Tra questi risulta predominante l'acido rumenico (RA: cis-9, trans-11 CLA) che possiede spiccate attività contro il cancro e l'aterosclerosi. La presenza esclusiva dell'acido rumenico delle derrate alimentari derivanti dai ruminanti è legata alla bioidrogenazione in sede ruminale di alcuni acidi grassi insaturi ingeriti dall'animale. L'RA nel latte deriva principalmente dalla sintesi endogena dalla Δ^9 -desaturasi mammaria a partire dall'acido vaccenico (VA: trans-11 18:1 CLA). Quindi sia VA e RA sono presenti nei prodotti lattiero-caseari, generalmente in un rapporto di circa 3:1. Gli effetti antitumorali dei CLA sono stati costantemente dimostrati sia attraverso modelli animali che mediante tecniche in vitro, per una vasta gamma di tipi di cancro. Inoltre, miscele di RA e CLA sono impiegate per migliorare la concentrazione plasmatica delle lipoproteine e del colesterolo e ridurre le lesioni aterogeniche in diversi modelli animali con malattia coronarica (Bauman et al, 2006).

Composizione Acidica Del Latte

I lipidi del latte possono avere diverse origini: parte degli acidi grassi ingeriti con l'alimentazione raggiunge la ghiandola mammaria senza subire modifiche; un'altra parte arriva al rumine dove subisce modifiche da parte della flora microbica o viene sottoposto al metabolismo dell'animale; un'altra parte ancora è sintetizzata de novo nella ghiandola mammaria. La sintesi de novo è limitata agli acidi grassi con una lunghezza della catena fino a 16 atomi di carbonio. Infine, il grasso del latte può contenere gli acidi grassi mobilitati dalle riserve del corpo. La frazione lipidica del latte può contenere quindi Acidi Grassi a Corta Catena (C4-C10, SCFA), a Media Catena (C12-C14, MCFA) e a Lunga Catena (> C16, LCFA). Inoltre gli acidi grassi del latte possono essere privi di doppi legami (Saturi, SFA), o presentare uno (monoinsaturi o MUFA) o più doppi legami (polinsaturi o PUFA).

Lipidi negli alimenti dei ruminanti

La maggior parte dei nutrienti utilizzati dai ruminanti sono di origine vegetale. Le piante e le loro parti svolgono un ruolo fondamentale nell'approvvigionamento delle sostanze nutritive (Elgersma, 2006). La frazione lipidica presente nell'erba e nelle foglie presenta valori compresi tra 30 e 100 g/kg di sostanza secca, gran parte contenuto nei cloroplasti (Bauchart, 1984). Differenze nel profilo lipidico sono da attribuire alla specie vegetale, allo stato di crescita della pianta, alla temperatura e all'intensità della luce (Hawke, 1973), ma i principali acidi grassi presenti nell'erba sono l'acido linoleico, l' α -linolenico e il palmitico che costituiscono approssimativamente il 95% del totale (Hawke, 1973). L'erba fresca contiene inoltre un'elevata percentuale di acido α -linolenico (50%-75%) del contenuto totale di acidi grassi. Le concentrazioni di acido α -

linolenico possono variare secondo il tipo di pianta, lo stadio di maturazione, le differenze genetiche (Elgersma, 2003 a, b) e per fattori ambientali come le variazioni stagionali e di luce (Dewhurst and King, 1998). È stato osservato come somministrando alle vacche differenti coltivazioni di piante a diversa concentrazione di acido α -linolenico si determini un lineare incremento della produzione di CLA nel latte (Elgersma, 2003a). Differenti strategie possono essere elaborate in base a questi criteri per incrementare acidi grassi ad azione benefica nei prodotti alimentari originati dai ruminanti.

I lipidi delle piante non sono comunque delle entità statiche, ma continuamente soggette a degradazione lipidica, come normale processo della vita della pianta, e all'azione delle lipasi presenti. Infatti il primo stadio di lipolisi degli alimenti dei ruminanti non avviene ad opera dei microrganismi ruminali, ma ad opera delle lipasi vegetali (Lee, 2003 a, b). L'entità di attività delle lipasi vegetali può variare in condizioni particolari di stress, come temperature elevate, carenza di ossigeno, situazioni presenti in seguito all'ingestione da parte dei ruminanti (Elgersma, 2006).

Nonostante l'attività microbica ruminale, con un incremento dell'apporto alimentare di PUFA aumenta anche il contenuto di PUFA della carne e del latte dei ruminanti (Dewhurst, 2006; Scollan, 2006). Diverse strategie nutrizionali sono state utilizzate, come l'alimentazione con foraggio, la fornitura di oli vegetali o di semi oleosi, prodotti del mare o fonti di grassi protetti. Additivi antimicrobici nei mangimi (ad es. monensin) possono influenzare la composizione della flora microbica ruminale. In effetti, le strategie alimentari che coinvolgono la composizione in FA della dieta spesso modificano le reazioni di bioidrogenazione batterica. Gli UFA hanno un effetto antimicrobico più forte rispetto a quelli saturi (Harfoot e Hazlewood, 1997) e diversi PUFA hanno riportato una differente tossicità nei confronti dei microrganismi del rumine (Maia, 2007; Zhang, 2008). Pertanto, un'integrazione di lipidi alimentari può portare a un cambiamento nella popolazione microbica ruminale. Una qualsiasi

strategia alimentare per essere utile, non deve compromettere la fermentazione ruminale e, contemporaneamente, l'apporto di sostanza secca e la produzione e/o le prestazioni dell'animale.

Metabolismo lipidico nel rumine

Lo studio del metabolismo lipidico ruminale risulta particolarmente interessante al fine di definire i meccanismi che sono all'origine del profilo acidico del latte. I due principali processi a cui vengono sottoposti i lipidi della dieta a contatto con le popolazioni microbiche ruminali sono la lipolisi e la bioidrogenazione (Harfoot, 1978; Jenkins, 1993; Palmquist e Jenkins, 1980).

La prima avviene non appena i grassi somministrati con la dieta giungono nel rumine, dove le lipasi microbiche operano l'idrolisi dei trigliceridi in acidi grassi liberi (FFA) e glicerina. Quest'ultima viene principalmente utilizzata dai batteri a fini energetici con produzione di acido propionico, assorbito poi dalla parete ruminale (McDonald, 1992; Bittante et al, 1993). Il destino degli acidi grassi è diverso; essi, infatti possono venire riarrangiati tramite complessi meccanismi, oppure, ed è la trasformazione più importante a carico di questi composti, possono andare incontro alla bioidrogenazione. La bioidrogenazione consiste nel saturare i doppi legami degli acidi grassi insaturi; il risultato complessivo è che all'uscita dal rumine, gli acidi grassi saturi prevalgono abbondantemente sugli acidi grassi mono- e polinsaturi.

La bioidrogenazione degli acidi grassi insaturi, viene operata da vari ceppi batterici, tra cui, il primo ad essere studiato è stato il *Butyrivibrio fibrisolvens* (Kepler et al, 1966). Il processo di bioidrogenazione nel rumine può arrivare a modificare il 90% circa dei grassi insaturi ingeriti con la dieta (Bikerstaffe et al, 1972) ma, l'entità di questo fenomeno, è in funzione della fonte lipidica, dei tempi di transito ruminale e della tipologia e delle modificazioni della

popolazioni presenti nel rumine. In merito a quest'ultimo punto, è da ricordare che un aumento del tenore lipidico della dieta va ad interferire con l'attività batterica ruminale in quanto i lipidi creano un film sulle particelle alimentari, impedendone così il contatto con i batteri e limitandone la digeribilità. Ciò risulta soprattutto in una minore digestione della fibra. I microrganismi maggiormente interessati al fenomeno sono i batteri cellulolitici i quali, riducendo la loro azione, riducono parallelamente la produzione di acido acetico, diminuendone la quota disponibile per la sintesi dei grassi a livello della ghiandola mammaria. Anche la composizione della flora batterica ruminale subisce modificazioni a seguito di diete con elevati tenori lipidici. Prove condotte da Barsuhn et al. (1988), hanno dimostrato che, a seguito della somministrazione di oleato di sodio, la flora ruminale riduce la sua vitalità e numerosità, a causa di un effetto tossico esercitato da parte dei grassi. Gli acidi grassi della serie satura sembrano avere effetti differenti rispetto a quelli della serie insatura. Gli acidi grassi insaturi inibiscono il metabolismo microbico in misura superiore rispetto agli acidi grassi saturi (Maczulak et al, 1981, Chalupa et al., 1984). Gli stessi autori riportano che l'attività batterica ruminale può subire minori interferenze se il carbonio degli acidi grassi è legato alla glicerina o al calcio.

Sintesi di acidi grassi microbici nel rumine

I lipidi contenuti nei batteri ruminali derivano in parte dal metabolismo dei grassi alimentari e in parte dalla sintesi *ex novo* da parte delle cellule microbiche. Il contributo di ciascuna di queste frazioni dipende dal contenuto di grasso della dieta e dalle specie batteriche che colonizzano il rumine (Jenkins, 1993). Infatti, se la concentrazione lipidica della dieta è elevata, è facilitato il trasporto diretto dei lipidi all'interno delle cellule batteriche, dove risiedono sotto forma di goccioline immerse nel citoplasma. Per quanto riguarda invece la sintesi *ex novo*,

il tipo di acido grasso prodotto dipende dal tipo di substrato/precursore che i batteri ruminali utilizzano. Infatti, mentre l'assorbimento di acetato e glucosio all'interno della cellula microbica conduce alla sintesi di acidi grassi non ramificati caratterizzati da un numero pari di atomi di C, quello di propionato e valeriano portano alla sintesi di acidi grassi a lunga catena con catena lineare e numero dispari di atomi di C. Utilizzando, invece, come precursori isobutirrato, isovaleriano e 2-metil-butirrato, la cellula microbica sintetizza acidi ramificati nelle forme iso e anteiso. Gli acidi grassi monoinsaturi vengono infine sintetizzati per via anaerobica a partire da beta-idrossidecanoato.

Sintesi del grasso del latte

Circa il 50% degli acidi grassi (FA) del latte vengono sintetizzati dalla ghiandola mammaria a partire da acetato e beta-idrossibutirrato derivanti dal sangue, per azione degli enzimi acetil-CoA-carbossilasi e sintasi degli acidi grassi. La rimanente quota proviene sia dalla dieta (circa il 40-45%) sia dalla mobilitazione delle riserve adipose dell'animale in proporzioni variabili a seconda dello stadio di lattazione (Palmquist e Conrad, 1978). Queste percentuali di riferimento possono, però, subire variazioni significative in funzione della dieta. La sintesi degli acidi grassi avviene mediante due diversi meccanismi: la sintesi citoplasmatica, che rappresenta la via principale e tipica di tutti i tessuti in intensa attività metabolica e la sintesi mitocondriale, che completa quella citoplasmatica.

In particolare, la sintesi degli acidi grassi con catena fino a 16 atomi di carbonio avviene nel citoplasma attraverso un processo metabolico che coinvolge due enzimi chiave: l'acetil-CoA-carbossilasi (ACC) e la sintasi degli acidi grassi (FAS) (Chilliard, 2000). In pratica l'ACC catalizza la formazione di malonil-CoA e la FAS interviene determinando la sua unione a molecole di acetato e/o

β -idrossibutirrato (Barber, 1997). Per successive condensazioni, nella ghiandola mammaria, l'allungamento della catena può proseguire solo fino alla formazione di acidi grassi a 14 o 16 atomi di carbonio (Moore e Christie, 1981). Negli altri tessuti, subentra la sintesi mitocondriale e l'acido palmitico può essere elongato fino ad arrivare a 22 atomi di carbonio. Nei microsomi, gli acidi grassi con almeno 18 atomi di carbonio, possono essere sia elongati che desaturati.

Gli acidi grassi a media e a lunga catena (con 16 atomi di carbonio o più) presenti nel plasma sanguigno provengono dai lipidi della dieta o dalla mobilizzazione delle riserve corporee. Gli Acidi Grassi Non Esterificati (NEFA) e/o di quelli contenuti nei chilomicroni e nelle VLDL (Very Low Density Lipoprotein), previa azione dell'enzima lipoproteinlipasi (LPL), possono essere utilizzati dai tessuti tramite prelievo diretto dal torrente circolatorio. Benché non possano sintetizzare acidi grassi a catena più lunga di 16 atomi di carbonio, le cellule della ghiandola mammaria, mediante l'enzima Stearoil-CoA-desaturasi (Δ 9-desaturasi), che introduce un doppio legame in posizione Δ 9 della catena carboniosa, riescono a convertire una notevole quantità di acido stearico (18:0) in acido oleico (cis9-18:1) (Kinsella, 1972).

Gli acidi grassi insaturi a lunga catena (LCUFA) esercitano un'azione inibente sugli enzimi lipogenici della ghiandola mammaria ed in particolare interferirebbero con l'attività del acetil-CoA carbossilasi. Infatti, la somministrazione di diete contenenti un'elevata quantità di LCUFA o l'infusione di quest'ultimi direttamente nel duodeno, provocano decrementi del contenuto di grasso del latte dovuti all'inibizione della sintesi endogena della frazione acidica a corta e media catena. I PUFA C20 e C22, inoltre, sono in grado di ridurre il trasferimento LCUFA dal plasma alla ghiandola mammaria, interferendo con la lipoprotein-lipasi della ghiandola (Storry et al, 1974).

CLA

Gli isomeri coniugati dell'acido linoleico (CLA) sono un gruppo di acidi grassi caratterizzati da due doppi legami adiacenti con isomeria geometrica e posizionale variabile, diversi dai classici legami metilenici presenti nella struttura dell'acido linoleico (cis9, cis12 C18:2). Tali legami coniugati si possono trovare nelle posizioni che vanno da 7,9 a 12,14 e per ogni isomero posizionale sono possibili 4 paia di isomeri geometrici (cis,cis; trans,cis; cis,trans; trans,trans). Di conseguenza il termine CLA include un totale di 24 isomeri posizionali e geometrici dell'acido linoleico (Cruz-Hernandes et al, 2004). La National Academy of Sciences degli Stati Uniti li ha definiti come gli unici acidi grassi che hanno mostrato di possedere una chiara attività anti-cancerogena.

Tali acidi grassi furono individuati per la prima volta da Pariza (1985) in uno studio sulle componenti pro-cancerogene della carne bovina sottoposta a cottura con griglia. Sorprendentemente, a differenza di altri acidi grassi trans noti per essere nocivi per la salute umana, questi acidi grassi dienoici trans, derivati dall'acido linoleico (18:2 n-6), mostravano proprietà anti-cancerogene anziché pro-cancerogene. A tale scoperta, è seguito un largo numero di ricerche sugli effetti dei CLA sulla salute umana, che prevedevano l'impiego di singoli isomeri ad alto grado di purezza o di miscele di isomeri in diverse proporzioni, sia in prove in vivo (su animali da laboratorio) che in vitro (su colture di cellule umane o animali). Tali studi hanno evidenziato che i CLA influiscono su diversi aspetti della salute umana, quali la composizione corporea, la carcinogenesi, i disturbi cardiovascolari, l'insulino-resistenza e il diabete, la funzione immunitaria.

In particolare, alcuni studi condotti sui ratti hanno evidenziato che, nel caso del carcinoma della mammella, l'azione del CLA è dose dipendente (Chajes et al, 2002) e che i migliori risultati si ottengono se l'assunzione avviene durante il periodo dello sviluppo di questo tessuto (Chajes et al, 2003). Gli stessi risultati sono stati ottenuti nel caso del tumore all'intestino e alla prostata. Studi effettuati in vitro con cellule cancerogene della prostata supportano l'ipotesi sugli effetti

anti-cancerogeni dei CLA e dimostrano che essi inibiscono la proliferazione cellulare e la produzione di eicosanoidi e inducono apoptosi, attraverso l'aumento dell'espressione di p53 (gene oncosoppressore) e l'attenuazione di bcl-2 (B cell lymphoma gene-2), in linee cellulari di cancro alla prostata umano (Ochoa, 2004). I due isomeri principali di CLA sembrano avere effetti differenti e specifici sulla produzione di eicosanoidi e sulla regolazione degli oncogeni e quindi sull'induzione dell'apoptosi. Infatti, l'isomero trans10, cis12 attenua principalmente la produzione di eicosanoidi e l'espressione degli enzimi LOX-5 e COX-2 mentre il cis9, trans11 influenza l'espressione degli oncogeni p53, p21WAF1/CIP1 e bcl-2 promuovendo l'apoptosi.

L'effetto dei CLA nell'attenuazione dell'accumulo di grasso corporeo sembra essere dose-dipendente e indipendente dal contenuto di grasso della dieta (West et al, 1998; Delaney et al, 1999). La maggior parte delle ricerche sugli effetti dei CLA sulla composizione corporea è stata effettuata utilizzando miscele dei due isomeri dei CLA.

Studi più recenti hanno utilizzato i singoli isomeri in forma altamente purificata, dimostrando che il cis-9, trans-11 e il trans-10, cis-12 hanno effetti diversi sul metabolismo lipidico. In particolare, il trans-10, cis-12 e non il cis-9, trans-11 esercita il proprio effetto sulla composizione corporea attraverso la riduzione della taglia degli adipociti, l'aumento dell'ossidazione degli acidi grassi e l'inibizione degli enzimi lipogenici, quali lipoproteinlipasi e Stearoyl-CoA desaturasi.

Infatti, una miscela di CLA contenente più alte concentrazioni trans-10, cis-12 rispetto a cis-9, trans-11 promuoveva una significativamente più elevata riduzione di grasso corporeo in topi e criceti (Wahle et al, 2004; Tricon et al, 2005; Bhattacharya et al, 2006; Park et al, 1999; Gavino et al, 2000).

Diversi studi hanno evidenziato proprietà anti-aterogeniche ed ipocolesterolemiche dei CLA. La somministrazione di CLA a topi con placche aterosclerotiche stabilizzate risultava in una regressione di tali placche (Toomey

et al, 2006). Ciò indica che i CLA potrebbero influenzare direttamente il trasferimento di lipidi al di fuori delle placche, per cui essi potrebbero essere efficaci nel trattamento di disturbi vascolari stabilizzati. Fino ad ora però non è stato effettuato alcuno studio clinico su volontari umani per testare tali effetti.

Gli effetti positivi appena descritti contrastano con quelli riportati in topi alimentati con una dieta aterogena (Munday et al, 1999). Nonostante i CLA promuovessero un profilo lipoproteico favorevole attraverso l'innalzamento del rapporto HDL:colesterolo totale e la diminuzione della concentrazione di trigliceridi nel siero (entrambi potenziali effetti benefici sul rischio di disturbi cardiovascolari), i CLA aumentavano lo sviluppo di strie lipidiche aortiche. Studi precedenti su conigli alimentati con colesterolo non avevano mostrato alcun effetto della somministrazione di 0.5 g/giorno di CLA sulle strie lipidiche (Lee et al, 1994). Non è chiara la ragione di tali risultati contrastanti ma potrebbe essere collegata al tipo di animale usato e/o al tipo di CLA somministrato.

Dal momento che i risultati circa gli effetti dei CLA sul tessuto adiposo nell'uomo sono controversi, non è possibile affermare che la riduzione dell'adiposità sia il meccanismo alla base dell'influenza dei CLA sulla tolleranza al glucosio e sull'insulino resistenza.

Invece, sembra più probabile che i CLA agiscano sui livelli di leptina secreta dagli adipociti attraverso un sistema di segnali a livello ipotalamico, come dimostrato da studi effettuati su ratti Zucker, topi non diabetici e esseri umani con diabete di tipo-2 (Belury e Vandel Heuvel, 1999; Belury, 2003). Anche la già menzionata attenuazione della produzione di citochine infiammatorie da parte dei CLA nelle cellule immunitarie (Yu et al, 2002), se avvenisse negli adipociti, potrebbe fornire una valida spiegazione per gli effetti benefici dei CLA sul diabete e sull'insulino-resistenza. In ogni caso, gli effetti dei CLA sull'insulino-resistenza e sull'omeostasi del glucosio sono variabili e dipendenti dalla specie e dal tipo di isomero testato (Kelley e Erickson, 2003).

Contenuto di CLA nel latte

La presenza di questi acidi grassi con doppi legami coniugati fu, inizialmente, evidenziata da Booth et al. (1935), i quali, impiegando lo spettrofotometro, notarono che l'esposizione del latte di vacche allevate al pascolo ad una lunghezza d'onda di 230 nm forniva un'assorbanza maggiore rispetto a quella rilevata nel caso di animali allevati in stalla. Qualche anno dopo, Moore (1939) arrivò alla conclusione che tale diverso assorbimento era dovuto alla presenza di doppi legami coniugati. Successivamente, Hilditch e Jasperson (1941; 1945) suggerirono che questo tipo di legami coniugati si creavano in acidi grassi insaturi con 18 atomi di carbonio. Barlett e Chapman (1961) trovarono, inoltre, una costante relazione fra trans C18:1 e la presenza di legami insaturi coniugati in numerosi campioni di burro, il che li portò ad ipotizzare una sequenza di reazioni di bioidrogenazione dell'acido linoleico a livello ruminale.

Riel (1963) evidenziò un raddoppio del contenuto di dieni coniugati nel profilo acido del grasso del latte durante l'estate, quando le vacche erano allevate al pascolo, rispetto all'inverno durante il quale assumevano foraggi conservati.

Parodi (1977) fu il primo a stabilire che questi acidi grassi con legami doppi coniugati erano principalmente rappresentati dall'acido octadecadienoico cis-9, trans-11 coniugato. Solo successivamente, con il miglioramento delle tecniche analitiche, è divenuto chiaro che il grasso dei prodotti derivati dai ruminanti contiene diversi isomeri dell'acido linoleico coniugato (Sehat et al, 1998; Yurawecz et al, 1998).

Origine dei CLA nei prodotti dei ruminanti

Per molti anni si è pensato che la presenza dei CLA nella componente lipidica del latte e della carne fosse in esclusiva relazione con i processi di bioidrogenazione ruminale e, in particolare, con il processo biochimico di riduzione dell'acido linoleico ad acido stearico, operato da microrganismi cellulolitici quali il *Butyrivibrio fibrisolvens*. Inizialmente, la relazione esistente tra il contenuto di acido vaccenico (VA; trans11 C18:1) e quello del cis 9, trans11 CLA (RA, acido rumenico; Kramer et al., 1998) nel latte, si pensava fosse una conseguenza del fatto che entrambi gli acidi originavano dalla bioidrogenazione dell'acido linoleico (Jiang et al., 1999; Lawless et al., 1998); successivamente è stato chiarito che tale relazione derivava dalla trasformazione, a livello tissutale, dell'acido vaccenico in acido rumenico. Inoltre, durante i processi di bioidrogenazione ruminale l'acido rumenico ha un'emivita molto breve e solo l'acido vaccenico è in grado di accumularsi nel liquido ruminale (Harfoot et al., 1988), quindi tutto ciò rendeva difficile spiegare gli alti livelli di CLA osservati nel latte e nella carne dei ruminanti, senza prevedere un apporto alternativo a quello ruminale. In seguito a ricerche effettuate da Holman e Mahfouz (1981) e Pollard et al. (1980), che descrissero la desaturazione di trans-monoeni a cis, trans C18:2, fu proposto che i CLA potessero essere sintetizzati per via endogena a partire dal VA ad opera di una $\Delta 9$ -desaturasi (Parodi, 1994).

I CLA del latte e della carne dei ruminanti hanno sostanzialmente due origini (Griinari e Bauman, 1999):

1. ruminale, attraverso la bioidrogenazione dell'acido linoleico;
2. tissutale, per sintesi endogena a partire dal trans C18:1, intermediario della suddetta bioidrogenazione ruminale.

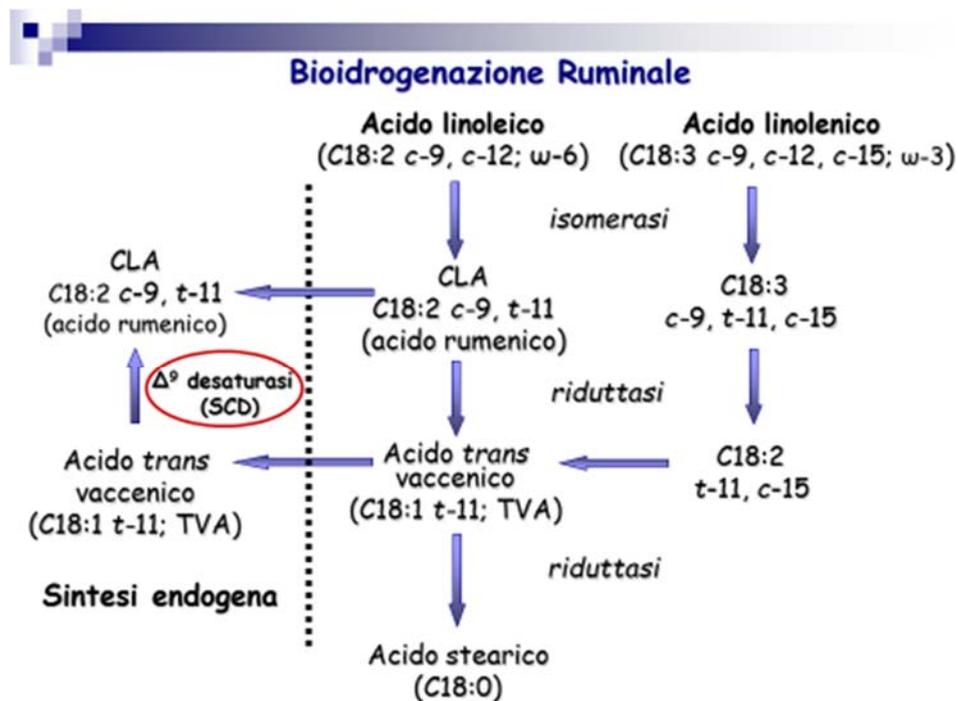
Si comprende, quindi, che l'incompleta bioidrogenazione degli acidi grassi insaturi a livello ruminale risulta indispensabile per la presenza di CLA nelle prodotti dei ruminanti.

Bioidrogenazione ruminale

Nei poligastrici la sintesi dei CLA avviene sia a livello ruminale, a seguito del processo di idrogenazione dell'acido linoleico contenuto nella dieta, sia a livello dei tessuti a partire dal trans11 C18:1 (VA), un altro intermedio della bioidrogenazione ruminale derivato dalla componente lipidica insatura di origine alimentare (Bauman et al, 2001). La componente lipidica apportata dai foraggi, deriva sostanzialmente dai trigliceridi e dai fosfolipidi le cui composizioni acide sono caratterizzate da una prevalenza degli acidi linoleico e α -linolenico. Nel caso delle granelle di cereali, invece, a pesare maggiormente è la frazione lipidica apolare (trigliceridi) che apporta soprattutto acido oleico e linoleico. Una volta giunti nel rumine i trigliceridi ed i fosfolipidi subiscono una prima azione da parte della microflora batterica la quale, tramite opportune lipasi, scinde i legami estere esistenti tra gli acidi grassi ed il glicerolo. Gli acidi grassi così liberati sono sottoposti ad una massiccia idrogenazione in cui assume un ruolo determinante la microflora batterica (Bauman et al, 2001). Per lungo tempo si è creduto che l'unico batterio in grado di idrogenare gli acidi grassi insaturi nel rumine fosse il *Butyrivibrio fibrisolvens*. Oggi invece è appurato che l'idrogenazione ruminale non coinvolge un solo gruppo batterico. Infatti la microflora batterica è suddivisibile in due gruppi a seconda dei prodotti finali delle reazioni che li riguardano (Bauman et al, 2001):

Batteri del gruppo A: utilizzano come substrato gli acidi linoleico ed α -linolenico e generano come prodotti finali il trans11 C18:1 o VA. *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus*, *Eubacterium* sp., *Treponema* (spirocheta ruminale) e alcuni batteri Gram negativi (Harfoot and Hazlewood, 1997);

Batteri del gruppo B: utilizzano come substrato il VA ed hanno come prodotto di reazione l'acido stearico (SA: C18:0). Due specie di *Fusocillus* e un Gram-negativo (Harfoot and Hazlewood, 1997).



L'idrogenazione ruminale avviene solo su acidi grassi che contengono doppi legami in posizione cis9,cis12 come gli acidi linoleico e linolenico. Come si nota dallo schema, il primo passaggio del processo è rappresentato dall'isomerizzazione del legame in posizione 12. L'isomerasi è un enzima legato alle membrane cellulari dei batteri ed ha come unico substrato di reazione gli acidi grassi con doppio legame in posizione cis9,cis12 ed un gruppo carbossilico "libero". Quindi vediamo che l'isomerasi dei batteri del gruppo A "prepara" l'acido grasso per la successiva azione dei batteri del gruppo B, "spostando" il legame dalla posizione 12 alla posizione 11, dopo averlo convertito dalla forma *cis* a quella *trans*.

Nel caso dell'acido linoleico il prodotto di questo step è, quindi, il cis9, trans11 C18:2 (RA, acido rumenico) ovvero sia il CLA maggiormente rappresentato negli alimenti provenienti dai ruminanti.

Nel caso dell'acido α-linolenico il successivo step consiste nella riduzione del legame in posizione 9 da parte di una riduttasi batterica con produzione del

trans11 C18:1 (VA) che subisce un'ulteriore riduzione in conseguenza della quale si produce l'acido saturo corrispondente, vale a dire il C18:0 (SA) (Bauman et al, 2001). Numerosi studi hanno evidenziato che, successivamente all'isomerizzazione iniziale, gli steps procedono piuttosto rapidamente, mentre quello successivo, da VA a SA si verifica piuttosto lentamente (Bauman et al, 2001). Ed è proprio la lentezza con cui avviene l'ultima riduzione, che determina un accumulo di acido vaccenico (VA).

Analogamente a quanto avviene per l'idrogenazione dell'acido linoleico, l'acido α -linolenico subisce due riduzioni: la prima, che riguarda i due doppi legami cis posti in posizione 9 e 15 e porta alla formazione, anche in questo caso, dell'acido vaccenico (VA); la seconda, che procede più lentamente della prima e porta alla formazione dell'acido stearico (SA). Pertanto, se da un lato l'acido α -linolenico non contribuisce direttamente alla formazione del CLA a livello ruminale, riveste comunque un ruolo importante nel determinare la quantità totale dei CLA nel latte e/o nella carne, in quanto concorre alla formazione del VA che è un elemento molto importante per la sintesi endogena dei CLA stessi.

Il processo di idrogenazione batterica ruminale dei PUFA è dotato di meccanismi di autoregolazione e, per evitare squilibri nel metabolismo lipidico batterico, risponde in modi diversi alle possibili variazioni delle condizioni ambientali in cui esso avviene.

L'azione dell'isomerasi batterica che catalizza il primo step è, ad esempio, inibita da elevate concentrazioni dei substrati di reazione, ossia dagli acidi linoleico e α -linolenico; mentre, elevate concentrazioni di PUFA n-3 nella dieta inibiscono sia la riduttasi batterica che catalizza il passaggio dall'acido rumenico (RA) all'acido vaccenico (VA), che quella che catalizza l'ultima riduzione dal VA all'acido stearico (SA). Tale inibizione sembra potersi ricondurre a probabili fenomeni di competizione enzimatica, più che ad una generale modificazione dell'ambiente ruminale da parte dei PUFA n-3 (Enser et al, 1999).

La riduttasi che catalizza il passaggio da RA a VA subisce, invece, un'inibizione a feedback da parte dell'acido vaccenico stesso (Enser et al, 1999). Inoltre, quando il pH ruminale subisce una riduzione conseguente ad una dieta con basso rapporto foraggi/concentrati, si creano le condizioni per la produzione in quantità significative dell'isomero trans10, cis12 C18:2 CLA e del trans10 C18:1 a discapito del vaccenico. Si pensa che in tale processo sia implicata una specifica isomerasi batterica, che determina la formazione dell'isomero trans10, cis12 C18:2 CLA come prodotto del primo passaggio.

Sintesi endogena

Nel corso degli anni, numerose osservazioni effettuate sia in vivo sia in vitro hanno portato ad ipotizzare che non tutti i CLA presenti nel latte e nella carne dei ruminanti potessero originare dalla bioidrogenazione dell'acido linoleico nel rumine. In particolare, Banni et al. (1996) riscontrarono alte concentrazioni di CLA cis-9, trans-11 nel latte di pecore alimentate esclusivamente con il pascolo, ricco in acido linolenico, ma non in linoleico. Inoltre, come già menzionato, anche l'arricchimento alla razione con oli di pesce, che sono ricchi di PUFA con 20 o più atomi di C e non producono né CLA né TVA come prodotti intermedi della bioidrogenazione, porta ad un aumento del contenuto di cis9, trans11 CLA nel latte (Franklin et al, 1999; Donovan et al, 2000).

Alla luce di tali osservazioni, si iniziò ad ipotizzare che la sintesi ruminale di CLA non fosse né l'unica né la principale fonte dei CLA del latte e della carne. Griinari et al. (1997), in una serie di ricerche, ipotizzarono che una parte dei CLA del latte fosse di origine endogena e che il cis9, trans11CLA originasse da una desaturazione dell'acido vaccenico ad opera di una $\Delta 9$ -desaturasi mammaria. In un primo esperimento (Corl et al. 1998) infusero per tre giorni acido vaccenico

(12.5 g/d) a livello abomasale, ottenendo un aumento del contenuto di CLA nel latte pari al 40 %. Successivamente per quantificare l'importanza della desaturasi a livello tissutale, essi infusero in abomaso acido sterculico, un potente inibitore della $\Delta 9$ -desaturasi (Corl et al, 1999). Ciò determinò una drastica diminuzione del contenuto di cis9, trans11 CLA nel latte. Secondo Grinari et al. (2000) il contributo della sintesi endogena al contenuto totale di CLA nel latte sarebbe pari al 64%, mentre Lock e Garnsworthy (2002) stimarono un'incidenza superiore all'80%. Secondo Piperova et al. (2002) il contributo della sintesi ruminale di CLA sarebbe pari solo al 4-7%. Per Kay et al. (2002), infine, la sintesi endogena sarebbe del 100% e tale ipotesi è supportata dall'osservazione che la concentrazione ematica di CLA è nulla o minima (Khanal et al, 2002; Loo et al, 2002).

Anche nel grasso di infiltrazione muscolare è stata individuata l'attività della $\Delta 9$ -desaturasi (Porter, 2003; St. John et al, 1991) e ne è stata caratterizzata l'espressione genica attraverso l'analisi dell'mRNA (Martin et al, 1999; Cameron et al, 1994). Le alte correlazioni riscontrate fra il contenuto di CLA e di VA (Madron et al, 2002; Poulson, 2001), dimostrerebbero che un'elevata quantità di CLA viene sintetizzata per via endogena. Secondo Gillis et al. (2003) circa l'86% del cis9, trans11CLA del grasso della carne bovina viene prodotto dalla desaturazione del VA. La desaturazione endogena del VA a cis9, trans11CLA, inoltre, aumenterebbe con l'aumentare della quantità di foraggio nella dieta (Sackman et al, 2003). Successivamente, anche, Bauman et al. (2006) affermarono che il cis9,trans11 C18:2 CLA si poteva formare a livello dei tessuti per l'azione desaturante dell'enzima $\Delta 9$ desaturasi. I principali substrati di reazione sono lo stearoil-CoA ed il palmitoil-CoA che sono utilizzati per la formazione di acidi grassi per poi essere incorporati nei trigliceridi e nei fosfolipidi. L'incorporazione di tali FA nei fosfolipidi assolve un importante ruolo fisiologico, in quanto essi contribuiscono al mantenimento dell'integrità funzionale delle membrane cellulari.

Per quanto riguarda gli altri ruminanti, i dati sulla proporzione dell'origine ruminale ed endogena di CLA sono limitati. Tuttavia, il fatto che le maggiori concentrazioni di CLA della carne di agnello (Bolte et al., 2002) e del latte di capra (Chilliard et al., 2003) siano associate a elevati contenuti di VA indicherebbe che anche nei piccoli ruminanti la sintesi post ruminale giochi un ruolo predominante. LeDoux et al. (2002) hanno dimostrato che il VA è il principale trans C18:1 nel latte di capra e che i rapporti tra i trans isomeri del C18:1 sono simili a quelli riscontrati nel latte bovino.

Stearoyl-CoA desaturasi (SCD, Δ 9-desaturasi)

La Stearoyl-CoA desaturasi (SCD) è un complesso multienzimatico che coinvolge NADHcitocromo b5 riduttasi, citocromo b5, acil-CoA sintasi e Δ 9 desaturasi (Ntambi, 1995). La reazione della Δ 9-desaturasi introduce un doppio legame cis tra il carbonio 9 e quello 10 degli acidi grassi e i prodotti di questa reazione sono importanti componenti dei fosfolipidi e dei trigliceridi, coinvolti principalmente nel mantenimento della fluidità delle membrane. Esiste un vasto gruppo di acidi grassi saturi e insaturi che può fungere da substrato nella reazione, incluso l'acido trans vaccenico (Pollard, 1980). Oltre che alla formazione del CLA-cis9,trans11, la Δ 9-desaturasi ha un ruolo attivo anche in quella di altri acidi grassi cis9,trans-n-18:2, quali il CLA-trans7,cis9 identificato in latte e prodotti lattiero caseari da Yurawecz (1998). Per quanto riguarda la localizzazione della Δ 9-desaturasi nei tessuti, essa cambia a seconda della specie animale considerata. Ovini e bovini presentano maggiori concentrazioni e attività dell'enzima nel tessuto adiposo, che, quindi, sembra essere la maggiore fonte di sintesi endogena di c9,t11-CLA nel caso di animali da carne (Cameron, 1994; Page, 1997). Nel caso di ruminanti da latte, studi sull'attività della Δ 9-desaturasi hanno portato a

definire la ghiandola mammaria come sito principale della sintesi endogena di CLA (Kinsella, 1972). Ciò è stato dimostrato anche in vivo da Bickerstaffe e Johnson (1972) che iniettarono in vena in capre in lattazione acido sterculico, un acido grasso ciclico in grado di inibire l'attività della $\Delta 9$ -desaturasi in circolo negli organi. Gli autori registrarono nel latte una notevole riduzione del rapporto cis9-18:1/18:0, mentre nel plasma la composizione acidica risultò quasi inalterata. Essi conclusero che la ghiandola mammaria è il sito principale di desaturazione degli acidi grassi del latte. Studi sull'attività della $\Delta 9$ -desaturasi, condotti principalmente con enzima di origine epatica di topo, hanno evidenziato che l'espressione genica e l'attività dell'enzima sono sensibili a variazioni della dieta, dell'assetto ormonale e dello stato fisiologico dell'animale (Tocher, 1998). Martin et al. (1999) hanno caratterizzato l'ontogenesi dell'espressione genica dell'enzima nel tessuto adiposo di bovini in accrescimento. Ward et al. (1998), invece, allo scopo di verificare le modifiche tessuto-specifiche nella concentrazione di mRNA della $\Delta 9$ -desaturasi in pecore a differenti stati fisiologici, osservarono una riduzione della quantità di mRNA nel tessuto adiposo e un contemporaneo aumento nel tessuto mammario all'inizio della lattazione.

Il gene SCD codifica per una proteina di 359 residui amminoacidici situati nel reticolo endoplasmatico. Nei ruminanti il gene SCD (Bernard et al, 2001), genera un trascritto di 5 (Kb) ed è stato caratterizzato anche nelle pecore (Ward et al, 1998), mucche (Chung et al, 2000), e caprini (Bernard et al, 2001). È organizzato in 6 esoni e 5 introni. Nelle capre, la sequenza 3'-UTR deriva da un singolo esone ed è insolitamente lunga (3.8Kb), come osservato per gli esseri umani (Zhang et al, 1999). Inoltre, il caprino 3'-UTR è caratterizzata dalla presenza di più elementi AU, che potrebbe destabilizzare la sequenza dell'mRNA, e presenta un polimorfismo genetico con la presenza o l'assenza di una tripletta nucleotidica (TGT) in posizione 3178-3180 (GenBank AF325499). Subito dopo il parto, l'espressione dell'SCD negli ovini (Ward et al, 1998)

aumenta nella ghiandola mammaria. In capre in lattazione, il gene SCD è altamente espresso nella ghiandola mammaria e nel tessuto adiposo sottocutaneo, rispetto al tessuto adiposo perirenale (Bernard et al.). Nella ghiandola mammaria durante la lattazione, il palmitoleico-CoA e oleico-CoA sono sintetizzati dal palmitoil-CoA e stearoil-CoA dall'azione dell'enzima SCD. Inoltre, nella ghiandola mammaria bovina, l'SCD è responsabile della sintesi della maggior parte degli isomeri di CLA cis-9, trans-11- (Corl et al, 2001; Griinari et al, 2000; Looor et al, 2005) e di, cis-9- trans-7 (Corl et al, 2002). La regione promotore del gene SCD bovina è stata recentemente caratterizzata (Keating et al, 2006), sono stati identificati 8 Single Nucleotide polimorfismi (SNPs), 3 di loro in esone 5. I primi due sono in una mutazione silente, mentre la terza causa un cambio amminoacidico della valina con l'alanina al nucleotide 293 (GenBank AY241933; Taniguchi et al. 2004). Questo determina la presenza di due aplotipi che potrebbero avere diversa attività a causa del fatto che il cambiamento amminoacidico avviene in corrispondenza della zona catalizzatore. Medrano et al. (1999) hanno dimostrato l'influenza del gene SCD sul profilo acido della carne grassa. Infatti, l'aplotipo con alanina, provoca un elevato contenuto di acidi grassi monoinsaturi (MUFA) rispetto a quello la valina.

Riguardo i bufali, pochi dati sono disponibili in letteratura sul gene SCD. Il gene SCD nel bufalo si estende approssimativamente per 15.5 kb (EMBL Acc. No. AM600640). Anche in questa specie il polimorfismo del gene SCD sembra influenzare la sua espressione nella ghiandola mammaria (Moioli et al, 2005) e tessuto muscolare (Pauciullo et al, 2007). Secondo alcuni autori (Pauciullo et al, 2010) che hanno caratterizzato (bufalo mediterraneo) il gene dell'SCD, mostra 15 siti polimorfici, uno dei quali al nucleotide 231 dell'esone 5, che è responsabile di un cambiamento amminoacido (GCGAla - GTGVal). Analogamente a quanto già osservato nei bovini, tale transizione potrebbe essere associata ad un diverso contenuto di MUFAs nel latte di bufala e carne.

Nei roditori, la regolazione dell'espressione genica dell'SCD dipende da fattori dietetici, infatti gli acidi grassi sono stati ampiamente studiati nel fegato e nel tessuto adiposo (Ntambi, 1999) e, in misura minore nella ghiandola mammaria in lattazione (Singh et al, 2004). In queste specie, l'SCD dipende da diversi geni la cui espressione è tessuto-specifica, nonché dalla down-regolazione da parte dei PUFA (Ntambi, 1999). Mentre nella pecora (Ward et al, 1998) e capra (Bernard et al, 2001) vi è un solo gene SCD, e secondo Bernard et al. (2005) è possibile che nei ruminanti la ghiandola mammaria e il tessuto adiposo siano meno sensibili alla manipolazione dietetica da parte dei PUFA.

Ci sono vari metodi per saggiare l'attività dell'SCD, ma quello che sembrerebbe dare maggiore riscontro è valutare il rapporto C14:1/C14:0, in funzione del fatto che il C14:0 del latte deriva quasi esclusivamente dalla sintesi mammaria e, di conseguenza, la quasi totalità dell'acido miristoleico presente deriva della sintesi mammaria, per azione appunto dell'SCD (Bernard et al, 2006).

Il sito di sintesi endogena dei CLA varia a seconda dello stato fisiologico degli animali, tanto che nei ruminanti in fase di accrescimento sembra essere il tessuto adiposo, mentre in quelli in fase di lattazione è rappresentato dalla mammella (Bauman et al, 2001).

Come più volte ricordato i CLA sono un pool di acidi grassi ed i più rappresentati negli alimenti ottenibili dai ruminanti (carne e latte) sono il *cis9*, *trans11* ed il *trans10*, *cis12*. I siti di sintesi endogena di questi 2 isomeri sembrano poter essere diversi. In effetti, date le conoscenze attuali, si può affermare che il C18:2 *cis9*, *trans11* possa essere sintetizzato sia a livello ruminale, che tissutale, mentre l'unico possibile sito di sintesi del *trans10*, *cis12* (e di tutti gli altri isomeri eventualmente presenti) pare essere il rumine.

Fattori che influenzano la composizione acidica nel latte

Il contenuto in grasso del latte è il componente maggiormente variabile sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo, dipende dallo stadio di lattazione, dalla stagionalità, dal tipo di pascolo, dal genotipo e dall'alimentazione.

L'alimentazione rientra fra le più importanti cause di variazione, sia perché condiziona la produzione ruminale di acidi grassi liberi necessari per la sintesi de novo della frazione a corta e media catena, sia perché gli acidi grassi che compongono la frazione a lunga catena provengono dai lipidi della dieta. L'alimentazione dei ruminanti in lattazione contiene in genere dal 4 al 5% in grasso. Livelli più elevati possono influire negativamente sulle fermentazioni microbiche ruminali per cui generalmente è consigliato un apporto totale di grassi con la dieta non superiore al 6-7% della sostanza secca (Jenkins, 1993; Doreau, 1997; NRC, 2001).

Nella dieta dei ruminanti fonti primarie di lipidi sono foraggi e concentrati, ma la percentuale di grasso può essere aumentata con l'uso di integratori. I foraggi possono contenere dal 4 al 6% del peso secco di lipidi, di cui la classe maggiormente rappresentata è quella dei glicolipidi (Harfoot, 1981). I concentrati presentano un contenuto lipidico generalmente superiore a quello dei foraggi con una concentrazione di trigliceridi maggiore. Gli integratori lipidici sono sottoprodotti delle industrie di raffinazione degli oli vegetali, contenenti lipidi prevalentemente sotto forma di trigliceridi.

Le capre rispondono in modo evidente e specifico alle variazioni dell'alimentazione che hanno lo scopo di modificare la componente lipidica del latte. Diete ricche di concentrati o integrate con oli, determina quasi sempre un aumento del tenore lipidico del latte e del contenuto in trans10 C18:1, a differenza di quanto osservato normalmente nelle bovine (Chilliard, 2007). Secondo alcuni studi, una diminuzione della sintesi di grasso del latte sembra essere correlata all'isomero trans10,cis12 CLA che potrebbe abbassare i livelli di mRNA codificanti per alcuni enzimi responsabili per l'assorbimento, il trasferimento e la

sintesi de novo di acidi grassi nella ghiandola mammaria (Bauman, 2001, 2003). Anche la somministrazione di olio di pesce può causare depressione del tenore lipidico del latte, ad opera di prodotti intermedi (trans-AG) della bioidrogenazione ruminale dei PUFA che inibirebbero la sintesi lipidica a livello mammario (Cattaneo, 2006). Alimentando le capre con olio di pesce e alghe marine è possibile aumentare i livelli di n-3 del latte, che solitamente nelle capre sono estremamente bassi (meno di 0.1g/100g di AG). Infatti le diete normalmente impiegate non contengono EPA e DHA, se non a livelli infinitesimali. L'efficienza di trasferimento di acidi grassi n-3 nel latte può essere aumentata (rispettivamente del 14 e del 7% per EPA e DHA), somministrando acidi grassi protetti dalla bioidrogenazione ruminale.

Il latte prodotto da animali al pascolo presenta anche un arricchimento naturale in acidi grassi n-3, rispetto ad animali alimentati con fieno o insilati. Lo stadio di maturazione del foraggio risulta l'elemento chiave, infatti l'erba risulta particolarmente ricca di precursori lipidici soprattutto se in stadio vegetativo iniziale. Molti studi hanno riportato per gli animali allevati al pascolo anche un valore più favorevole del rapporto tra acidi grassi n-6/n-3, significativamente più basso rispetto a quelli allevati in stalla (Santos-Silva, 2002; Priolo, 2005; D'Urso et al, 2008; Tudisco et al, 2010, 2012, 2014).

Un arricchimento "naturale" del latte in CLA è ottenibile mediante pascolo e impiego di foraggi freschi. Il pascolo giovane può incrementare il tenore di CLA nel latte di 2-3 volte, ma l'effetto diminuisce all'avanzare dello stadio di maturazione della vegetazione. Per innalzare il tenore in CLA nel latte caprino si possono impiegare semi di oleaginose o oli vegetali ricchi in linoleico e linolenico, come l'olio di semi di soia, di lino e di girasole. Risultati significativi sono stati ottenuti impiegando anche oli di origine marina. Infatti, sebbene l'olio di pesce contenga un minor livello di precursori lipidici dell'acido vaccenico o di CLA rispetto agli oli vegetali, è stata riscontrata una sua buona efficacia nell'innalzare il livello di CLA nel latte dovuto a un'alterazione dell'ambiente

ruminale. In particolare, gli oli di origine marina sembrano inibire la riduzione finale del trans11 C18:1 con accumulo di C18:0 a livello ruminale. Gli oli vegetali non vengono normalmente impiegati nelle diete per ruminanti poiché causano inibizione dell'attività dei microrganismi ruminali, per cui normalmente si somministrano grassi protetti sotto forma di sali di calcio degli AG, oppure semi integrali sottoposti a trattamenti termo-meccanici (estrusione, tostatura ecc.), che risultano efficaci nell'innalzarne il contenuto in CLA. Il contenuto in CLA del latte può essere aumentato attraverso l'alimentazione in due differenti modi: a) fornendo una dieta con maggior quantità di precursori lipidici (C18:3 e C18:2) utili alla produzione di CLA o di acido vaccenico a livello ruminale; b) somministrando fattori dietetici in grado di alterare l'ambiente ruminale e l'attività dei microrganismi responsabili del processo bioidrogenativo, favorendo l'accumulo di trans11 C18:1 (Chilliard, 2007; Mele, 2006; Nudda, 2006). Inoltre un'alimentazione ricca in concentrati è in grado di aumentare il gusto tipico del latte di capra. Il latte prodotto da animali alimentati al pascolo e al chiuso presenta differenze nel sapore e nel gusto, che variano anche in funzione della fase di lattazione, meno pronunciato all'inizio e alla fine della lattazione e molto più evidente durante il picco di lattazione (Trygve Skjvedal, 1979).

Latte di capra

Il latte di capra presenta caratteristiche qualitative e nutrizionali di rilevante interesse sia sotto l'aspetto nutrizionale che di composizione. Il latte di capra è stato ampiamente consigliato per il consumo diretto, soprattutto per categorie "sensibili" di consumatori che presentano ad esempio intolleranza alle proteine del latte vaccino. Date le ben note proprietà ipoallergeniche il latte di capra può essere utilizzato come alternativa al latte vaccino nei casi di allergia (Park, 1994; Freund, 2000; Haenlein, 2004). Tuttavia, i benefici terapeutici variano a seconda

del grado di severità delle allergie. Alcuni studi hanno rivelato allergicità anche in seguito all'utilizzo di latte di capra, pertanto il beneficio sarebbe ridotto solo a circa il 60% dei casi (El-Agamy, 2007).

La composizione chimico-fisica del latte di capra è differente rispetto a quella delle altre specie zootecniche ad attitudine lattifera. La frazione lipidica del latte di capra si distingue per la minor dimensione dei globuli di grasso rispetto a quelli della specie bovina (Attaie e Richter, 2000) e un maggior contenuto in Acidi Grassi a Corta e Media Catena (SMCFA). Questo permette di avere una maggiore superficie esposta, favorire la lipolisi, rendendo il latte di capra più facilmente digeribile (Chilliard, 2003; Haenlein, 2004). Per contro, questa peculiarità comporta maggiori problemi nella caseificazione dal momento che i globuli di grasso vengono inglobati meno facilmente all'interno del reticolo caseinico, ottenendo rese inferiori e una più rapida maturazione del formaggio (Park, 2007). La composizione chimica e il valore nutritivo del latte di capra è influenzato da vari fattori. L'azione delle lipasi nel latte di capra è particolarmente importante per la produzione di Acidi Grassi Liberi (FFA). Il minor volume dei globuli di grasso del latte di capra favorisce l'azione delle lipasi e la produzione di Acidi Grassi a Corta e Media Catena (SMCFA), più suscettibili rispetto a quelli a Lunga Catena (LCFA) all'azione di questi enzimi (Matsushita, 2007; Pandya and Ghodke, 2007; Strzałkowska, 2009). L'azione delle lipasi è influenzata da vari fattori quali lo stadio di lattazione, lo stato di salute della ghiandola mammaria, la nutrizione, lo stato generale dell'animale, le caratteristiche genetiche della razza di appartenenza e può avvenire già dalle prime fasi dopo la raccolta del latte (Grousclaude, 1994; Pizzillo, 2005). Gli FFA a media e corta catena sono rilasciati per azione di lipasi differenti, endogene o esogene di natura microbica (Grousclaude, 1994; Pizzillo, 2005), e potrebbero essere la causa della formazione dell'aroma ircino, un sapore particolare, spesso considerato come indesiderato (Mallatou, 2003). Secondo Eknes et al. (2009) quando i livelli di concentrazione di Acidi Grassi Liberi (FFA) del latte superano le 2.0 mmol/l, il

caratteristico aroma caprino diventa più intenso e il latte inaccettabile per il consumatore.

Gli acidi grassi maggiormente abbondanti nel latte di capra sono l'acido palmitico (16:0), l'acido miristico (14:0) e l'acido caprinico (10:0) tra gli Acidi Grassi Saturi (SFA), mentre l'acido oleico (18:1 n-9) risulta il più concentrato tra gli Insaturi (UFA) (Zan, 2006). In particolare, gli acidi grassi più caratteristici del latte dei ruminanti sono l'acido butirrico (4:0) e il caproico (6:0), volatili, solubili in acqua, che rappresentano circa il 5% del totale (Ceballos, 2009). Gli acidi grassi con catena carboniosa a numero dispari sono presenti solo in tracce. Anche la presenza degli SCFA favorisce la digestione del latte di capra. Infatti gli SCFA non seguono la via metabolica tipica degli acidi grassi con maggior numero di atomi di carbonio, che prevede il loro preventivo rilascio nel circolo linfatico sotto forma di aggregati lipoproteici (chilomicroni), ma sono assorbiti direttamente dalla mucosa intestinale e da qui veicolati al fegato.

Un ruolo di primaria importanza è stato attribuito all'acido butirrico (4:0), cui alcuni studi riconoscono un ruolo protettivo della mucosa del colon (Parodi, 1999). Gli Acidi Grassi a Media Catena (MCFA) assolvono, invece, principalmente funzioni metaboliche ed energetiche, anche se all'acido laurico (12:0), miristico (14:0) e palmitico (16:0) è stato attribuito un effetto ipercolesterolemico, dovuto all'aumento del colesterolo LDL. L'acido laurico (12:0) e palmitico (16:0) sono considerati a media nocività per la salute umana, a differenza del miristico 14:0, considerato il peggiore di tutti per la sua nocività (Ulbricht, 1991). L'acido stearico (18:0), anch'esso abbondante nel latte di capra, al contrario sembra essere neutrale e non avere un effetto aterogenico, nonostante la sua natura di Acido Grasso Saturo (Mensink, 1998).

MiRNA

Notevole interesse suscitano i rapporti tra dieta e microbioma intestinale; nel caso dei ruminanti l'attenzione viene posta anche alle micro popolazioni batteriche, fungine e protozoarie presenti nel rumine stesso.

L'impiego di tecnologie high-throughput definite "omiche," ha consentito l'approfondimento delle conoscenze sui fenomeni che sovrintendono all'ingestione di sostanze nutritive nonché alla loro assimilazione e, da ultimo, sui meccanismi che regolano il metabolismo a livello molecolare. Ad esempio, elemento fondante la attualissima scienza della nutrigenomica, è risultato la determinazione dell'espressione genica (Fenech et al. 2011). Recentemente, molecole di RNA non codificanti dotati di funzioni di regolamentazione sono stati scoperti negli organismi procarioti ed eucarioti. Nei batteri, esse vengono trascritte come piccoli RNA (dimensione che varia da 35 a 300 nucleotidi) e mediante appaiamento delle basi, sono in grado di modulare la traduzione e/o la stabilità di mRNA target o di modificare l'attività della proteina (Thomason et al. 2010). Negli eucarioti, sono stati individuati due classi principali di RNA regolatori: microRNA (miRNA) e piccoli RNA silence (siRNA). Malgrado abbiano dimensioni simili (19-24 nucleotidi), essi differiscono nella loro biogenesi. Mentre i siRNA sono generati da molecole precursori di RNA a doppio filamento derivatida mRNA, DNA eterocromatico, DNA virale, o trasposoni, i miRNA vengono elaborati dalle regioni stem-loop da precursori di trascrizione (Carthew et al. 2009).

I microRNA (miRNA) sono delle piccole molecole di RNA a singolo filamento non codificante, lunghi circa 22 nucleotidi; per la prima volta scoperti nel nematode *Caenorhabditis elegans* (Lee et al. 1993, Wightman et al. 1993), sono espressi nel genoma di molti eucarioti e alcuni virus, sono filogeneticamente molto ben conservati, e hanno un elevato potere di specificità tissutale e per i diversi stadi di sviluppo.

I miRNA di solito sono trascritti dalla RNA polimerasi II, mentre un numero ristretto di miRNA associati a sequeze ripetute (Alu) vengono trascritti ad opera della RNA polimerasi III (Borchert et al. 2006), dando luogo a lunghi precursori di miRNA che sono ricoperti e poliadenilati, chiamati miRNA primari (pri-miRNA), che si piegano in una struttura a forcina. Questa struttura a doppio filamento RNA è riconosciuto tramite DGCR8 e collegate nel nucleo con l'enzima RNasi III Droscha per formare il complesso 'microprocessore'. L'interazione tra il pri-miRNA e il complesso microprocessore libera le regioni a gomito, con l'adesione del pri-miRNA, causando la formazione dei pre-miRNA (miRNA precursore) della lunghezza di 70-100 nucleotidi. I Pre-miRNA vengono poi esportati dal nucleo per mezzo dell'esportina-5 nel citoplasma, dove, il pre-miRNA viene scisso dall'enzima Dicer, ottenendo un RNA a doppio filamento, il miRNA:miRNA* duplex, di circa 22 nucleotidi di lunghezza. In generale, entrambi i filamenti del duplex possono diventare un miRNA maturo, la scelta dipende dalla stabilità termodinamica dell'estremità del dsRNA (Avril-Sassen et al. 2009), quindi solo un filamento viene incorporato in RISC, un complesso proteico che induce il silenziamento dell'RNA, composto da Argonaute, che lega il filamento miRNA che diventerà maturo e lo orienta per facilitare l'interazione con l'mRNA bersaglio, mentre l'altro filamento, detto filamento passeggero o miRNA*, verrà degradato da parte di una elicasi. (Figura 1).

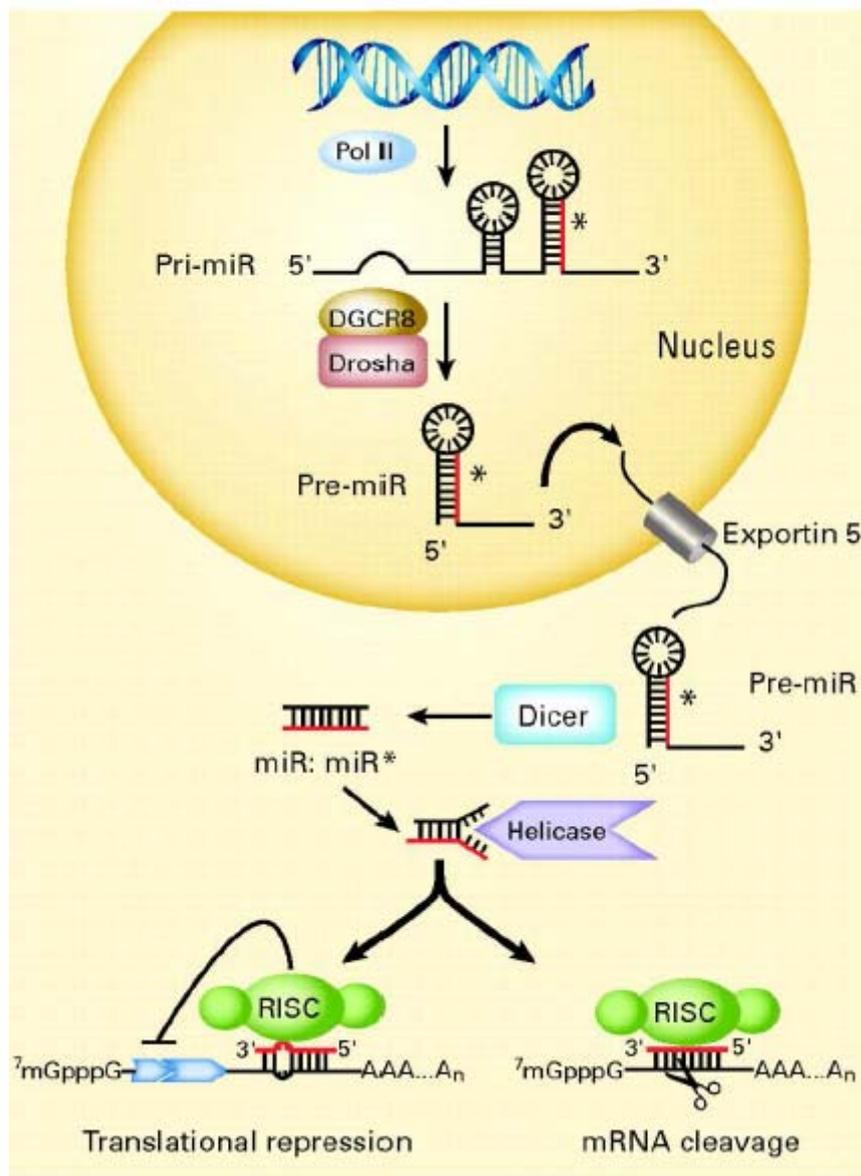


Figura 1. Biogenesi, processazione e maturazione dei microRNA (miR). (Figura da: Iorio, MV et al. J Clin Oncol. 2009. 27:5848-5856).

I miRNA di solito regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale, legandosi nel complesso RISC, al 3' UTR dell'RNA messaggero (Fang et al. 2011). Come ad esempio avviene anche nelle piante per la scissione dell'mRNA

bersaglio, mentre negli animali è controllato a inizio traduzione (Carthew et al. 2009). Inoltre, i miRNA possono agire a livello trascrizionale, in quanto il legame dei miRNA a regioni promotrici è in grado di innescare il cosiddetto silenziamento genico trascrizionale dei geni nucleari, mostrando che attraverso processi citoplasmatici miRNA possono essere trasportati al nucleo (Zhang et al. 2011). È stato calcolato che quasi il 60% di tutti gli mRNA mammiferi rappresentano bersagli miRNA (Friedman et al. 2009). Inizialmente, i miRNA sono stati pensati per essere principalmente coinvolti nella regolazione dello sviluppo e del destino delle cellule, ma l'identificazione di miRNA supplementari e dei loro geni bersaglio ha portato a capire che i miRNA partecipano a una vasta gamma di processi come il ciclo cellulare, morte cellulare programmata, differenziazione cellulare, lo sviluppo, l'invasione, metastasi e angiogenesi del tumore. Recentemente, alcuni miRNA che sono stati identificati si è visto essere coinvolti nella rilevazione dello stress di nutrienti nelle piante (Chiou 2007), quindi indubbiamente, i miRNA sono fattori importanti nella risposta allo stress ambientale in quanto aiutano a ripristinare l'omeostasi in caso di improvvisi cambiamenti ambientali o, se la condizione di stress è grave e di lunga durata, rappresentano uno dei meccanismi usati per riprogrammare l'espressione genica in modo che le cellule possono adattarsi ad un ambiente che cambia (Holtz et al. 2009, Leung et al. 2010). La scoperta dei microRNA risale, quindi, al 1993, quando analizzando le larve del *C. elegans*, dei ricercatori notarono una mutazione dei geni *lin-4* e *let-7* a causa della quale i vermi non riuscivano ad ultimare la successiva fase di accrescimento (Lee et al. 1993), nel 2000 poi scoprirono che il *let-7* si lega al 3' UTR di *lin-41* e *hbl-1*, altri mRNA la cui inattivazione è necessaria per lo sviluppo (Reinhart et al. 2000); negli ultimi anni poi è cresciuto sempre più l'interesse per i miRNA nel campo della biologia cellulare, evidenziando la loro capacità di regolare l'espressione genica. I miRNA rappresentano circa l'1-5% del genoma di diverse specie e che ognuno di loro possiede sequenze conservate o non conservate in centinaia di differenti

geni bersaglio, ma controllano il 10-30% dell'espressione genica (Bartel 2004). Attualmente, i miRNA sono stati descritti negli animali, piante e virus attraverso analisi computazionali (Brown and Sanseau 2005) ed analisi di sequenze genomiche ed EST (Zhang et al. 2005, Zhang et al. 2006) e negli umani ad oggi sono stati scoperti circa 2000 miRNA. I miRNA sono importanti per la regolazione dello sviluppo tissutale (Tanaka et al. 2009, Krichevsky et al. 2003), la differenziazione cellulare (Sun et al. 2011, Xiao et al. 2007), il metabolismo dei lipidi (Jennifer et al. 2012, Esau et al. 2006), la risposta immunitaria (Taganov et al. 2006, Rodriguez et al. 2007), e la risposta allo stress ossidativo (Sangokoya et al. 2010). Circa il 50% dei geni codificanti i microRNA (geni miRNA) è situato in regioni intergeniche del genoma umano e spesso questi cluster di microRNA sono trascritti come singola unità trascrizionale (TU) policistronica (Lee et al. 2002), unità trascrizionali indipendenti con un promotore e segnali di poliadenilazione, mentre circa il 40% ricade all'interno di sequenze introniche di geni che codificanti per proteine o per sequenza non codificanti e il 10% invece è situato in regioni esoniche. Alcuni loci di miRNA vengono definiti 'misti', poiché la loro localizzazione è intronica o esonica a seconda del pattern di splicing (Kim et al. 2009). (Figura 2)

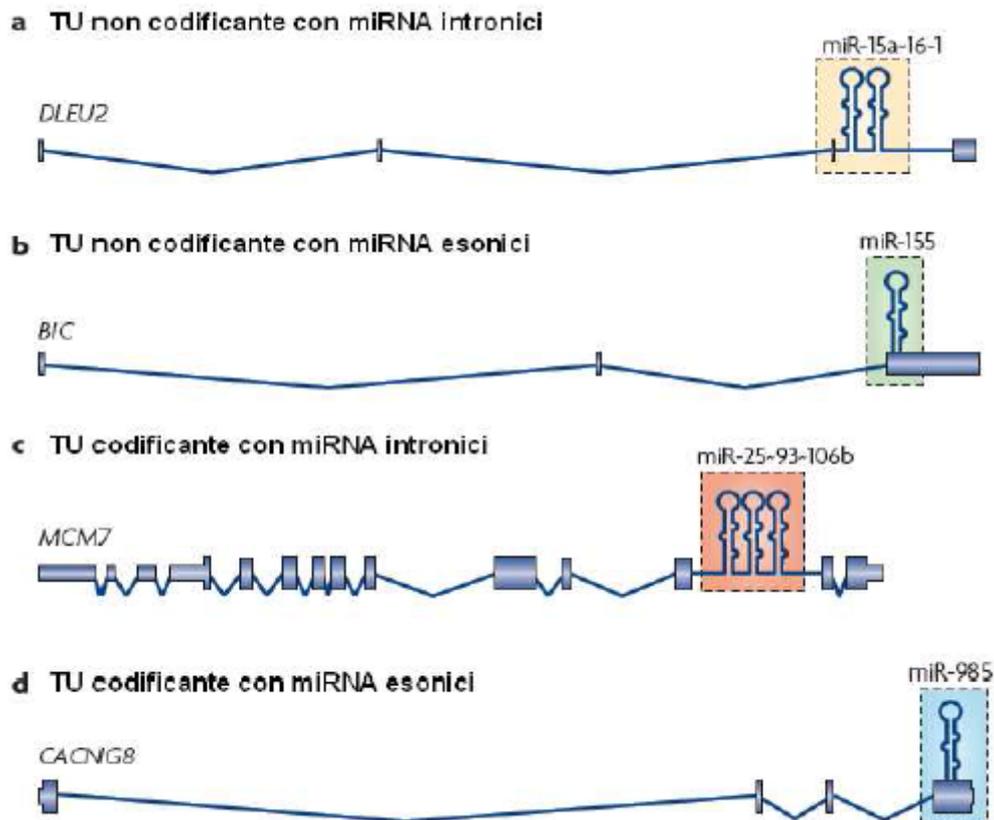


Figura 2. Localizzazione genomica e struttura dei microRNA. (Figura da: Kim, VN. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009. 10: 126-39).

Tuttavia cruciale resta l'identificazione del bersaglio in quanto la complementarità parziale tra il bersaglio e l'mRNA, e quindi la presenza di isoforme geniche multiple (paraloghi) ha reso difficile l'identificazione degli obiettivi per ogni miRNA, infatti basta pensare che il genoma umano possiede 12 loci genici per il miRNA let-7. Notevoli progressi sono stati fatti negli ultimi anni per l'identificazione di sequenze caratteristiche rilevanti per indirizzare la previsione, come la "seed sequence" all'estremità 5' del miRNA nonché il

contesto della sequenza circostante il sito di legame della trascrizione bersaglio (Bartel, 2009), poiché questi sei nucleotidi ‘*seed sequence*’ sono cruciali per l’appaiamento con l’ mRNA bersaglio, si pensa che i geni paraloghi agiscano in maniera ridondante. In realtà, essendo anche la porzione 3’ dei miRNA importante per l’appaiamento con l’ mRNA bersaglio, e poiché questi miRNA hanno spesso pattern di espressione differenti, membri della famiglia con la stessa ‘*seed sequence*’ possono avere ruoli distinti *in vivo* (Ventura et al. 2008).

Alcuni miRNA sono molto abbondanti, più di 10000 copie per cellula (Lim et al. 2003), mentre altri sono più difficili da rilevare attraverso le tecniche di ibridazione del RNA totale (Ambros 2004). L’espressione dei microRNA è regolato durante lo sviluppo e generalmente è un meccanismo tessuto specifico, infatti, esistono microRNA organo-specifici come il miR-122 nel fegato ed il miR-124 nel cervello che non sono presenti in altri tessuti, mentre vi sono miRNA particolarmente abbondanti in un tessuto, come il miR-1 nel tessuto muscolare scheletrico (Sempere et al. 2004), che tuttavia possono essere ritrovati anche in altri tessuti. L’elevata conservazione di questi microRNA organo-specifici tra le varie specie animali ha permesso di intuire che essi potrebbero giocare un ruolo ben preciso e filogeneticamente conservato nella costituzione e/o mantenimento di un tipo cellulare o tissutale di un determinato organo. A questo proposito, è interessante notare che i miRNA sono stati individuati solo in organismi multicellulari, mentre sono assenti in organismi unicellulari, e potrebbero perciò essere essenziali per il differenziamento dei vari tipi di tessuto e per il mantenimento dello stato differenziativo. Vi sono infatti evidenze sperimentali che dimostrano l’importanza dei miRNA nello sviluppo precoce e tardivo dei vertebrati (Wienholds and Plasterk 2005). Negli ultimi anni suscita sempre maggiore interesse lo studio del ruolo dei microRNA nel controllo di processi come lo sviluppo, la fisiologia e la patologia animale. Ed è proprio riguardo ciò che risulta essere importante individuare e caratterizzare i bersagli e i pathway molecolari regolati dai miRNA per rendere più chiaro l’ampio spettro

di azioni biologiche esercitate dai microRNA. Accanto all'analisi genetica, è quindi necessario eseguire un'accurata analisi computazionale ed una successiva analisi funzionale in vitro. L'analisi in silico, invece, prevede l'utilizzo di algoritmi bioinformatici che si basano su programmi di allineamento che consentono di individuare sequenze conservate di 7-8 nucleotidi con un'elevata complementarità alle 'seed sequence' dei miRNA ed un'alta stabilità termodinamica, con punteggi che variano da 0 a 100, dove 0 indica l'assenza di complementarità e 100 la perfetta complementarità. In seguito all'analisi in silico bisognerà poi effettuare un'analisi funzionale in vitro, con lo scopo di dimostrare l'effettiva regolazione dei geni bersaglio da parte dei miRNA, e con l'uso di geni reporter è possibile dimostrare l'interazione diretta tra il miRNA ed il sito complementare presente nel 3'UTR dell'mRNA bersaglio.

Di recente, diversi autori hanno effettuato indagini sul ruolo svolto da alcuni miRNA nella ghiandola mammaria di vacche (Gu et al. 2007, Hou et al. 2010, Li et al. 2012, Wang et al. 2012) e capre in lattazione (Ji et al. 2012a, Ji et al. 2012b) nonché sulla presenza degli stessi nel latte (Hata et al. 2010, Izumi et al. 2012). Il profilo dei miRNA è risultato differente nella ghiandola mammaria in funzione dello stadio di lattazione (Hata et al. 2010) e di particolare interesse sarebbero il miR-27, il miR-33 e il mir-103 coinvolti nella regolazione del metabolismo dei lipidi nel tessuto adiposo.

CAPITOLO 2

Primo Contributo Sperimentale

INTRODUZIONE

L'aggiunta di lipidi alla dieta dei ruminanti fornisce energia e può modificare il profilo degli acidi grassi nel latte (Chilliard et al, 2000; Schmidely e Sauvant, 2001; Kott et al, 2003; Manso et al, 2011). Ciò è di grande importanza per gli effetti benefici di alcuni acidi grassi a lunga catena sulla salute umana. Tra gli altri, particolare interesse rivestono gli isomeri dell'acido linoleico coniugato (CLA), e soprattutto il cis-9,trans-11 C18:2 trans o acido rumenico (RU, fino all'80% del totale CLA) cui vengono attribuite proprietà immunomodulanti, antitumorali e anti-aterosclerosi (Pastushenko et al, 2000; Whigham et al., 2000).

I CLA del latte derivano dalla isomerizzazione e bioidrogenazione di acidi grassi insaturi [acido linolenico (C18: 3 ω -3) e linoleico (C18: 2 ω -6)] ad opera dei batteri del rumine nonché dall'attività dell'enzima Stearoyl-CoA desaturasi (SCD) nella ghiandola mammaria sul trans-11 C18:1 (VA, acido vaccenico), prodotto intermedio della bioidrogenazione di vari acidi grassi poliinsaturi (PUFA). L'SCD, inoltre, gioca un ruolo importante nella biosintesi degli acidi grassi monoinsaturi (MUFA) introducendo un doppio legame cis tra gli atomi di carbonio 9 e 10 in uno spettro di acidi grassi saturi (SFA), principalmente il miristico (C14:0), il palmitico (C16:0) e lo stearico (C18:0). La concentrazione nel latte degli acidi rumenico e vaccenico è principalmente influenzata dalla dieta; essa, infatti, aumenta con l'integrazione con fonti lipidiche contenenti acidi grassi insaturi (Khanal and Olson, 2004). Negli ultimi anni numerosi studi hanno dimostrato un aumento del contenuto di CLA nel latte di bovine alla cui dieta erano stati aggiunti olii vegetali ricchi di C18:2 (Bell et

al, 2006; Huang et al, 2008). Anche indagini condotte su piccoli ruminanti riportano un aumento del contenuto di VA e RU nel latte (Zhang et al, 2006; Bouattour et al, 2006; Castro et al,2009) aggiungendo alla dieta olii ricchi di PUFA, come quelli di girasole, di soia e di palma idrogenato.

Per quanto riguarda l'influenza della dieta sull'espressione del gene che codifica per l'SCD, indagini condotte sulle capre hanno rivelato che la supplementazione a diete a base sia di fieno (Bernard et al, 2009a) che di insilato di mais (Bernard et al, 2009b) di olii ricchi di acido oleico (Bernard et al, 2005a) o di acidi linoleico e linolenico non ha prodotto alcun effetto. Risultati simili sono stati riportati da Bernard et al. (2005b) con diete a base di fieno di erba medica cui era stata aggiunta soia. Al contrario, l'mRNA dell'SCD mammario è risultato minore con diete a base di fieno integrate con semi di lino (Bernard et al, 2005a). Recentemente, Bernard et al. (2012) non hanno rilevato influenza del livello e del tipo di concentrato aggiunto a diete contenenti olio di semi di girasole sull'espressione del gene che codifica per l'SCD. Risultati simili sono stati riportati da Zhu et al. (2013) con l'aggiunta di olio di aglio a una dieta a base di insilato di mais.

In letteratura sono reperibili solo poche indagini volte a valutare l'influenza dell'aggiunta di olio di palma alla dieta, sui profili metabolici e, di conseguenza, sugli effetti riproduttivi e sanitari degli animali.

L'aggiunta dei lipidi alla dieta porta ad un aumento della produzione di latte (Oliveira et al, 2012); quest'ultima potrebbe indurre un bilancio energetico negativo con successiva diminuzione sia produttiva che dell'attività riproduttiva. Al fine di scongiurare tale evenienza, viene aumentata la densità energetica della dieta anche per compensare la diminuita ingestione di alimento durante il periodo post-partum (Butler and Canfield, 1989). Secondo Agazzi et al. (2010), l'aggiunta di olio di palma alla dieta di capre nel periodo di transizione (21 giorni prima fino a 21 giorni dopo il parto), non determina modificazioni significative del livello dei metaboliti plasmatici, fatta eccezione per il NEFA, e degli enzimi

epatici, tranne che per l'ALT e soltanto nelle prime 3 settimane. Bianchi et al. (2014), nel siero di pecore la cui dieta presentava il 6% di olio di palma, hanno osservato per un periodo di 120 giorni aumento della attività dell'AST e della GGT, mentre con l'aggiunta del 4% dello stesso olio, registrarono aumento significativo del contenuto di urea, di colesterolo, di trigliceridi e dei livelli di progesterone.

Scopo della presente indagine, effettuata su capre appartenenti al tipo genetico Cilentana, è stato quello di studiare gli effetti della somministrazione di olio idrogenato di palma (HPO; 50g/giorno/capo) sulla produzione di latte, sulla sua composizione chimica nonché sul profilo acidico del grasso e sull'espressione del gene che codifica per la Stearoyl-CoA desaturasi. Si è voluto, inoltre, valutare l'influenza di tale integrazione alla dieta su alcuni metaboliti e sulla concentrazione serica di enzimi epatici e renali nonché su quella di progesterone.

L'olio di palma, impiegato nella preparazione di alimenti da oltre 5.000 anni, si ottiene dal frutto dell'albero della palma e le sue proprietà nutrizionali sono ben documentate (Chandrasekharan et al. 2000). Secondo la Malaysian Oil Palm Statistics nel 2005, la sua produzione è risultata superiore a quella dell'olio di soia. Dall'albero della palma (*Elaeis Guineensis*) si ottengono sia l'olio di palma che quello di nocciolo di palma (estratto dai semi di frutta); Malesia e Indonesia detengono l'83% della produzione e l'89% delle esportazioni mondiali.

In particolare nei Paesi in via di sviluppo, l'impiego degli oli vegetali è in continuo aumento a discapito dei grassi animali (Chandrasekharan 1999); l'olio di palma non determinerebbe rischi per le malattie cardiovascolari se consumato in quantità moderata e inserito in una dieta equilibrata (Pedersen et al. 1999).

Negli ultimi decenni il concetto di dieta ha subito notevoli cambiamenti, soprattutto per quanto riguarda la sua frazione lipidica con aumento del consumo di acidi grassi trans e acido linoleico e diminuzione di quello di acidi grassi saturi, in particolare di acido laurico. Diversi studi epidemiologici attribuiscono ai livelli elevati di colesterolo serico, conseguenza dell'assunzione di grassi saturi, un aumento del rischio di malattia coronarica (CHD) (Roche 2000).

I grassi alimentari sono composti principalmente da trigliceridi (TAG); pertanto, dopo la digestione di un pasto, vi è un aumento significativo della loro concentrazione plasmatica, e il loro livello è un fattore importante nella patogenesi della malattia coronarica. Una correlazione positiva tra i livelli plasmatici di TAG e rischio di malattia coronarica è stata trovata nelle donne e nei diabetici, mentre i giapponesi rappresentano la popolazione con più elevati livelli di LDL (Betterbridge 1999; Mann 1993). Elevate concentrazioni di TAG post-prandiali e la diminuzione del colesterolo HDL sono considerati fattori aterogenici (Patsch 1994; Cohn 1994; Roche e Gibney 1995). Aterosclerosi e trombosi sono i due processi fisiopatologici chiave, che portano allo sviluppo di CHD.

Nonostante un profilo acido caratterizzato da una considerevole presenza di acidi grassi saturi (acido palmitico: 44%; acido stearico: 5%), non si sono riscontrate differenze sulla concentrazione di colesterolo serico quando l'olio di palma ha sostituito altri grassi ed olii nella dieta. L'olio di palma aumenta il colesterolo plasmatico solo se presente in eccesso; al contrario esso sembra stimolare la sintesi del colesterolo HDL e la rimozione di quello LDL, ed è inoltre ricco di vitamina E (in particolare i tocotrienoli). Di rilievo anche i contenuti di vitamina K, magnesio e coenzima Q10. L'olio di palma contiene, infine, circa il 10% di acido linoleico, acido grasso insaturo essenziale della serie omega-6.

Anche la forma di assunzione dell'olio di palma ne può modificare le proprietà salutari. Diverse indagini effettuate in varie specie animali e sull'uomo

hanno messo in evidenza il ruolo positivo dell'olio di palma fresco con riduzione del rischio di trombosi arteriosa e di aterosclerosi, inibizione della biosintesi del colesterolo e dell'aggregazione piastrinica e riduzione della pressione sanguigna. Tuttavia, se utilizzato allo stato ossidato, l'olio di palma induce un effetto negativo sul profilo lipidico del plasma, sugli acidi grassi liberi e sui fosfolipidi (Ebong et al. 1999). In uno studio condotto confrontando l'olio di palma con quelli di soia, arachidi e con lardo ha dimostrato che il primo aumentava i livelli serici di colesterolo HDL e riduceva quelli di LDL (Zhang et al, 1997 citato da Koh 2007) in accordo con quanto riportato anche da Hornstra (1990) e Enig (1993). Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (2003), infine, non esistono prove sufficienti che attestano che il consumo di olio di palma contribuisce ad un aumento del rischio di sviluppare malattie cardiovascolari.

MATERIALI E METODI

Animali, diete e management

La prova è stata eseguita rispettando la direttiva 2010/63 /UE sul benessere degli animali e la buona pratica clinica. In una azienda sita in provincia di Salerno, a 832 m sul livello del mare, 30 capre Cilentane gravide terzipare ($50,3 \pm 2,0$ kg di peso vivo, PV) sono state suddivise in due gruppi omogenei (C, controllo, e P) per produzione di latte nella lattazione precedente (1450 ± 120 g/capo/die). I soggetti sono stati alloggiati in due stalle separate e alimentati ad libitum con fieno di avena e 100, 200 e 300 g/capo/die di concentrato rispettivamente a 45, 30, e 15 giorni prima del parto (fase della gravidanza accertata mediante ultrasonografia).

Dopo il parto (prima settimana di febbraio), il fieno d'avena è stato sostituito da fieno di erba medica somministrato in ragione di 1.2 kg/capo /die mentre il concentrato è stato gradualmente aumentato fino a 500 g/capo/die. Il gruppo P ha ricevuto, in aggiunta, 50 g/capo/die di olio di palma idrogenato (HPO, Mazzoleni, Prodotti Zootecnici, Cologno al Serio, Bergamo, Italia). La composizione chimica degli alimenti è stata analizzata secondo Van Soest et al. (1991) e AOAC (2000) mentre l'energia netta calcolata come suggerito dall'INRA (1978) (Tabella 1).

Per determinare il profilo degli acidi grassi (Tabella 2) della dieta e del HPO è stata impiegata la tecnica gascromatografica secondo Castro et al. (2009).

Tabella 1. Composizione chimica (g/kg SS), valore nutritivo (UFL/kg SS) del fieno di erba medica e del concentrato.

	Fieno di medica	Concentrato*
Proteine grezze	160.2	180
Lipidi grezzi	17.3	30.0
NDF	439.3	270.0
ADF	300.6	115.0
Lignina	52.3	30.0
UFL	0.75	1.03

*Ingredienti (g/kg SS): crusca di grano tenero 300; soia f.e. 130; farina di mais 130; farina di girasole 105; polpa di agrumi 80; pole di barbabietola 79; corn gluten feed 70; melasso di canna 75; CaCO₃ 15; CaHPO₄ 7; Vitamine 2; NaCl 7

Tabella 2. Principali acidi grassi della dieta (D) e del HPO (% totale acidi grassi)

	D	HPO
C12:0	0.12	0.70
C14:0	0.33	1.30
C16:0	23.0	48.0
C18:0	4.03	44.30
C18:1	28.50	5.10
C18:2, ω-6	38.25	0.20
C18:3, ω-3	6.30	<0.10

Analisi del latte

Per i primi 60 giorni dopo il parto, il latte è stato usato esclusivamente per allattare i redi; successivamente, è stata registrata la produzione di latte giornaliera, mentre a cadenza mensile, e per un totale di 3 prelievi, campioni rappresentativi di latte delle due mungiture giornaliere sono stati analizzati per la concentrazione di proteine e grassi con il metodo a raggi infrarossi (Milkoscan 133B, Foss Matic, Hillerod, Danimarca, standardizzato per il latte di capra). Inoltre, gli esteri metilici degli acidi grassi (FAMES) sono stati preparati per transesterificazione diretta con acido solforico/ metanolo (1:9, v/v) (Christie, 1993).

I FAMES sono stati analizzati mediante gascromatografo (Agilent Technologies, il modello 5890) dotato di SP-2560 colonna capillare di silice fusa (100 m × 0,25 millimetri di diametro interno × 0,2 micron pellicola spessore, Supelco, Inc., Bellefonte, PA, USA). Come gas di trasporto è stato utilizzato l'elio (1.2 ml/min; volume di iniezione: 2 ml con un rapporto split/ splitless 80:20). La temperatura della colonna era così programmata: ad inizio della corsa, isoterma 70 °C (2 min), successivo incremento di 15 °C/min fino a 155 °C (mantenuta per 25 min), quindi ulteriore incremento di 3 °C min e isoterma finale di 215 °C (per 8 min); il tempo totale di esecuzione è risultato pari a 61 min (Talpur et al, 2009).

L'identificazione dei FAMES è stata effettuata mediante spettrometro di massa (Agilent Technologies, modello 5973 inerte) così settato: 200 °C di temperatura, 70 eV di energia di ionizzazione, 50-500 amu per l'intervallo di massa (Cengiz, 2009) e gli stessi sono stati confrontati con uno standard.

I dati sono stati raccolti automaticamente e gli acidi grassi identificati mediante Chemstation software (Agilent, technologies) e confrontati in una banca dati NISTy. La quantificazione è stata effettuata mediante F.I.D. a 250°C.

L'attività dell'SCD è stata calcolata mediante i seguenti indici di desaturazione:

C14:1/C14:0, C16:1/C16:0, C18:1/C18:0, C18:2 cis-9 trans-11/ C18:1 trans-11 (Lock and Garnsworthy, 2003).

L'espressione del gene che codifica per l'SCD è stata studiata mediante estrazione di RNA totale dalle cellule somatiche del latte utilizzando il metodo di Mura et al. (2013). Brevemente, ogni campione di latte (300 mL; Boutinaud et al, 2002) è stato travasato in provette coniche sterili da 50 ml (sei tubi per campione) e le cellule somatiche sono state pellettate mediante centrifugazione a 2700 x g per 10 min a 4°C. Lo strato di grasso è stato rimosso e i pellet di cellule sono stati lavati due volte con 5 mL di PBS ghiacciato (pH 7.2) cui erano stati aggiunti 0.5 mM di EDTA, per eliminare la caseina e i globuli di grasso, e 0.1% di DEPC (D-etil-piro-carbonato) per inattivare le RNAsi e altri enzimi. Dopo la centrifugazione (2700 x g a 4°C per 15 min), i sei pellet di cellule ottenuti da ciascun campione sono stati trattati con 4 mL di PBS e di nuovo centrifugati alle stesse condizioni. Il supernatante è stato scartato, tranne 200 µL, che sono stati utilizzati per risospesare il pellet. Quest'ultimo è stato trasferito in una provetta da 1.5 ml e centrifugato a 6000 x g a 4°C per 15 min. La fase superiore (≈100 µL) è stata scartata e il pellet di cellule somatiche è stato risospeso in 1 ml di PBS e conservato a -80°C fino alla estrazione dell'RNA totale.

L'RNA totale è stato estratto utilizzando RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) secondo le istruzioni del produttore, sospeso in 50 µL di acqua sterile contenente 0.1% di DEPC.

Un'aliquota (circa 1.5 µL) di RNA è stata utilizzata per la quantificazione ed il controllo di qualità del campione mediante elettroforesi capillare tramite Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Ogni chip contiene dei microcanali interconnessi nei quali il campione di RNA viene separato nelle sue diverse specie, in base al loro peso molecolare mediante

elettroforesi fluida. I frammenti di acido nucleico vengono rilevati grazie ad un fluorocromo intercalante e l'intensità di fluorescenza analizzata mediante il software collegato 2100 Expert (versione 2.1). Per ogni campione, si ottiene un elettroferogramma, dal quale si possono individuare le specie di RNA presenti, la concentrazione (ng/μL) riferita ad uno standard di pesi molecolari a concentrazione nota e il RIN (RNA Integrity Number), un indice qualitativo proporzionale all'integrità del campione stesso. Tale parametro cade in una scala che va da 10, per un RNA di ottima qualità, a zero per un RNA completamente degradato. Un ulteriore controllo di qualità viene effettuato mediante spettrofotometro (BioPhotometer, Eppendorf, Amburgo, Germania) con lettura dell'assorbanza del campione a 260 nm (per acidi nucleici), 280 nm (per proteine), 230 nm (per composti organici quali fenoli, o residui di estrazione). Dal rapporto dei valori di densità ottica ottenuti dalle diverse assorbanze si può capire se il campione è contaminato da proteine o solventi organici che potrebbero interferire con le reazioni di retrotrascrizione per gli esperimenti di espressione genica. Per un campione di RNA non contaminato, il rapporto A260/280 deve essere compreso tra 1.8 e 2.1 mentre quello A260/230 deve essere superiore a 2.

L'RNA totale (1 μg) è stato incubato con gDNA Wipeout tampone (Qiagen, GmbH, Hilden, Germania) a 42°C per 2 minuti in modo da rimuovere efficacemente la contaminazione del DNA genomico. Quindi il primo filamento del cDNA è stato retrotrascritto usando il kit Quantiscript transcriptasi inversa (Qiagen) secondo le istruzioni del produttore. I controlli negativi della reazioni di sintesi del cDNA sono stati condotti in assenza di trascrittasi inversa e utilizzati come modello in PCR per verificare l'assenza di contaminazione del DNA genomico per ogni campione.

Il risultante cDNA è stato diluito in acqua DEPC (1:50).

Il primer gene specifico utilizzato è stato l'SCD (Tsiplakou et al, 2009) mentre come geni housekeeping il peptidil-prolyl cis-trans isomerasi A (PPIA) o ciclofilina A (Flint et al, 2006), il 18 rRNA (Tsiplakou et al, 2011) e la gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi (GAPDH) (Modesto et al, 2013). Le coppie di primers sono state verificate mediante determinazione dell'efficacia di amplificazione con cinque diluizioni seriali (1:4) del cDNA. Tutti i valori ciclo soglia (Ct) dei campioni ricadevano nella gamma lineare delle curve (Ramakers et al, 2003). L'efficienza di amplificazione dei geni housekeeping è stata del 100% mentre quella del SCD pari al 95.8%.

La Real-time PCR è stata eseguita su ABI Prism 7300 System (Applied Biosystems, Foster City, USA) utilizzando SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Le reazioni sono state effettuate in tubi ottici con tappi MicroAmp con 200 nM di ciascun primer specifico e 2.5 µL di cDNA diluito. I cicli di PCR consistevano in una fase di denaturazione iniziale a 95°C per 10 minuti seguiti da 40 cicli di denaturazione a 95 °C per 15 secondi ed una fase di appaiamento-estensione di primer a 60 °C per 1 min, in cui è stata misurata la fluorescenza. La curva di melting è stata prodotta dopo il completamento del programma termico di PCR per verificare la presenza di un picco gene-specifico e l'assenza di dimeri di primer. L'analisi RT-PCR dei campioni di cDNA è stata fatta in triplicato; i campioni non trascritti e non amplificati sono stati utilizzati come controlli.

I livelli di espressione relativi sono stati determinati normalizzando il numero del ciclo soglia (Ct) della SCD mRNA utilizzando la media Ct di geni housekeeping mediante la seguente formula:

$$2^{-(CT_{SCD} - CT_{media\ housekeeping})}$$

Prelievo del sangue e analisi relative

Il sangue è stato prelevato (10 ml) in condizioni sterili dalla vena giugulare, ai giorni 0 (inizio dell'aggiunta di olio di palma alla dieta) 30, 60 e 120, conservato a 4 °C ed immediatamente trasportato in laboratorio. Il siero è stato ottenuto per centrifugazione a 2000 rpm per 15 minuti, quindi i campioni sono stati congelati in piccole aliquote a - 80 °C.

Azoto ureico (BUN), creatinina (CREA), aspartate amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT), colesterolo (CHO) e trigliceridi (TRI) sono stati determinati mediante analizzatore automatico biochimico Olympus AU 400 (Beckman Coulter, California, USA), utilizzando i reagenti forniti dal produttore. Per l'acido beta-idrossibutirrato (B-HBA) e gli acidi grassi non esterificati (NEFA), invece, sono stati impiegati i reagenti della Catachem (Bridgeport-Connecticut-USA) e della Randox (Irlanda), rispettivamente.

I livelli di progesterone (PG) sono stati valutati mediante analisi immunoenzimatica (EIA), secondo le istruzioni del produttore (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) ed espressi in ng mL⁻¹.

Analisi statistica

I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (PROC GLM, SAS 2000) secondo il seguente modello:

$$y_{ijk} = \mu + T_i + S_j + (TS)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

dove y = singolo dato, μ = media generale, T = effetto dieta ($i = 2, C$ e HPO), S = effetto prelievo ($j = 1,..3$), TS = interazione dieta \times prelievo e ϵ = errore residuo.

La differenza tra le medie è stata valutata mediante il test delle minime differenze significative (LSD).

L'effetto della concentrazione di colesterolo su quella di progesterone è stato valutato mediante correlazione lineare (PROC CORR, SAS 2000).

RISULTATI

Latte

Tutti gli animali hanno ingerito la dieta loro somministrata senza lasciare residui e il peso vivo non è risultato differente tra i gruppi a confronto. In ogni caso i fabbisogni nutritivi dei soggetti sono stati soddisfatti durante l'intero periodo sperimentale. Infatti, secondo Rubino (1996), i fabbisogni energetici per il mantenimento e la produzione di latte in capre appartenenti a genotipi locali del sud Italia è pari, rispettivamente, a 0.0365 UFL /kg di peso metabolico ($PM = PV^{0,75}$) e 0.41 UFL/kg di latte corretto (4% di grasso). Nella presente indagine, sono state impiegate capre di 50 kg PV il cui fabbisogno energetico totale è risultato pari a 1.33 UFL (0.69 UFL per il mantenimento, e 0.64 UFL per la produzione di latte). I soggetti hanno ingerito 1.2 kg SS di fieno di erba medica che apportavano 0.9 UFL (vedi Tabella 1) mentre le restanti 0.43 UFL sono state soddisfatte con il concentrato (0.5 kg pari a 0.515 UFL).

L'influenza dell'aggiunta alla dieta di olio di palma sulla produzione quanti qualitativa di latte è riportata in Tabella 3.

La produzione di latte è risultata significativamente maggiore nel gruppo P (g/capo/die 1655 vs 1489; $P < 0.05$) così come la percentuale di grasso (4.14% vs 3.77%; $P < 0.05$), mentre la percentuale di proteine non è stata influenzata dalla somministrazione di HPO.

Tabella 3. Produzione (g/capo/die) e concentrazioni (%) di grasso e proteine nel latte dei due gruppi a confronto (C: controllo, P: trattato).

	Produzione	Grasso	Proteine
C	1489b	3.77b	2.96
P	1655a	4.14°	3.07
SEM*	186.86	0.314	0.078

a,b: P<0.05.

*Errore standard delle medie

L'aggiunta di HPO alla dieta ha aumentato in maniera significativa la concentrazione degli acidi grassi a catena corta e di quelli a catena media (P<0.01) nonché il livello dell'acido miristico (C14:0), del palmitoleico (C16:1 cis-9) e del cis-9 trans-11 CLA (P<0.05) (Tabella 4).

Il latte del gruppo C ha, invece, mostrato concentrazioni significativamente (P <0.01) maggiori di acido stearico (C18:0).

Per quanto riguarda gli indici di desaturazione l'aggiunta di HPO alla dieta ha influenzato significativamente i rapporti C16:1/C16:0 e cis-9 trans-11CLA /VA (P <0.01) e quello C18:1/C18:0 (P<0.05).

Tabella 4. Profilo acidico del grasso del latte (% degli acidi grassi totali) e indici di desaturazione el gruppo controllo (C) e trattato (P).

	C	P	SEM
C4:0	1.63B	2.07A	0.16
C6:0	2.30B	2.81A	0.14
C8:0	3.12B	3.62A	0.25
C10:0	9.28B	10.91A	2.08
C12:0	3.75	3.88	0.28
C14:0	8.22b	9.01a	1.45
C14:1	0.24	0.24	< 0.01
C16:0	26.40	26.64	2.91
C16:1 cis-9	0.53b	0.65a	0.02
C18:0	15.42A	13.19 B	2.50
C18:1 cis-9	21.14	20.51	3.78
C18:1 trans-11	1.04	0.90	0.06
C18:2 cis-9, cis-12; ω-6	2.19	2.10	0.09
C18:3 cis-9, cis-12, cis-15; ω-3	1.45	1.37	0.18
C20:0	0.32	0.34	< 0.01
C18:2 cis-9 trans-11 CLA	0.42b	0.48a	0.03
SFA	72.08	72.93	4.44
MUFA	23.82	23.11	3.94
PUFA	4.09	3.96	0.40
PUFA/SFA	0.06	0.05	< 0.01
Indici di desaturazione			
C14:1/C14:0	0.027	0.025	< 0.01
C16:1/C16:0	0.020 B	0.025 A	< 0.01
C18:1 cis-9/C18:0	1.39 b	1.57 a	0.05
C18:2 cis-9 trans-11/C18:1 trans-11	0.40 a	0.53 b	0.06

SFA – acidi grassi saturi; MUFA – monoinsaturi; PUFA – poliinsaturi

a,b: P≤0.05 A,B: P≤0.01. SEM: errore standard delle medie

Analizzando i dati in funzione del prelievo (tabella 5), il profilo degli acidi grassi nel latte è stato modificato durante la sperimentazione. Mentre nel primo e nel secondo prelievo gli acidi C4:0 e C6:0 sono risultati significativamente maggiori nel gruppo P, tale differenza è scomparsa nel mese di luglio (3° prelievo). Inoltre, il gruppo trattato ha fatto registrare valori significativamente superiori di C8:0 e C14:0 solo al secondo prelievo, di C10:0 al secondo ed al terzo e di C16:1 cis-9 al primo. L'acido stearico è risultato significativamente più elevato nel latte del gruppo C al secondo e al terzo prelievo, mentre il C18:1 trans-11 solo nel mese di giugno. Il cis-9 trans-11 CLA è aumentato lungo la prova in entrambi i gruppi ed è risultato comunque significativamente più elevato nel gruppo P. Nel latte di quest'ultimo, infine, i rapporti C16:1/C16:0 e cis-9 trans-11 CLA/VA hanno fatto registrare valori significativamente più elevati al primo prelievo, mentre il rapporto C18:1/C18:0 è risultato superiore nel mese di giugno.

Tabella 5. Profilo acidico del grasso del latte (% degli acidi grassi totali) e indici di desaturazione el gruppo controllo (C) e trattato (P), in funzione del prelievo.

	Maggio		Giugno		Luglio		SEM	P		
	C	P	C	P	C	P		T	P	T x P
C4:0	1.19b	1.68a	2.40B	3.04A	1.30	1.50	0.16	0.0021	0.0001	0.4221
C6:0	1.94B	2.69A	2.86B	3.49A	2.10	2.26	0.14	0.0003	0.0001	0.1475
C8:0	3.44	3.85	3.39b	4.05a	2.52	2.96	0.25	0.0047	0.0001	0.8026
C10:0	10.24	11.69	10.01b	11.71a	7.58b	9.34°	2.08	0.0019	0.0002	0.9613
C12:0	4.71	4.29	3.63	3.75	2.90b	3.60°	0.28	0.4399	0.0001	0.0495
C14:0	9.75	9.18	7.16b	8.83a	7.75	9.03	1.45	0.0573	0.0156	0.0666
C14:1	0.22	0.28	0.26	0.22	0.25	0.21	< 0.01	0.8469	0.7811	0.0748
C16:0	26.12	24.62	25.63	25.07	28.63	27.56	2.91	0.0761	0.0004	0.7953
C16:1c9	0.43B	0.67A	0.52	0.59	0.65	0.69	0.02	0.0104	0.0501	0.1428
C18:0	15.03	14.35	15.94A	12.25B	15.28a	12.96b	2.50	0.0002	0.5858	0.0829
C18:1 c9	20.27	19.63	20.55	19.95	22.59	21.94	3.78	0.3384	0.0132	0.9995
C18:1 t11	0.88	0.90	0.94a	0.61b	1.29	1.17	0.06	0.0948	0.0002	0.2273
C18:2 ω-6	2.41	2.17	2.25	2.22	1.92	1.92	0.09	0.3677	0.0101	0.5684
C18:3 ω-3	1.28	1.17	1.60	1.69	1.48	1.26	0.18	0.5738	0.0622	0.6590
C20:0	0.20b	0.29a	0.33	0.28	0.43	0.44	< 0.01	0.4457	0.0001	0.0908
c9 t11 CLA	0.32b	0.36a	0.38b	0.41a	0.58b	0.67a	0.03	0.5106	0.0006	0.0320
SFA	73.59	73.87	72.72	73.77	69.93	71.14	4.44	0.2377	0.0016	0.8436
MUFA	22.49	22.33	22.95	21.95	26.03	25.06	3.94	0.2913	0.0005	0.8452
PUFA	3.91	3.80	4.32	4.27	4.04	3.79	0.40	0.5294	0.2022	0.9256
PUFA/SFA	0.05	0.05	0.06	0.06	0.06	0.05	< 0.01	0.4245	0.2999	0.8706
Indici di desaturazione										
C14:1/C14	0.022	0.024	0.024	0.022	0.026	0.026	< 0.01	0.1977	0.3990	0.1131
C16:1/C16	0.02B	0.03A	0.021	0.024	0.025	0.024	< 0.01	0.0046	0.6104	0.1253
C18:1/C18	1.37	1.37	1.31b	1.63a	1.49	1.72	0.05	0.0218	0.0565	0.2042
c9 t11CLA/TVA	0.36	0.40	0.40b	0.67a	0.45	0.57	0.06	0.0198	0.0621	0.1958

SFA – acidi grassi saturi; MUFA – monoinsaturi; PUFA - poliinsaturi

a,b: P<0.05 A,B: P<0.01.

SEM: errore standard delle medie

T: trattamento

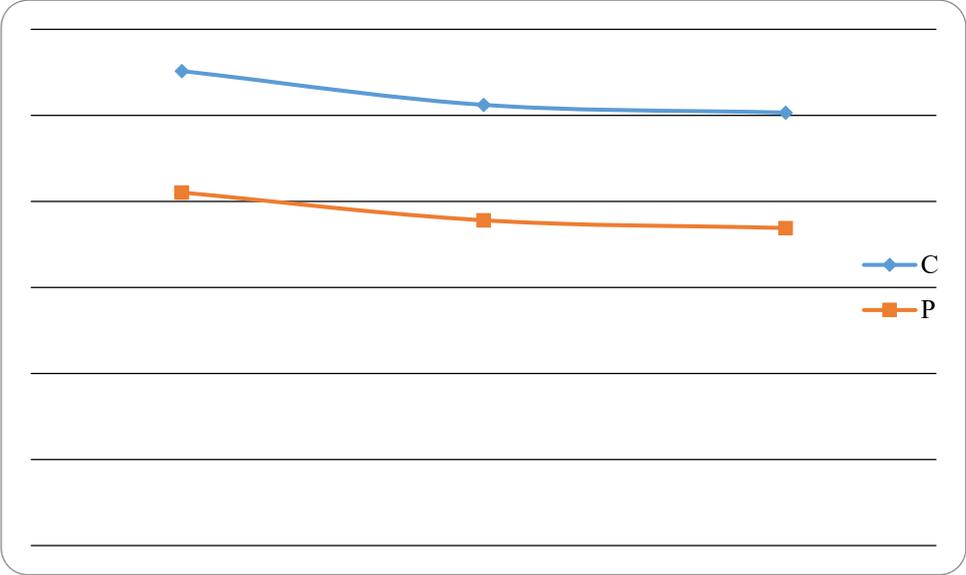
P: prelievo

Per quanto riguarda l'analisi dell'espressione del gene che codifica per l'SCD, la resa dell'RNA estratto da 300 mL di campione di latte è stata in media di $42.00 \text{ mg} \pm 10.4$ e $38.04 \text{ mg} \pm 5.11$ per il gruppo C e P, rispettivamente. Secondo Feng et al. (2007), questi valori sono da considerarsi sufficientemente validi per il prosieguo delle analisi.

La purezza dell'RNA estratto è stata misurata mediante spettrofotometro UV ($A_{260}/A_{280} = 1.9$; $A_{260}/A_{230} = 2.2$). La media RIN ottenuta è risultata di 7.4 ± 0.9 e 7.8 ± 0.5 rispettivamente per il gruppo C e P, in ogni caso superiore a 6, valore soglia per definire la qualità dell'RNA (Schroeder et al, 2006).

L'analisi RT-PCR ha mostrato che l'espressione del gene che codifica per l'SCD (unità arbitrarie, AU) è risultata più elevata, anche se non in maniera significativa, nel gruppo controllo sia come valore medio che in funzione del prelievo (Figura 3). Tuttavia, essa è leggermente diminuita lungo la prova (Maggio: 0.55 vs 0.41 ; Giugno: 0.51 vs 0.38 ; Luglio: 0.50 vs 0.37 , per il gruppo C e P, rispettivamente).

Figura 3. Espressione del gene che codifica per l'SCD (unità arbitrarie, AU) nei gruppi C e P lungo la sperimentazione (SEM = 0.06).



Sangue

Per quanto riguarda i parametri serici (Tabella 6), sono stati registrati valori medi significativamente ($P < 0.01$) più elevati nel gruppo P rispetto al gruppo controllo, soltanto per il contenuto di colesterolo (CHO). Quest'ultimo, inoltre, nel gruppo P è aumentato durante la sperimentazione. Andamento quasi analogo è stato registrato per il progesterone.

Tabella 6. Parametri serici nei gruppi C e P.

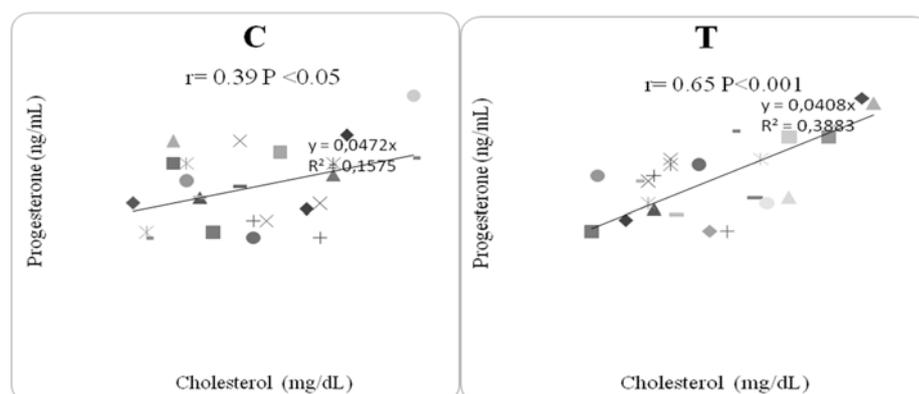
	BUN		CREA		AST		ALT		CHO		TRI		BHBA		NEFA		PG	
	mg/dl	mg/dl	U/L	U/L	U/L	U/L	U/L	U/L	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	ng/ml	ng/ml
	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P
I	40.2	42.2	1.0	1.1	74.3	80.4	18.0	17.2	57.5	56.2	19.0	21.0	0.34	0.43	0.36	0.34	2.5	2.4
II	39.8	41.4	0.9	0.9	73.8	68.4	17.5	18.8	54.7b	63.8a	19.7	20.8	0.38	0.33	0.36	0.39	2.8	3.1
III	38.3	37.0	1.2	1.0	70.8	68.2	16.3	18.8	58.0b	78.2a	19.3	20.2	0.37	0.33	0.36	0.35	2.2	3.0
IV	40.7	39.0	0.8	0.9	70.3	67.4	17.3	20.2	57.8B	83.8A	19.3	19.8	0.39	0.32	0.37	0.40	3.2	3.3
X	39.75	38.96	0.950	1.03	72.33	70.92	17.29	19.54	57.00B	70.16A	19.33	20.12	0.369	0.339	0.362	0.358	2.69	2.89
$\frac{M}{SE}$	5.65		0.30		8.44		4.55		8.15		2.79		0.10		0.13		0.66	

a,b: $P < 0.05$ A,B: $P < 0.01$.

SEM: errore standard delle medie

La correlazione tra CHO e PG (figura 4) è risultata significativa per il gruppo P ($P < 0.01$) e C ($P < 0.05$) durante l'intera sperimentazione. Analizzando i dati in funzione del prelievo, nel gruppo P a 30 giorni si è registrata una significatività pari solo a $P < 0.05$, mentre nel gruppo C è risultata più elevata ($P < 0.01$) solo a 120 giorni.

Figura 4. Correlazione tra colesterolo e progesterone nei gruppi C e T lungo la sperimentazione.



DISCUSSIONE

L'aggiunta di HPO alla dieta ha aumentato significativamente la produzione di latte in accordo con i risultati di Castro et al. (2009) negli ovini, Agazzi et al. (2010) nelle capre e Salado et al. (2004) nelle vacche da latte. Questi ultimi autori, inoltre, non hanno trovato alcuna modifica del peso vivo degli animali alimentati con diete additivate di grasso, come riportato anche nella presenta indagine. La percentuale di grasso del latte è risultata significativamente più elevata nelle capre del gruppo P, analogamente a quanto riportato da altri autori (Grummer, 1991 e Palmquist e Beaulieu, 1993 nelle bovine; Perez Alba et al, 1997 e Gargouri et al, 2006, negli ovini). Per contro, in altre ricerche non sono state rilevate differenze significative nella percentuale di grasso del latte di soggetti alimentati con diete cui era stato aggiunto olio di palma (Castro et al, 2009, negli ovini; Wu et al, 1993 e Bu et al, 2007, nelle bovine). I diversi risultati sono probabilmente da ascrivere alla quantità di lipidi aggiunti alla dieta; infatti, la sintesi endogena dei grassi diminuisce solo quando vengono indotte modifiche alle fermentazioni ruminali (Griinari et al, 1998).

In questo studio, la percentuale di proteine del latte non è stata influenzata dal trattamento come riportato anche nelle bovine (Huang et al, 2008; Bell et al, 2006) e nelle pecore (Casals et al, 2006; Castro et al, 2009). Al contrario, altri autori registrarono riduzione della concentrazione di proteine nel latte (Wu et al, 1993, nelle bovine; Pérez Alba et al, 1997 e Casals et al, 1999 nelle pecore).

L'aggiunta di HPO ha aumentato significativamente gli acidi grassi a corta (C4 - C6) e media catena (C8 - C10), in contrasto con i risultati degli studi condotti in bovine (Allred et al, 2006; Bell et al, 2006), ovini (Zhang et al, 2006; Chiofalo et al, 2004) e capre (Schmidely and Sauvant, 2001). In quest'ultima specie animale, Sanz Sampelayo et al. (2002) e Agazzi et al (2010) non hanno osservato modifiche nella concentrazione di acidi grassi a catena corta e media

dopo l'aggiunta di grassi alla dieta, così come riportato anche da Castro et al. (2009) negli ovini. Gli acidi grassi a catena corta e media sono sintetizzati a partire da acetato e idrossibutirrato nella ghiandola mammaria (Chilliard et al. (2000). La loro diminuzione nel latte è dovuta all'inibizione della carbossilasi acetil-CoA sintetasi attribuito agli acidi grassi a catena lunga della dieta o alla mobilitazione delle riserve corporee (Palmquist and Beaulieu, 1993).

Il grasso della dieta ha anche un effetto indiretto sulla lipogenesi nella ghiandola mammaria, poiché diminuisce la disponibilità di acetato e idrossibutirrato (Schmidely e Sauvant, 2001). Tuttavia, ciò si verifica solo quando il grasso aggiunto alla razione incide sulle fermentazioni ruminali (Chilliard et al, 2000).

Nella nostra indagine, la supplementazione con HPO ha aumentato significativamente gli acidi miristico (C14:0) e palmitoleico (C16:1 cis9) del latte, come riportato nella pecora anche da Castro et al. (2009). Questi ultimi trovarono, inoltre, livelli più elevati di C14:1 per la maggiore presenza nella dieta di C14:0 e di C16:0 precursori, per azione della Δ 9-desaturasi mammaria, di C14:1 e C16:1 (Chilliard et al, 2000).

Nel nostro studio, nonostante l'elevato livello di acido miristico nella dieta del gruppo P rispetto a quella del gruppo controllo, il contenuto di C14:1 nel latte è risultato simile tra i due gruppi. Probabilmente, l'attività della SCD è stata superiore nei riguardi del C16:0, largamente rappresentato nell'olio di palma. Infine, il latte del gruppo C ha mostrato concentrazioni significativamente superiori di acido stearico (C18:0) come riportato anche da Castro et al (2009) e Agazzi et al (2010). Questo risultato può essere attribuito alla totale bioidrogenazione ruminale di una parte del C18:0 della dieta nel gruppo P, come confermato dal contenuto superiore di CLA nel suo latte. Secondo Griinari et al. (2000) la gran parte di CLA (64- 98%) presente nel grasso del latte viene prodotto nella ghiandola mammaria a opera della Δ 9-desaturasi sul VA.

In questo studio, il cis-9 t-11 CLA del latte del gruppo P è stato generato, quasi interamente, dalla desaturazione del VA nella ghiandola mammaria, come deducibile dai rapporti C18:1/C18:0 e C18:2 cis-9 trans-11/C18:1 trans-11 risultati significativamente più alti in questo gruppo. Ricordiamo, infatti, che i rapporti prodotto/precursore sono utilizzati come indicatori dell'attività della Δ 9-desaturasi (Perfield et al, 2002; Lock and Garnsworthy, 2003; Allred et al, 2006; Soyeurt et al, 2008). I quattro principali prodotti dell'attività Δ 9-desaturasi nella ghiandola mammaria dei ruminanti sono: C14:1, C16:1, C18:1 cis-9 e C18:2 cis-9 trans-11, che sono originano da C14:0, C16:0, C18:0 e C18:1 trans-11, rispettivamente. Secondo Corl et al (2000), il rapporto C14:1/C14:0 è il migliore indicatore dell'attività della Δ 9-desaturasi in quanto tutto il C14:0 nel grasso del latte viene prodotto mediante sintesi de novo nella ghiandola mammaria; conseguentemente, la desaturazione è l'unica fonte di C14:1.

Nel nostro studio, questo è stato l'unico rapporto prodotto/precursore a non essere influenzato dall'aggiunta di HPO alla dieta. Secondo Lock and Garnsworthy (2003), i fattori che influenzano l'attività della Δ 9-desaturasi sarebbero la genetica, lo stadio di lattazione, l'alimentazione. Come riportato in precedenza, i nostri risultati sono probabilmente dovuti ad una maggiore attività dell'SCD su altri precursori, come il C16:0 e il C18:0 ampiamente rappresentati nel olio di palma.

L'espressione dell'SCD è risultata maggiore, anche se non in maniera significativa, nel gruppo controllo rispetto al gruppo trattato ma minore in entrambi i gruppi, rispetto a nostri precedenti risultati (Tudisco et al, 2014). Non è stata trovata alcuna correlazione tra l'espressione genica e l'attività dell'SCD nelle capre così come riportato da Tudisco et al. (2012) e Bernard et al (2005a, b; 2009a,b). Bernard et al. (2013) suggeriscono di valutare l'importanza delle interazioni tra gli ingredienti della dieta e i lipidi aggiunti, in considerazione del fatto che specifici PUFA possono bypassare le fermentazioni ruminali e che

specifici intermedi della bioidrogenazione possono inibire l'attività dell'SCD tramite meccanismi di regolazione della via trascrizionale o post-trascrizionale.

Nella presente indagine, l'aggiunta di HPO alla dieta non ha avuto effetti sulla gran parte dei parametri serici, suggerendo che la quantità di olio di palma impiegata non ha influenzato le funzionalità epatica e renale. Al contrario, si è registrato un aumento dei livelli di CHO, probabilmente per un maggiore assorbimento degli acidi grassi a catena lunga (Nestel et al. 1978). Va ricordato, infatti, che per i ruminanti l'olio di palma è da considerarsi come un grasso protetto o by pass.

L'incremento di CHO nel gruppo P è dovuto all'alta concentrazione di C14:0 e C16:0 nel HPO (Ulbricht and Southgate, 1991) ed è coerente con i risultati di Beynen et al. (2000), che hanno dimostrato che le concentrazioni di lipidi plasmatici nelle capre rispondono alla quantità e al tipo di grassi presenti nella dieta. Risultati simili sono stati riportati da Ghoreishi et al. (2007), che trovarono anche valori più elevati di progesterone (PG) e trigliceridi (TAG).

Bianchi et al. (2014) registrarono un aumento di AST e GGT nel siero di animali dopo 120 giorni di alimentazione integrata da HPO e di BUN, CHO, TAG e PG già dopo soli 60 giorni. Secondo questi autori l'aumento dell'attività degli enzimi epatici era proporzionale alla quantità di HPO somministrata. Ciò è importante in quanto la modifica di tali enzimi può verificarsi in conseguenza di steatosi epatica (Pechová et al, 2006). Questo suggerisce che la somministrazione a lungo termine di HPO potrebbe compromettere la funzionalità del fegato e, con essa, la salute dell'animale. Tuttavia, questi risultati sono stati osservati solo su animali la cui dieta era additivata con il 6.0% di HPO mentre una quantità minore (4.0%) è da ritenersi congrua.

Nel nostro studio, 50 g/capo/die di HPO rappresentano il 3.0% della dieta e sono risultati sufficienti per aumentare produzione e qualità dietetico-

nutrizionali del latte, senza comportare alcun rischio per la salute degli animali. Tale ipotesi è confermata dal fatto che BUN e CREA non sono risultate alterate.

Il BUN, infatti, è un indicatore del metabolismo proteico nei ruminanti e la sua concentrazione è direttamente correlata alla dieta, in particolare al rapporto energia/proteine (Wittwer, 2000). Nel nostro studio, HPO non ha influenzato il metabolismo proteico, così come ipotizzato da altri autori (Bianchi et al, 2014), né ha comportato danno renale, come dimostrato dai livelli di CREA, sovrapponibili tra i gruppi.

Per quanto riguarda i potenziali effetti favorevoli sulla riproduzione derivanti dalla supplementazione della dieta con HPO, essi scaturirebbero dalla correlazione positiva tra CHO e PG (Ghoreishi et al, 2007; Bianchi et al, 2014). Anche nel nostro studio è stata registrata una correlazione più elevata ($P < 0.01$) nel gruppo P, con aumento della stessa tra i 30 e i 120 giorni. Tuttavia il PG è risultato simile tra i gruppi, suggerendo che la quantità di 50 g/capo/die di HPO non è sufficiente a migliorare le performance riproduttive delle capre.

CAPITOLO 3

Secondo Contributo Sperimentale

INTRODUZIONE

Una classe di piccoli RNA (denominati miRNA) sembrano giocare un ruolo rilevante nella regolazione dei geni coinvolti nel metabolismo; in particolare, lo studio delle loro funzioni nell'ambito del metabolismo lipidico rappresenta un target molto attuale della ricerca per la prevenzione della malattia cardiovascolare (CVD), riconosciuta come la principale causa di morte nei paesi sviluppati.

I miRNA sono dei piccoli RNA endogeni, non codificanti, di circa 22 nucleotidi, trascritti da una RNA pol II come precursori di maggiori dimensioni. Legandosi al mRNA target, i miRNA possono ridurre la trascrizione di mRNA nelle cellule dei mammiferi. La regolazione dei geni target da parte dei miRNA è influenzata da fattori extra ed intracellulari. Oltre che nel metabolismo lipidico (Sacco et al, 2012), i miRNA regolano importanti processi biologici, quali la differenziazione cellulare e lo sviluppo tissutale (Lin et al, 2013). In ogni caso, le alterazioni della concentrazione e della composizione dei miRNA, sono strettamente legate a diversi problemi sanitari, come il cancro, l'aterosclerosi e il diabete (Chen et, 2012).

I miRNA si trovano all'interno degli esosomi, organelli presenti sulla parte esterna della membrana cellulare con funzione pleiotropica. Gli esosomi derivano da corpi multivescicolari (MVB) e sono rilasciati dalla cellula mediante fusione di questi con la membrana plasmatica. Essi sono presenti in fluidi corporei quali la saliva, le urine, il plasma, il latte e trasportano i miRNA verso

la cellula target. Questo meccanismo di trasferimento apre nuove prospettive per la conoscenza dei complessi rapporti tra le diverse cellule.

Da quanto detto è di tutta evidenza che la quantificazione dei miRNA circolanti rappresenta un'importante via per monitorare lo stato fisiopatologico dell'organismo.

La doppia membrana lipidica conferisce agli esosomi presenti nel latte sia umano che bovino una forte stabilità, come dimostrato da Izumi et al. (2012) nei riguardi delle alte temperature, dei bassi livelli di pH, dei trattamenti di congelamento/scongelo e di quello con RNAasi. Questa stabilità consente il passaggio dei miRNA ai neonati attraverso il latte e il ruolo dei miRNA nei riguardi della salute sia dei giovani che degli adulti rappresenta un rilevante aspetto da esplorare.

Come noto, la dieta dei ruminanti influenza notevolmente le caratteristiche dietetico-nutrizionali del latte da essi prodotto, in particolare della sua frazione lipidica. I trigliceridi, che rappresentano il 99% del grasso del latte sono sintetizzati nella ghiandola mammaria a partire da alcuni precursori e subito dopo si raggruppano a formare gocce di grasso. La sintesi e il trasferimento dei trigliceridi e quella *de novo* degli acidi grassi - che aumenta significativamente al parto per diminuire allorquando altri acidi grassi sono disponibili con la dieta - riconoscono un unico network di geni (Bionaz and Loo, 2011).

Recenti studi indicano che i miRNA del latte bovino sono prodotti nella cellula mammaria e sono coinvolti nel metabolismo lipidico durante la lattazione (Lin et al, 2013) e che aminoacidi, lipidi e vitamine della dieta possono modularne la trascrizione; ad esempio i CLA possono alterare l'espressione dei miRNA 107, 143 e 222 nel tessuto adiposo (Romao et al., 2012). Inoltre, alcuni miRNA (come il miR-27 e il miR-107) sono espressi differenzialmente durante la lattazione nella ghiandola mammaria, sia del topo che della bovina (Avril-Sassen et al, 2009; Chen et al, 2010) e sembrano essere correlati con la sintesi del grasso.

Lin et al. (2013a) osservarono che la sovra-espressione del miR-27a induceva modifiche del profilo acidico delle cellule dell'epitelio mammario nella capra, probabilmente per la soppressione dell'espressione del gene che codifica per l'SCD, target delle PPAR γ e responsabile della sintesi di acidi grassi insaturi. In un'altra sperimentazione gli stessi autori trovarono, mediante analisi funzionale, che ad una sovra-espressione del mir-103 nelle cellule mammarie corrispondeva un aumento di espressione dei geni associati alla sintesi del grasso con aumento dell'accumulo di trigliceridi e di una parte degli acidi grassi insaturi nel latte (Lin et al, 2013b).

Scopo del presente contributo sperimentale è stato quello di verificare, nel latte di capra, l'influenza del regime alimentare (pascolo vs stabulato) sull'espressione dell'SCD e sul profilo acidico del latte. Si è voluto, infine, apportare un nostro piccolo contributo allo studio dell'espressione dei miRNA 23a, 27b e 103, coinvolti nel metabolismo lipidico.

MATERIALI E METODI

Animali, diete e management

La prova è stata eseguita in accordo alla direttiva 2010/63 /UE sul benessere degli animali e la buona pratica clinica. In una azienda della provincia di Salerno, 16 capre Cilentane pluripare (50.5 ± 1.8 kg di peso vivo, PV) sono state suddivise, immediatamente dopo il parto, in due gruppi omogenei (S, stalla e P, pascolo) per ordine di lattazione e quantità di latte prodotta nella lattazione precedente (1480 ± 112 g/capo/die).

Allo scopo di garantire analogo apporto proteico ai due gruppi in prova, gli animali del gruppo S hanno ricevuto, oltre ad un mangime concentrato del commercio (analogo a quello somministrato alle capre del gruppo P, al ritorno dal pascolo) un fieno di erba medica. Infatti, in precedenti indagini condotte nella stessa area (D'Urso et al. 2008; Tudisco et al, 2012) il contenuto di proteine grezze/sostanza secca del pascolo risultò di circa il 16%.

L'ingestione giornaliera di fieno, misurata sottraendo i residui in mangiatoia alla quantità somministrata giornalmente, è stata pari a 1.2 kg di tal quale/capo.

Gli animali del gruppo P avevano libero accesso al pascolo (dalle ore 9.00 alle ore 16.00), caratterizzato dal 60% di Leguminose (*Trifolium alexandrinum*, *Vicia* spp.) e dal 40% di Graminacee (*Bromus catharticus*, *Festuca arundinacea*, *Lolium perenne*).

La somministrazione del mangime concentrato per entrambi i gruppi è stata pari a 500 g/capo/giorno.

A cadenza mensile, campioni di pascolo sono stati raccolti mediante sfalcio a 3 cm di altezza dal suolo, su tre aree campione (2.5 m^2 ognuna), essiccati in stufa a ventilazione forzata ($T 65 \text{ }^\circ\text{C}$), macinati con griglia di 1 mm e conservati. La composizione chimica dei campioni di pascolo, del fieno di erba medica e del

mangime concentrato è stata determinata secondo Van Soest et al. (1991) e AOAC (2000), mentre il valore nutritivo calcolato come suggerito dall' INRA (1978) (Tabella 7).

Tabella 7. Composizione chimica (g/kg SS), valore nutritivo (UFL/kg SS) del fieno di erba medica, del mangime concentrato e del pascolo.

	Fieno di medica	Concentrato*	Pascolo
Proteine grezze	164.2	180	167.0
Lipidi grezzi	16.3	30.0	19.0
NDF	434.1	270.0	495.0
ADF	311.4	115.0	343.0
Lignina	54.3	30.0	50.0
UFL	0.75	1.03	0.76

*Ingredienti (g/kg SS): crusca di grano tenero 300; soia f.e. 130; farina di mais 130; farina di girasole 105; polpa di agrumi 80; pole di barbabietola 79; corn gluten feed 70; melasso di canna 75; CaCO₃ 15; CaHPO₄ 7; Vitamine 2; NaCl 7

Per determinare il profilo degli acidi grassi (Tabella 8) del fieno di medica, del concentrato e del pascolo, il grasso totale è stato estratto secondo Folch et al. (1957). Gli acidi grassi, così estratti, sono stati trans metilati mediante la procedura base-catalizzata descritta da Christie (1982) e modificata da Chouinard et al. (1999). Gli esteri metilici degli acidi grassi sono stati quantificati usando un gas cromatografo ThermoQuest 8000 TOP, fornito di detector a ionizzazione di fiamma (ThermoElectron Corporation, Rodano -Milano- Italia) attraverso una colonna capillare (CP-SIL 88 fused 79 silica capillary column, 100 m x 0.25 mm di diametro interno con 0.2- μ m di spessore del film; Varian, Inc. Walnut Creek, CA). L'analisi è stata effettuata con la seguente rampa di temperatura: 70°C per

4 min; 13°C/min; 175°C per 27 min; 3°C/min; 215°C per 38 min; 10°C/min; 70°C. Le temperature di iniettore e detector sono state impostate a 250°C e 260°C rispettivamente. I flussi dei gas sono riportati di seguito: gas di trasporto (elio) 1 ml/min; idrogeno 30 ml/min; aria 350 ml/min; gas make-up (elio) 45 ml/min. I picchi degli acidi grassi sono stati identificati mediante il confronto con una miscela standard di esteri metilici di acidi grassi (Larodan Fine Chemicals, AB, Limhamnsgårdens Malmö, Sweden). L'identificazione dei diversi isomeri del CLA è stata effettuata confrontando i cromatogrammi dei campioni con quelli di singoli isomeri purificati (CLA cis-9, trans-11; CLA trans-10, cis-12; CLA cis-9, trans-11; CLA trans-9, trans-11) (Larodan Fine Chemicals, AB, Limhamnsgårdens Malmö, Sweden).

Tabella 8. Profilo degli acidi grassi del fieno di erba medica, del mangime concentrato e del pascolo (% totale acidi grassi).

	Fieno di medica	Concentrato	Pascolo
SFA	22.9	23.3	17.6
MUFA	8.55	17.8	7.55
PUFA	65.6	59.0	79.3
C18:2	18.1	48.3	25.1
C18:3	36.8	9.20	45.6

SFA – acidi grassi saturi; MUFA – acidi grassi monoinsaturi; PUFA - acidi grassi poliinsaturi

Analisi del latte

La registrazione della produzione giornaliera di latte e il campionamento (per un totale di 5 prelievi a cadenza mensile) sono iniziati due mesi dopo il parto, poiché per consuetudine locale, nei primi 60 giorni di lattazione il latte viene destinato all'alimentazione dei capretti.

L'analisi chimica e quella del profilo acidico del latte sono state effettuate come descritto nel paragrafo "Materiali e Metodi – Analisi del latte" del 1 Contributo Sperimentale (Capitolo 2).

L'attività dell'SCD è stata calcolata mediante i seguenti indici di desaturazione: C14:1/C14:0; C16:1/C16:0; C18:1/C18:0; cis-9 trans-11 C18:2/ trans-11 C18:1 (Lock and Garnsworthy, 2003).

L'analisi di espressione del gene che codifica per l'enzima SCD è stata effettuata con la stessa metodica descritta nel paragrafo "Materiali e Metodi – Analisi del latte" del 1 Contributo Sperimentale (Capitolo 2).

A partire da 200 µl di latte, l'RNA totale è stato estratto mediante il kit mirVana miRNA isolation kit (Ambion, USA), procedura di estrazione che combina i vantaggi dell'estrazione chimica (metodo fenolo-cloroformio) e dell'estrazione in fase solida (filtrazione), con alte rese in termini di qualità e purezza. Il metodo di purificazione dei miRNA prevede una fase iniziale di lisi e successiva incubazione con fenolo-cloroformio in rapporto 1:1 al volume del lisato e centrifugato per 5 min a 10000 x g per permettere la separazione della fase acquosa ed organica. Recuperata la fase acquosa contenente l'RNA, essa viene solubilizzata in etanolo assoluto e quindi sottoposta a lavaggi su filtro per eliminare le tracce dei solventi impiegati nelle fasi precedenti, e infine eluita in RNAsi free water. L'RNA totale così ottenuto viene successivamente conservato a -80°C per successive analisi.

Un'aliquota (circa 1,5 µL) di RNA è stata utilizzata per la quantificazione ed il controllo di qualità del campione mediante elettroforesi capillare tramite Agilent

2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Ogni chip contiene dei microcanali interconnessi nei quali il campione di RNA viene separato nelle varie specie in base al loro peso molecolare mediante elettroforesi fluida. I frammenti di acido nucleico vengono rilevati grazie ad un fluorocromo intercalante e l'intensità di fluorescenza analizzata mediante il software collegato 2100 Expert (versione 2.1). Per ogni campione, si ottiene un elettroferogramma, gli elettroferogrammi dal quale si possono individuare le specie di RNA presenti, la concentrazione (ng/ μ L) riferita ad uno standard di pesi molecolari a concentrazione nota e il RIN (RNA Integrity Number), un indice qualitativo proporzionale all'integrità del campione stesso. Tale parametro cade in una scala che va da 10, per un RNA di ottima qualità, a zero per un RNA completamente degradato. Un ulteriore controllo di qualità viene effettuato mediante spettrofotometro (BioPhotometer, Eppendorf, Amburgo, Germania) con lettura dell'assorbanza del campione a 260 nm (per acidi nucleici), 280 nm (per proteine), 230 nm (per composti organici quali fenoli, o residui di estrazione).

L'RNA estratto viene incubato per 30 minuti a 37°C con la DNAasi per eliminare eventuali tracce di DNA genomico, poi a 80°C per 2 minuti per inattivare la DNAasi. Successivamente, l'RNA è stato poliadenilato e retro trascritto mediante il Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis (Takara, USA), in breve: 3.5 μ l di RNA sono stati incubati con il buffer mRQ (2x) e l'enzima mRQ, presenti entrambi nel kit, a 37°C per 1 ora e poi a 85°C per 5 min; alla reazione finale sono stati aggiunti 90 μ l di acqua. Al fine di identificare specifici miRNA presenti nei nostri campioni, il cDNA così ottenuto viene amplificato utilizzando il SYBR Qrt-PCR kit (Takara, USA). Per la reazione di qPCR sono stati usati 2 μ l di cDNA, 12.5 μ l SYBR Advantage Premix (2X), 0.5 μ l di ROX Dye (50X), 0.5 μ l miRNA-specific 5' primer (10 μ M, Tabella 9), 0.5 μ l mRQ 3' Primer, per un volume finale di 25 μ l.

Tabella 9. miRNA Primers per l'analisi in RT-PCR.

miRNA	Primers (5'-3')
miR-23°	CATCACATTGCCAGGGATTA
miR-27b	TTCACAGTGGCTAAGTTCCG
miR-103	AGCAGCATTGTACAGGGCTA
U6	CACTATTGCGGGTCTGC

Tutti i campioni di DNA di origine animale e quelli di origine vegetale sono stati preparati in doppio usando tubi da reazione MicroAmp® Optical da 0,2 ml dotati di idonei tappi (MicroAmp® Optical, Applied Biosystems).

Lo strumento è stato programmato per effettuare i seguenti passaggi termici:

- 5 minuti a 50°C;
- 10 minuti a 94°C;
- 40 cicli costituiti da:
 - 15 sec a 95°C;
 - 60 secondi a 60°C.

I livelli di espressione relativa dei miRNA sono stati normalizzati con i livelli di espressione di un controllo interno (U6), calcolato usando il metodo del $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Analisi statistica

I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (PROC GLM, SAS 2000) secondo il seguente modello:

$$y_{ijk} = \mu + G_i + P_j + G \times P_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

dove: y_{ijk} = singola osservazione; μ = media generale; G_i = effetto dieta ($i = 1, 2$); P_j = effetto prelievo ($j = 1, \dots, 5$); $G \times P_{ij}$ = interazione dieta x prelievo; ϵ = errore.

La differenza tra le medie è stata valutata mediante il test delle minime differenze significative (LSD).

RISULTATI

In tabella 10 viene riportata la produzione quanti-qualitativa di latte nei due gruppi a confronto.

Gli animali allevati al pascolo hanno prodotto una quantità di latte maggiore, anche se non significativamente diversa, rispetto a quelli allevati in stalla (g/capo/die 1798.1 vs 1703.0, per i gruppi P e S, rispettivamente). Altamente significativa è risultata, invece, la differenza della percentuale di grasso del latte, superiore negli animali del gruppo P (4.12 vs 2.93, $P < 0.01$). Questi ultimi, infine, hanno mostrato una concentrazione proteica significativamente maggiore rispetto a quella del latte del gruppo S (3.43 vs 3.25; $P < 0.05$).

Tabella 10. Produzione (g/capo/die) e concentrazioni (%) di grasso e proteine nel latte dei due gruppi a confronto (S: stalla, P: pascolo).

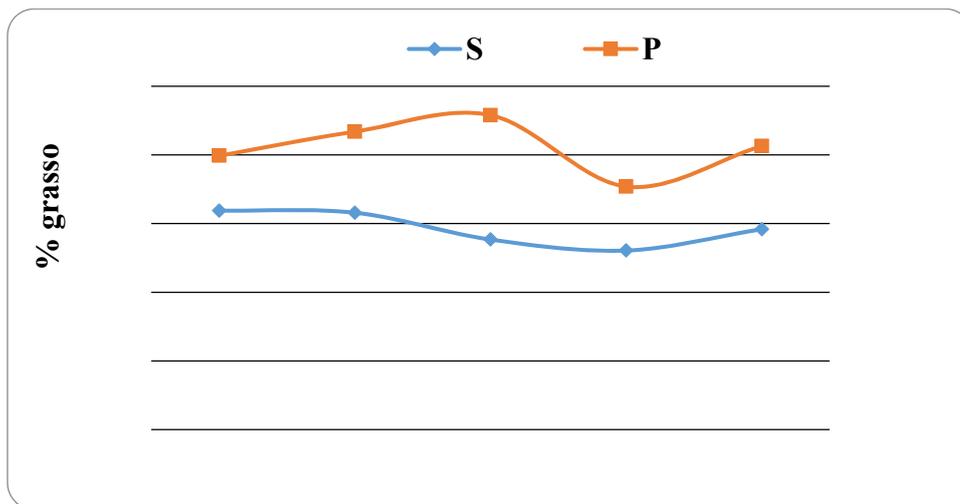
	Produzione	Grasso	Proteine	Lattosio
S	1793.0	2.934B	3.255b	4.10A
P	1798.1	4.116A	3.427a	3.96B
SEM*	167.5	0.536	0.336	0.22

A, B: $P < 0.01$; a,b: $P < 0.05$.

*Errore standard delle medie

Analizzando i risultati relativi al grasso in funzione del mese di prelievo (figura 5) è possibile evincere che le differenze tra i gruppi, pur permanendo per l'intera sperimentazione, sono state più evidenti nei mesi di maggio e giugno. Nel mese di luglio si è osservata una diminuzione del grasso nel latte di entrambi i gruppi, ma in maniera molto più drastica per il gruppo P.

Figura 5. Andamento della percentuale del grasso del latte in funzione del mese di prelievo (gruppo S e P).



Per quanto concerne il profilo acidico del grasso, riportato esprimendo i singoli acidi grassi come percentuale del totale degli stessi (tabella 11), il gruppo S ha fatto registrare una percentuale significativamente superiore di acidi grassi saturi

(SFA, 74.86 vs 71.42; $P < 0.01$) e inferiore di monoinsaturi (MUFA, 21.27 vs 24.01; $P < 0.01$). Non sono, invece, emerse differenze per il totale degli acidi grassi poliinsaturi (PUFA). Analizzando, tuttavia, soltanto i PUFA delle serie omega 6 ed omega 3, il gruppo di animali allevati al pascolo ha mostrato nel latte livelli significativamente superiori di acido linolenico (C18:3 omega 3, 1.351 vs 0.797; $P < 0.01$) mentre inferiori, anche se senza raggiungere la significatività statistica, sono risultati i livelli di acido linoleico (C18:2 omega 6). Per quanto riguarda il contenuto in CLA totali, infine, esso è risultato addirittura raddoppiato nel latte degli animali del gruppo P rispetto a quelli del gruppo S (0.646 vs 0.311; $P < 0.01$).

Ad eccezione del rapporto C16:1/C16:0, gli altri indici di desaturazione hanno fatto registrare differenze significative ($P < 0.05$) tra i gruppi, con valori sempre superiori nel latte del gruppo allevato in stalla.

Tabella 11. Profilo acidico del grasso del latte (% degli acidi grassi totali) e indici di desaturazione del gruppo stalla (S) e pascolo (P).

	S	P	SEM*
C4:0	0.0002	0.0002	0.001
C6:0	0.039	0.02	0.073
C8:0	0.949	0.883	0.577
C10:0	8.962b	10.076a	2.046
C12:0	5.41A	3.99B	0.901
C14:0	10.56B	13.00A	1.025
C14:1	0.199A	0.119B	0.111
C16:0	34.43A	30.22B	2.35
C16:1	0.822A	0.671B	0.19
C18:0	8.71B	14.59A	1.606
C18:1 trans-11	0.553B	1.847A	0.374
C18:1 cis-9	18.94B	20.34A	2.344
C18:2 cis-9, cis-12; omega-6	2.048	1.906	0.374
C18:3 cis- 9, cis-12, cis- 15; omega-3	0.797B	1.351A	0.251
C18:2 cis-9 trans-11 CLA	0.304B	0.623A	0.145
C20:0	0.187	0.213	0.11
C22:0	0.076b	0.108a	0.06
C23:0	0.035	0.026	0.036
C24:0	0.036B	0.056A	0.025
SFA	74.86A	71.42B	3.008
MUFA	21.27B	24.01A	2.64
PUFA	3.56	3.93	1.008
CLA totali	0.311B	0.646A	0.153
Indici di desaturazione			
C14:1/C14:0	0.018a	0.009b	< 0.01
C16:1/C16:0	0.024	0.022	0.05
C18:1 cis-9/C18:0	2.17a	1.39b	< 0.01
C18:2 cis-9 trans-11/C18:1 trans-11	0.549A	0.337B	< 0.01

SFA – acidi grassi saturi; MUFA – monoinsaturi; PUFA – poliinsaturi a,b: P≤0.05 A,B: P≤0.01. *

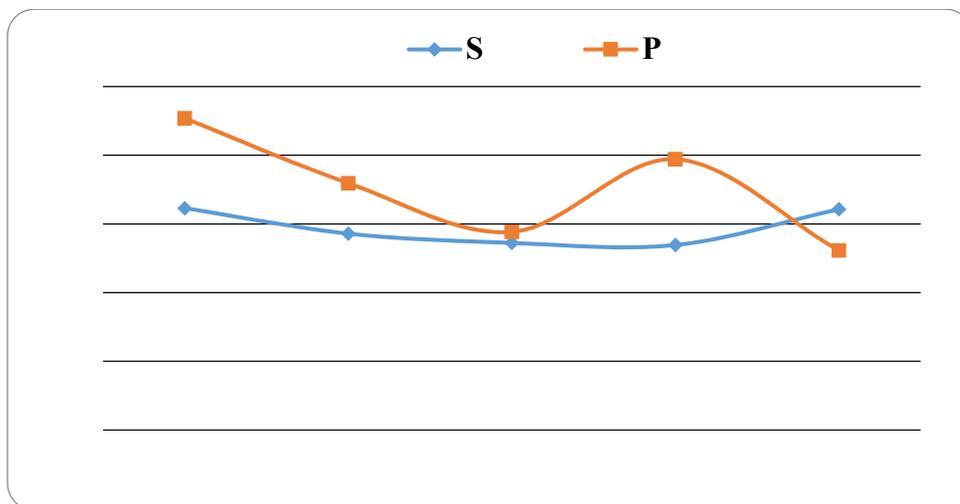
SEM: errore standard delle medie

Per quanto riguarda l'analisi dell'espressione del gene che codifica per l'SCD, la resa dell'RNA estratto da 300 mL di campione di latte è stata in media di 40.54 mg \pm 9.21 e 39.18 mg \pm 6.24 per il gruppo S e P, rispettivamente. Secondo Feng et al. (2007), questi valori sono da considerarsi sufficientemente validi per il prosieguo delle analisi.

La purezza dell'RNA estratto è stata misurata mediante spettrofotometro UV (A260/A280 = 1.8; A260/A230 = 2.1). La media RIN ottenuta è risultata di 7.7 \pm 0.5 e 7.9 \pm 0.2 rispettivamente per il gruppo S e P, in ogni caso superiore a 6, valore soglia per definire la qualità dell'RNA (Schroeder et al, 2006).

L'analisi RT-PCR ha mostrato che l'espressione del gene che codifica per l'SCD (unità arbitrarie, AU) è risultata più elevata, anche se non in maniera significativa, nel gruppo di animali allevati al pascolo sia come valore medio (AU: 0.703 vs 0.589) che in funzione del prelievo (Figura 6). Per quest'ultima variabile, l'SCD nel gruppo P ha mostrato una espressione con trend decrescente da Aprile (AU: 0.908) a Giugno (AU: 0.577), aumento nel mese successivo (AU: 0.789) e nuova diminuzione ad Agosto (AU: 0.523). Al contrario, l'espressione del SCD per il gruppo allevato in stalla è risultata pressoché costante per l'intera sperimentazione.

Figura 6. Espressione del gene che codifica per l'SCD (unità arbitrarie, AU) nei gruppi S e P lungo la sperimentazione (SEM = 0.362).



La resa dei miRNA estratti da 200 μ l di latte è risultata in media di 18.6 ± 1.1 . e di 19.2 ± 1.4 , per il gruppo P e S, rispettivamente. Per quanto riguarda la loro espressione, non sono emerse differenze significative tra i gruppi a confronto per tutti i diversi tipi di miRNA in esame (Tabella 12). Rispetto a quello del gruppo S, tuttavia, il latte dei soggetti allevati al pascolo ha fatto in ogni caso registrare livelli superiori.

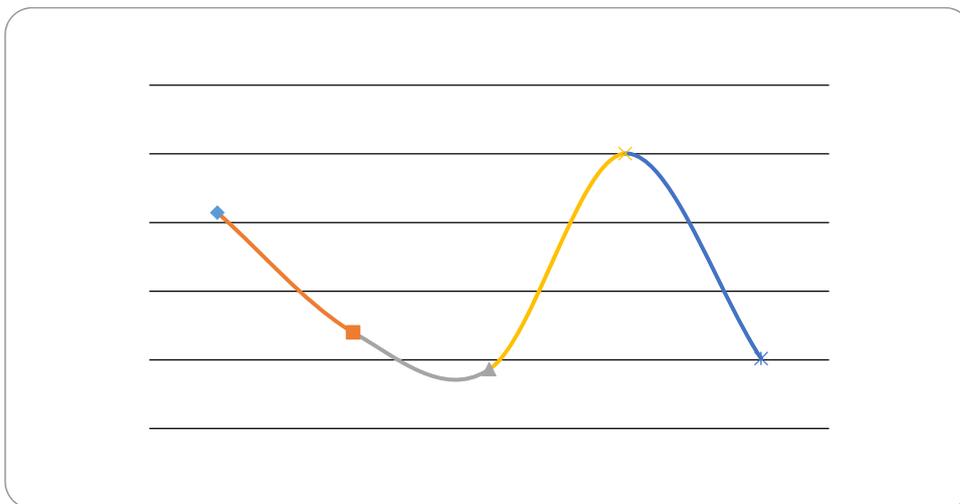
Tabella 12. Espressione media dei miRNA (Unità Arbitraria, AU), normalizzati con il controllo interno U6, nei gruppi S e P.

	23a	27b	103
S	0,240	0,291	0,390
P	0,276	0,346	0,417
SEM*	0,135	0,136	0,121

* SEM: errore standard delle medie

In questi ultimi, infine, tutti i miRNA sono diminuiti da aprile a giugno, aumentati nel mese di luglio e drasticamente crollati in quello successivo, in particolare il miRNA 103 (Figura 7).

Figura 7. Espressione del miRNA 103 (unità arbitrarie, AU) nel gruppo allevato al pascolo (P) lungo la sperimentazione (SEM = 0.121).



DISCUSSIONE

La produzione media di latte nel corso della sperimentazione (tabella 10) è risultata sovrapponibile nei gruppi a confronto (g/capo/die 1798.1 vs 1703.0, per i gruppi P e S, rispettivamente) ed è da ritenersi più che soddisfacente per un tipo genetico non migliorato.

Gli animali del gruppo P hanno fatto registrare livelli significativamente più elevati di grasso, probabilmente per una maggiore ingestione di carboidrati di struttura (l' NDF del pascolo è risultato maggiore rispetto a quello del fieno di medica, mentre inferiore è risultata la lignina, Tabella 7) che, come noto, rappresentano il substrato di fermentazione dei batteri ruminali deputati alla produzione di acido acetico, precursore degli acidi grassi a corta e di larga parte di quelli a media catena del latte.

La differenza tra i gruppi è fortemente diminuita nel mese di luglio, quando il grasso del latte del gruppo P ha raggiunto i valori minimi, fenomeno da attribuire sicuramente al ruolo deprimente la sintesi di grasso operato dalle condizioni climatiche sfavorevoli (elevate temperature e depressione dello stadio vegetativo del pascolo), come segnalato anche da Loewenstein et al. (1984).

In ogni caso, nella nostra sperimentazione, i fabbisogni energetici di entrambi i gruppi erano soddisfatti.

Infatti, per quanto riguarda il gruppo P, in accordo con Rubino (1990) le capre di origine autoctona ingeriscono mediamente sui pascoli delle aree interne del Mezzogiorno, 20 g di sostanza secca /kg di peso vivo mentre il loro fabbisogno energetico di mantenimento equivarrebbe a 0.0365 UFL/kg di peso metabolico ($PV^{0.75}$), mentre quello per la produzione di 1 kg di latte corretto (4% in grasso) a 0.41 UFL.

Nella presente indagine, i soggetti di peso vivo di circa 50 kg hanno quindi ingerito 1 kg di sostanza secca al pascolo, che equivale a 0.76 UFL (tabella 7), mentre il fabbisogno energetico era pari a 1.29 UFL (0.69 UFL per il

mantenimento e 0.60 UFL per la produzione di latte). Il deficit di 0.53 UFL era coperto dall'ingestione di concentrato (1.03 UFL/kg s.s.). Analogamente, il gruppo in stalla è riuscito a soddisfare i propri fabbisogni energetici grazie all'ingestione di 1.2 kg di sostanza secca di fieno di medica (UFL 0.75/kg s.s.) oltre al mangime concentrato.

Per quanto concerne il profilo acidico del latte, il valore dell'acido linolenico è risultato significativamente maggiore nel latte degli animali del gruppo P. Questo dato è da attribuire alla maggiore presenza dello stesso acido nel pascolo rispetto al fieno di medica (45.6% vs 36.8%, Tabella 8). Anche Shroeder et al. (2003) trovarono un significativo incremento di acido linolenico nel latte di bovine nella cui dieta la base foraggera era rappresentata dal pascolo in confronto al latte di animali alimentati con tecnica unifeed (g/100 g 0.57 vs. 0.07).

Il contenuto in CLA del latte è risultato significativamente maggiore nel gruppo P, in accordo con quanto riportato da Dhiman et al. (1996) in bovine da latte, da Nudda et al. (2003) per il latte di pecora e di capra e da Bergamo et al. (2003) e Secchiari et al. (2005) in prove effettuate nella bufala. In particolare questi ultimi autori rilevarono anche un aumento di acido linolenico nel latte degli animali che ricevevano foraggio fresco nella razione.

Al contrario, Jahreis et al. (1999) non osservarono differenze tra i contenuti in CLA nel latte di capre allevate al pascolo o in stalla.

Per quanto riguarda il profilo acidico del latte, in funzione del mese di prelievo, risulta interessante osservare (Tabella 13) che nel gruppo P, nel mese di Agosto si sono registrati valori significativamente ($P < 0.01$) più elevati di CLA in contemporanea con la massima concentrazione degli acidi linoleico e linolenico (entrambi precursori dei CLA) nel pascolo (Tabella 14). Questi risultati sono in sintonia con quanto riscontrato da altri autori (Tsiplakou et al, 2006; Kemp and Lander, 1984; Kim et al, 2000).

Tabella 13. Profilo acidico del grasso del latte (% degli acidi grassi totali) e indici di desaturazione del gruppo stalla (S) e pascolo (P), in funzione del prelievo.

	Aprile		Maggio		Giugno		Luglio		Agosto	
	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P
C14:0	11.7	10.7	11.7A	10.2B	14.5a	10.3B	14.5A	11.1B	13.3A	10.5B
C14:1	0.18	0.07	0.12	0.17	0.33	0.21	0.16a	0.08b	0.21A	0.07B
C18:0	13.4	14.2	9.30B	14.4A	6.60B	14.2A	0.74B	15.7A	6.54B	14.5A
C18:1 c9	24.6a	21.9b	19.6	20.5	14.8B	20.1A	17.6B	20.2A	18.1	19.1
C18:1 t11	0.99b	1.69a	0.65B	1.70A	0.37B	1.86A	0.37B	1.92A	0.39B	2.07A
C18:2 ω-6	2.35	2.52	2.29B	2.64A	2.04a	1.03b	1.68	1.67	1.88a	1.67b
C18:3 ω-3	1.16	1.09	0.89B	1.30A	0.58B	1.24A	0.74B	1.68A	0.61B	1.45A
c9 t11 CLA	0.48	0.61	0.30B	0.55A	0.29	0.52	0.21B	0.68A	0.24B	0.75A
Indici di desaturazione										
C14:1/C14	0.015a	0.006b	0.010a	0.016b	0.022	0.020	0.011	0.007	0.015a	0.006b
C18:1/C18	1.84	1.54	2.11a	1.43b	2.25a	1.42b	2.27a	1.28b	2.76a	1.31b
c9 t11CLA/TVA	0.49a	0.36b	0.47a	0.33b	0.79A	0.282B	0.563A	0.351B	0.605A	0.361B

a,b: $P \leq 0.05$ A,B: $P \leq 0.01$.

SEM: errore standard delle medie

Tabella 14. Composizione chimica (% s.s.) e profilo acidico del pascolo (% di acidi grassi totali) in funzione del mese di prelievo.

	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto
SFA	20.5	18.2	16.3	19.8	14.5
MUFA	8.8	4.2	4.1	4.0	4.2
PUFA	70.5	77.2	79.2	76.1	81.2
C18:2	10.7	22.6	34.1	20.6	46.3
C18:3	30.6	41.2	42.7	40.7	52.4

SFA – acidi grassi saturi; MUFA – monoinsaturi; PUFA - poliinsaturi

Al contrario, l'acido linoleico e il linolenico del pascolo non sembrano avere influenzato in egual maniera l'espressione del gene che codifica per l'SCD.

I valori di quest'ultima (figura 6), infatti, hanno fatto registrare trend decrescente da Aprile a Giugno, aumento a Luglio e nuovamente un decremento ad Agosto.

Andamento diametralmente opposto ha mostrato l'acido linoleico, mentre per il C18:3 non si è osservata alcuna flessione significativa durante la sperimentazione mostrando valori bassi ad Aprile, praticamente sovrapponibile nei tre mesi successivi e elevati ad Agosto. Questi risultati dimostrerebbero una maggiore influenza dei PUFA appartenenti alla serie omega 6 sull'espressione del gene che codifica per l'SCD, rispetto a quelli della serie omega 3.

Da sottolineare, come i valori dell'attività dell'SCD, misurabili attraverso gli indici di desaturazione e in particolare quello C14:1/C14:0, siano risultati opposti rispetto a quelli dell'espressione del gene che codifica per lo stesso enzima.

Ricordiamo che come indicatori dell'attività della $\Delta 9$ -desaturasi sono utilizzati i seguenti rapporti prodotto/precursore C14:0/C14:1, C16:0/C16:1, C18:0/C18:1 cis-9 e C18:1 trans-11/C18: 2 cis-9 trans-11 (Perfield et al, 2002; Lock and Garnsworthy, 2003; Allred et al, 2006; Soyeurt et al, 2008). Secondo Corl et al (2000), il rapporto C14:1/C14:0 è il migliore indicatore dell'attività della $\Delta 9$ -desaturasi in quanto tutto il C14:0 nel grasso del latte viene prodotto mediante sintesi de novo nella ghiandola mammaria; conseguentemente, la desaturazione è l'unica fonte di C14:1.

Come riportato nel paragrafo dei risultati, tutti i tipi di miRNA esaminati, hanno fatto registrare valori superiori nel latte degli animali allevati al pascolo, confermando l'influenza dei nutrienti presenti nella dieta sulla loro espressione. In particolare il miRNA 103 nel latte del gruppo P ha mostrato un andamento decrescente da aprile a giugno, con successivo aumento nel mese di luglio e diminuzione in Agosto (come riportato in figura 7).

Confrontando tale trend con quello dell'espressione dell'SCD, è possibile evincere una perfetta sovrapposizione dei due parametri durante la sperimentazione. Tale risultato è in linea con quanto riportato da Lin et al. (2013b) che trovarono, mediante analisi funzionale, una elevata corrispondenza tra la sovra-espressione del miRNA103 nelle cellule mammarie e l'aumento di espressione dei geni associati alla sintesi del grasso con accumulo di trigliceridi e di una parte degli acidi grassi insaturi nel latte.

Ricordiamo, infatti, che la sintesi del grasso nelle cellule epiteliali mammarie riconosce diversi processi metabolici che prevedono, dopo un iniziale sintesi de novo degli acidi grassi, una successiva desaturazione della stearyl-CoA

desaturasi (SCD) con conversione in trigliceridi (Hansen et al., 1984; Bionaz and Looor, 2008, 2011).

CAPITOLO 4

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in entrambe le sperimentazioni confermano la notevole influenza esercitata dal sistema di alimentazione degli animali, sulle caratteristiche dietetico-nutrizionali del latte di capra. Alla luce del progressivo aumento della domanda da parte del consumatore di derrate alimentari in grado di apportare oltre ai classici nutrienti, anche molecole bioattive che possono esercitare un ruolo favorevole sulla salute umana, il nostro contributo non sembra trascurabile.

Nella prima indagine, infatti, nella quale si è voluto verificare se la supplementazione con olio di palma idrogenato alla dieta di soggetti allevati con sistema stallino, comportasse un miglioramento delle caratteristiche nutrizionali del latte, le concentrazioni di acidi grassi a catena corta e media, nonché dei C14:0, C16:1 cis-9 e del cis-9 trans-11 CLA sono risultate significativamente maggiori nella derrata fornita dagli animali che ricevevano tale aggiunta alla razione. In merito alle concentrazioni di CLA nel latte, è emerso anche che l'espressione del gene che codifica per l'SCD, enzima coinvolto a livello tissutale nella loro produzione, non risulta omogenea durante la lattazione.

I nostri risultati, inoltre, in apparente contrasto con quanto riportato in letteratura, nonostante un aumento del colesterolo ematico, non indicano una influenza negativa sul metabolismo, derivanti dall'aggiunta di grassi. L'impiego di 50g/capo/die di olio di palma idrogenato è stato ben tollerato dagli animali e può rappresentare un utile strumento per aumentare la disponibilità di energia in periodi di bilancio energetico negativo.

Nella seconda sperimentazione, è stato confermato che l'impiego del pascolo determina la produzione di latte il cui profilo acidico si caratterizza per elevati contenuti in acidi grassi poliinsaturi delle serie omega 3 nonché per contenuti significativamente maggiori di CLA. Alla luce della acclarata influenza che entrambi questi parametri esercitano sulla salute umana, è possibile esprimere un giudizio nettamente favorevole sull'adozione di sistemi di allevamento che prevedano il ricorso al pascolo.

Notevole è apparsa, l'influenza dello stadio vegetativo e quindi della presenza di precursori nell'erba ingerita sul profilo acidico del latte, mentre l'espressione del gene che codifica per l'SCD è parso essere regolato soltanto dalla presenza di acido linoleico nella dieta.

Per quanto concerne, infine, i miRNA, piccoli RNA endogeni in grado di ridurre la trascrizione di mRNA nelle cellule e di regolare il metabolismo lipidico, essi sono risultati maggiormente rappresentati nel latte degli animali allevati al pascolo. In quest'ultimo, inoltre, il miRNA 103 ha mostrato trend sovrapponibile a quello dell'espressione dell'SCD.

BIBLIOGRAFIA

Agazzi, A., Invernizzi, G., Campagnoli, A., Ferroni, M., Fanelli, A., Cattaneo, D., Galmozzi, A., Crestani, M., Dell'Orto, V., Savoini, G., (2010). Effect of different dietary fats on hepatic gene expression in transition dairy goats. *Small Rumin. Res.* 93, 31-40.

Allred, S.L., Dhiman, T.R., Brennand, C.P., Khanal, D.J., Luchini, N.D., (2006). Milk and cheese from cows fed calcium salts of palm and fish oil alone or in combination with soybean products. *J. Dairy Sci.* 89, 234–248.

Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431: 350-355.

AOAC - Association of Official Analytical Chemist. (2000). Natural Toxins. *Official Methods of AOAC International*. Volume 2, Chapter 49, 1-64. 17th edition. (Edited by William Horwitz).

Attaie, R., Richter, L. (2000). Size distribution of fat globules in goat milk. *Journal of Dairy Science*, 83 pp. 940-944.

Avril-Sassen S, Goldstein LD, Stingl J, Blenkiron C, Le Quesne J, C. et al. (2009). Characterisation of microRNA expression in post-natal mouse mammary gland development. *BMC Genomics* 10:548.

Banni, S., Carta, G., Contini, M.S., Angionni, E., Deiana, M., Dessi, M.A., Melis, M.P., Corongiu F.P. (1996). Characterization of conjugated diene fatty acids in milk, dairy products and lamb tissues. *J Nutr Biochem* 7, 150-155.

Barber M C, Clegg R A, Travers M T, Vernon R G. (1997). Lipid metabolism in the lactating mammary gland. "Bioch.Bioph.Acta", 1347, pp.101-126.

Barsuhn CL, Olanoff LS, Gleason DD, Adkins EL, Ho NF. (1988). Human buccal absorption of flurbiprofen. *Clin Pharmacol Ther* 44:225–231.

- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281-297.
- Bartel DP. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*; 136:215-233.
- Bartlett, J.C., Chapman, D.G. (1961). Detection of hydrogenated fats in butter fat by measurement of cis-trans conjugated unsaturation. *Agri Food Chem* 9, 50-53.
- Bauchart, D., Aurousseau, B., Auclair, E. and Labarre, A. (1984). Addition of sorbitol in a milk replacer offered to preruminant calves. II. Effect on plasma, liver and muscle lipids. *Reprod. Nutr. Develop.*
- Bauman DE, Griinari JM. (2001). Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livest. Prod. Sci.* 70:15–29.
- Bauman, D. E., I. Mather, R. Wall, and A. L. Lock. (2006). Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk. J. D Bolte, M.R., Hess, B.W., Means, W.J., Moss, G.E., Rule, D.C. (2002). Feeding lambs high-oleate or high linoleate safflower seeds differentially influences carcass fatty acid composition. *J Anim Sci* 80, 609-616. *airy Sci.* 89:1235-1243.
- Bauman D.E., Griinari J.M. (2003). *Nutritional regulation of milk fat synthesis*. *Annu. Rev. Nutr.* 23 pp. 203-227.
- Bauman, D. E., A. L. Lock, B. A. Corl, C. Ip, A. M. Salter, and P. W. Parodi. (2006). Milk fatty acids and human health: Potential role of conjugated linoleic acid and trans fatty acids. In: K. Sejrsen" T.Hvelplund, and M. O. Nielson (Eds.) *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress*. pp. 523-555. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

- Bell, J.A., Griinari, J.M., Kennelly, J.J. (2006). Effects of safflower oil, flaxseed oil, monensin, and vitamin E on concentration of conjugated linoleic acid in bovine milk fat. *J. Dairy Sci.* 89, 733–748.
- Belury, M.A., Vanden Heuvel, J.P. (1999). M.P. Yucawecz, M.M. Mossoba, J.K.G. Kramer, M.W. Pariza, G.J. Nelson, eds. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research* vol.1. AOCS Press, Champaign, Ill. 404-411.
- Belury, M.A. (2003). Conjugated linoleic acids in type 2 diabetes mellitus: implications and potential mechanisms. In: J. Sebedio, W.W. Christie, R. Adolf eds. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. vol. 2. AOCS Press, Champaign, Ill. 302-315.
- Bergamo, P.; Fedele, E.; Iannibelli, L. *et al.* (2003). Fat-soluble vitamin contents and fatty acid composition in organic and conventional Italian dairy products. *Food Chem.*, v.82, p.625-631.
- Bernard L., Leroux C., Hayes H., Gautier M., Chilliard Y., Martin P. (2001). Characterization of the caprine stearoyl-CoA desaturase gene and its mRNA showing an unusually long 3'-UTR sequence arising from a single exon. *Gene*, 281: 53-61.
- Bernard, L., Rouel, J., Leroux, C., Ferlay, A., Faulconnier, Y., Legrand, P., Chilliard, Y., (2005). Mammary Lipid Metabolism and Milk Fatty Acid Secretion in Alpine Goats Fed Vegetable Lipids. *J. Dairy Sci.* (88) 1478–1489.
- Bernard, L., Rouel, J., Leroux, C., Ferlay, A., Faulconnier, Y., Legrand, P., Chilliard, Y. (2005a). Mammary lipid metabolism and milk fatty acid secretion in alpine goats fed vegetable lipids. *J. Dairy Sci.* 88,1478–1489.
- Bernard, L., Leroux, C., Bonnet, M., Rouel, J., Martin, P., Chilliard, Y. (2005b). Expression and nutritional regulation of lipogenic genes in mammary gland and adipose of lactating goats. *J. Dairy Res.* 72, 250–255.

- Bernard A, Carbonnelle S, de Burbure C, Michel O, Nickmilder M. (2006). Chlorinated pool attendance, atopy and the risk of asthma during childhood. *Environ Health Perspect.* 114:1567–1573.
- Bernard, L., Leroux, C., Faulconnier, Y., Durand, D., Shingfield, K.J., Chilliard, Y. (2009a). Effect of sunflower-seed oil or linseed oil on milk fatty acid secretion and lipogenic gene expression in goats fed hay-based diets. *J. Dairy Res.* 76, 241–248.
- Bernard, L., Bonnet, M., Leroux, C., Shingfield, K.J., Chilliard, Y. (2009b). Effect of sunflower-seed oil and linseed oil on tissue lipid metabolism, gene expression, and milk fatty acid secretion in alpine goats fed maize silage-based diets. *J. Dairy Sci.* 92, 6083–6094.
- Bernard, L., Leroux, C., Rouel, J., Bonnet, M., Chilliard, Y. (2012). Effect of the level and type of starchy concentrate on tissue lipid metabolism, gene expression and milk fatty acid secretion in Alpine goats receiving a diet rich in sunflower-seed oil. *Br. J. Nutr.* 107, 1147–1159.
- Bernard, L., Leroux, C., Chilliard, Y. (2013). Expression and nutritional regulation of Stearoyl-CoA desaturase genes in the ruminant mammary gland: relationship with milk fatty acid composition. In: Ntambi, J.M.(Ed.), *Stearoyl-CoA Desaturase Genes in Lipid Metabolism*. Springer Science Business Media, New York, pp. 161–193.
- Betterbridge DJ. (1999). Nutrition and therapeutics: current opinions. *Lipidology*, 10: 467-469.
- Beynen, A.C.; Schonewille, J.T.; Terpstra, A.H.M. (2000). Influence of amount and type of dietary fat on plasma cholesterol concentrations in goats. *Small Ruminant Research*, v.35, n.2, p.141-147.

- Bhattacharya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey, J., Fernandes, G. (2006). Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J Nutr Biochem* 17, 789-810.
- Bianchi, A.E., V.P. Macedo, R.T. Franca, S.T.A. Lopes and L.S. Lopesc *et al.* (2014). Effect of adding palm oil to the diet of dairy sheep on milk production and composition, function of liver and kidney and the concentration of cholesterol, triglycerides and progesterone in blood serum. *Small Rumin. Res.*, 117: 78-83.
- Bianchi, T.S., Allison, M.A., Cai, W.J. (2014). *Biogeochemical Dynamics at Major River– Coastal Interfaces*. Cambridge University Press, pp. 118–137.
- Bickerstaffe D, Noakes DE, Annison EF. (1972). Quantitative aspects of fatty acid biohydrogenation, absorption and transfer into milk fat in the lactating goat, with special reference to the cis- and trans-isomers of octadecenoate and linoleate. *Biochem J.* 130:607–617.
- Bickerstaffe, R., Johnson, A. R. (1972). The effect of intravenous infusions of sterculic acid on milk fat synthesis. *Br J Nutr* 27, 561-570.
- Bionaz, M., Loor, J.J. (2008). Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics* 9, 366–387.
- Bionaz, M., Loor, J.J. (2011). Gene networks driving bovine mammary protein synthesis during the lactation cycle. *Bioinf. Biol. Insights* 5, 83–89.
- Bittante, G., Andrighetto, I., Ramanzin, M. (1993). *Tecniche di produzione animale*. Liviana Editrice.
- Booth, R.G., Kon, S.K., Dann, W.J. , Moore T. (1935). A study of seasonal variation in butter fat. II. A seasonal spectroscopic variation in the fatty acid fraction. *Biochem J* 29, 133-137.

- Borchert, G.M., Lanier, W., and Davidson, B.L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 13: 1097-1101.
- Bouattour, M.A., Casals, R., Albanell, E., Caja, G. (2006). Milk fatty acid composition and dairy performances in Lacaune sheep fed whole linseed and linseed oil with reference to CLA. *J. Dairy Sci.* 89 (Suppl. 1), 64.
- Boutinaud, M., H. Rulquin, D. H. Keisler, J. Djiane, and H. Jammes. (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, J. R. and Sanseau, P. (2005). A computational view of microRNAs and their targets. *Drug Discov Today*, 10: 595-601.
- Bu, D.P., Wang, J.Q., Dhiman, T.R., Liu, S.J. (2007). Effectiveness of oils rich in Linoleic and Linolenic acids to enhance conjugated linoleic acid in milk from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 998-1007.
- Butler, W. R. and Canfield, R. W. (1989). Interrelationships between energy balance and postpartum reproduction. In *Proc., Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*, October 24- 26, 1989, Cornell University, Ithaca.
- Cameron, P.J., Rogers, M., Oman, J., May, S.G., Lunt, D.K., Smith, S.B. (1994). Stearoyl coenzyme A desaturase enzyme activity and mRNA levels are not different in subcutaneous adipose tissue from Angus and American Wagyu steers. *J Anim Sci* 72, 2624-2628.
- Carthew RW, Sontheimer EJ (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 136: 642–655.
- Casals, R., Caja, G., Such, X., Torre, C., Calsamiglia, S. (1999). Effects of calcium soaps and rumen undegradable protein on the milk production and composition of dairy ewes. *J. Dairy Res.* 66, 177–191.

- Casals, R., Caja, G., Pol, M.V., Such, X., Albanell, E., Gargouri, A., Casellas, J. (2006). Response of lactating dairy ewes to various levels of dietary calcium soaps of fatty acids. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131, 312–332.
- Castro, T., Manso, T., Jimeno, V., Del Alamo, M., Mantecón, A.R. (2009). Effects of dietary sources of vegetable fats on performance of dairy ewes and conjugated linoleic acid (CLA) in milk. *Small Rumin. Res.* 84, 47–53.
- Cattaneo D, Dell’Orto V, Varisco G, Agazzi A, Savoini G. (2006). Enrichment in n-3 fatty acids of goat’s colostrum and milk by maternal fish oil supplementation. *Small Ruminant Research*, 64:22-29.
- Ceballos, L.S.; Morales, E.R.; Adarve, G.D.L.T.; Castro, J.D.; Martínez, L.P.; Sampelayo, M.R.S.. (2009). Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *J. of Food Composition and Analysis.* 22:322–329.
- Cengiz, A., Çiğdem, U.-P., Yonca, K.-Y. (2009). Changes in milk fatty acid composition of goats during lactation in a semi-intensive production system. *Archiv. Tierzucht.* 52, 627-636.
- Chajes, V., Lavillonniere, F., Ferrari, P., Jourdan, M-L., Pinault, M., Maillard, V., Sébédio, J-L., Bougnoux P. (2002). Conjugated linoleic acid content in breast adipose tissue is not associated with the relative risk of breast cancer in a population of French patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11, 672-673.
- Chajes, V., F. Lavillonniere, V. Maillard, B. Giraudeau, M. L. Jourdan, J. L. Sebedio and P. Bougnoux. (2003). Conjugated linoleic acid content in breast adipose tissue of breast cancer patients and the risk of metastasis. *Nutr. Cancer* 45:17-23.
- Chalupa, W., Rickabaugh, B., Kronfeld, D.S., Sklan, E.D. (1984). Rumens fermentation in vitro as influenced by long chain fatty acids. *Journal of Dairy Science* 67, 1439-1444.

Chandrasekharan N. (1999). Changing concepts in lipid nutrition in health and disease. *Medical Journal of Malaysia*, 54: 408-428.

Chandrasekharan N, Sundram K, Basiron Y. (2000). Changing nutritional and health perspectives on palm oil. *Brunei International Medical Journal*, 2: 417-427.

Chen X, Gao C, Li H, Huang L, et al. (2010). Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell Res*. 20: 1128-1137

Chen X., Liang H., Zhang J., Zen K., Zhang C. Y. (2012). Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol*. 22, 125–132 10.1016/j.tcb.2011.12.001.

Chilliard Y., Ferlay A., Faulconnier Y., Bonnet M., Rouel J., Bocquier F. (2000). Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. *Proc. Nutr. Soc.*, 59 pp. 127-134.

Chilliard, Y., Ferlay, A., Mansbridge, R.M., Doreau, M. (2000). Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Ann. Zootech*. 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.

Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., Doreau, M. (2007). Diet, rumen biohydrogenation, cow and goat milk fat nutritional quality: A review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 109, 828–855.

Chiofalo, B., Liotta L., Zumbo A., Chiofalo V. (2004). Administration of olive cake for ewe feeding: effect on milk yield and composition. *Small Rumin. Res.* 55, 169-176.

Chiou TJ. (2007). The role of microRNAs in sensing nutrient stress. *Plant Cell Environ*; 30: 323–332.

Chouinard, P. Y., Corneau, L., Sæbø, A. & Bauman. D. E. (1999). Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acid. *J. Dairy Sci.* 82: 2737–2745.

Chow CK. (1992). *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. New York: Marcel Dekker Inc., pp. 237-262.

Christie, W. W. (1982) A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesteryl esters. *J. Lipid Res.* 23: 1072–1075.

Christie, W.W. (1993). Preparation of Ester Derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In: *Advanced in Lipid Methodology-Two*, The Oily Press LTD, Ed. Dundee, Scotland, pp. 69–111.

Chung M., Ha S., Jeong S., Bok J., Cho K., Baik M., Choi Y. (2000). Cloning and characterization of bovine stearoyl CoA desaturase cDNA from adipose tissues. *Biosci. Biotechnol Biochem.*, 64:1526-30.

Clarke R, Frost C, Collins R, Appleby P, Peto R. (1997). Dietary lipids and blood cholesterol: quantitative meta-analysis of metabolic ward studies. *British Medical Journal*, 314: 112-117.

Cohn JS. (1994). Postprandial lipid metabolism: current opinions. *Lipidology*, 5: 185-190.

Corl, B.A., Chouinard, P.Y., Bauman, D.E., Dwyer, D.A., Griinari, J.M., Nurmela K.V. (1998). Conjugated linoleic acid in milk fat of dairy cows

originates in part by endogenous synthesis from trans-11 octadecenoic acid. *J Dairy Sci* 81 (Suppl. 1): 233 (Abstr.).

Corl, B.A., Lacy, S.H., Baumgard, L.H., Dwyer, D.A., Griinari, J.M., Phillips, B.S., Bauman D.E. (1999). Examination of the importance of $\Delta 9$ -desaturase and endogenous synthesis of CLA in lactating dairy cows. *J Anim Sci* 77(Suppl. 1):118 (Abstr.).

Corl, B.A., Baumgard, L.H., Bauman, D.E., Griinari, J.M. (2000). Role of $\Delta 9$ desaturase in the synthesis of the anticarcinogenic isomer of conjugated linoleic acid and other milk fatty acids. In: *Proceedings of the Cornell Nutrition Conference*. Cornell University, Rochester, NY, pp. 203–212.

Corl B.A., Baumgard L.H., Dwyer D.A., Griinari J.M., Phillips B.S., Bauman D.E. (2001). The role of $\Delta 9$ -desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. *J Nutr Bioch* 12, 622–630.

Corl B. A., Baumgard L H., Griinari J. M., Delmonte P., Morehouse K. M., Yurawecz M. P., Bauman D. E. (2002). Trans-7,cis-9 CLA is synthesized endogenously by delta-9 desaturase in dairy cows. *Lipids*, 37, 681-688. 379.

Cruz-Hernandez, C., Deng, Z. Y., Zhou, J. Q., Hill, A. R., Yurawecz, M. P., Delmonte, P., Mossoba, M. M., Dugan M. E. R. and Kramer, J. K. G. (2004). Methods for analysis of conjugated linoleic acids and trans-18: 1 isomers in dairy fats by using a combination of gas chromatography, silver-ion thin-layer chromatography/gas chromatography, and silverion liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 87: 545562.

D'Urso G, Vuolo F, Michele C De. (2008). Remote sensing techniques to improve on-farm irrigation efficiency. *Irrigation Australia Conference 20-22 May*, Melbourne

- Delany, J.P., Blohm, F., Truett, A.A., Scimeca, J.A., West, D.B. (1999). Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. *Am J Physiol* 276, 1172-1179.
- Dewhurst, R.J., King, P.J. (1998). Effects of extended wilting, shading and chemical additives on the fatty acids in laboratory grass silages. *Grass For. Sci.*; 53:219–224.
- Dewhurst, R. J.; Shingfield, K. J.; Lee, M. R. F.; Scollan, N. D. (2006). Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 131 (3-4): 168
- Dhiman, T. R., L. D. Satter, and R. D. Shaver. (1996). Milk production and blood phosphorus concentrations of cows fed low and high dietary phosphorus. *U.S. Dairy Forage Res. Center 1995 Res. Summaries*, Madison, WI. p. 105.
- Donovan, D.C., Schingoethe, D.J., Baer, R.J., Ryali, J., Hippen, A.R., Franklin, S.T. (2000). Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids in milk fat from lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 83, 2620-2628.
- Doreau M, Demeyer DI, Van Nevel CJ. (1997). Transformations and effects of unsaturated fatty acids in the rumen. Consequences on milk fat secretion. In: *Milk Composition, Production and Biotechnology* (RAS Welch, DJW Burns, SR Davis, AI Popay, CG Prosser, eds), CABI, Oxford, UK, 73-92.
- Ebong PE, Owu DU, Isong EU. (1999). Influence of palm oil (*Elaeis guineensis*) on health. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 53(3): 209-222.
- Eknes M., Havrevoll O., Volden H., Hove K. (2009). Fat content, fatty acid profile and off-flavours in goats milk – effects of feed concentrates with different fat sources during the grazing season. *Animal Feed Science and Technology* 152, 112-122.

- El-Agamy, E.I. The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Research*, Volume 68, Issues 1- 2, March 2007, Pages 64-72.
- Elgersma, A., Ellen, G., Dekker, P.R., van der Horst, H., Boer, H., Tamminga, S. (2003a). Effects of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) cultivars with different linolenic acid contents on milk fatty acid composition. *Asp. Appl. Biol.* 70, 107–114.
- Elgersma, A., Ellen, G., van der Horst, H., Muuse, B.G., Boer, H., Tamminga, S. (2003b). Influence of cultivar and cutting date on the fatty acid composition of perennial ryegrass. *Grass Forage Sci.* 58, 323– 331 (also Erratum *Grass Forage Sci.* 59, 104).
- Elgersma, A., Tamminga, S. & Ellen, G. (2006). Modifying milk composition through forage. *Animal Feed science and Technology* 131, 207–225. 488
- Elgersma, A., Wever, A. C. & Nalecz-Tarwacka, T. (2006). Grazing versus indoor feeding: effect on milk quality *Grassland Science in Europe* 11, 419–427.
- Enig MG. (1993). Diet, serum cholesterol and coronary heart disease. In: GV Mann (Ed.): *Coronary Heart Disease: The Dietary Sense and Nonsense*. London: Janus Publishing, pp. 36-60.
- Enig MG. (1996). Health and Nutritional Benefits from Coconut Oil: An Important Functional Food for the 21st Century. Paper presented in the seminar AVOC Lauric Oils Symposium in Ho Chi Min City, Vietnam.
- Enser, M., N. Scollan, N. Choi, E. Kurt, K. Hallett and J. Wood. (1999). Effect of dietary lipid on the content of CLA in beef cattle. *Anim. Sci.*, 69: 143-146.
- Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, et al. (2006). miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 3: 87–98.

- European Commission (2010). Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the council of 22 September 2010 and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.
- F Lawless, J.J. Murphy, D Harrington, C Stanton. (1998). Elevation of Conjugated cis-9, trans-11-Octadecadienoic Acid in Bovine Milk Because of Dietary Supplementation. *J Dairy Sci* 81 : 3259-67.
- Fang Z, Rajewsky N. (2011). The impact of miRNA target sites in coding sequences and in 3'UTRs. *PLoS One*; 6:e18067.
- Fenech M, El-Sohehy A, Cahill L, Ferguson LR, French TA, Tai ES, Milner J, Koh WP, Xie L, Zucker M, Buckley M, Cosgrove L, Lockett T, Fung KY, Head R. (2011). Nutrigenetics and nutrigenomics: viewpoints on the current status and applications in nutrition research and practice. *J Nutrigenet Nutrigenomics*; 4: 69–89.
- Feng, S., Salter, A.M., Parr, T., Garnsworthy, P.C. (2007). Extraction and quantitative analysis of stearoyl-coenzyme A desaturase mRNA from dairy cow milk somatic cells. *J. Dairy Sci.* 90, 4128–4136.
- Flint, D.J., Boutinaud, M., Whitelaw, C.B.A., Allan, G.J., Kolb, A.F. (2006). Prolactin inhibits cell loss and decreases matrix metallo proteinase expression in the involuting mouse mammary gland but fails to prevent cell loss in the mammary glands of mice expressing IGFBP-5 as mammary transgene. *J. Mol. Endocrinol.* 36, 435–448.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol chem.* May;226(1):497-509.

- Franklin, S.T., Martin, K.R., Baer, R.J., Schingoethe, D.J., Hippen, A.R. (1999). Dietary marine algae (*Schizochytrium* sp.) increases concentrations of conjugated linoleic, docosahexaenoic and trans vaccenic acids in milk of dairy cows. *J Nutr* 129, 2048-2054.
- Freund, G. (2000). *Goat Milk: Composition and Nutritional Value*, a Bibliography. Inst. Techn. Prod. Laitiers Caprins (ITPLC) Publ., Surgeres, France, p. 79.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*; 19: 92–105.
- Gargouri, A., Caja, G., Casals, R., Mezghani, I. (2006). Lactational evaluation of effects of calcium soap of fatty acids on dairy ewes. *Small Rumin. Res.* 66, 1-10.
- Gavino, V.C., Gavino, G., Leblanc, M.-J.&Tuchweber, B. (2000). An isomeric mixture of conjugated linoleic acids but not pure cis-9, trans-11- 132 octadecadienoic acid affects body weight gain and plasma lipids in hamsters. *J Nutr* 130, 27–29.
- Ghoreishi, S.R., Cartraud, P., Davies, P., Messenger, T. (2007). Analytical modeling of synthetic fiber ropes subjected to axial loads - Part I: A new continuum model for multilayered fibrous structures. *International Journal of Solids and Structures* 44, 2924-2942.
- Gillis, M.H., Duckett, S.K., Sackman, J.S., Keisler, D.H. (2003). Effect of rumen-protected conjugated linoleic acid (CLA) or linoleic acid on leptin and CLA content of bovine adipose depots. *J Anim Sci* 81 (Suppl. 2): 12 (Abstr.).
- Gillman MW, Cupples LA, Millen B, Ellison RE, Wolf PA. (1997). Inverse association of dietary fat with development of ischaemic stroke in men. *Journal of the American Medical Association*, 278: 2145-2150.

- Griinari, J.M., Chouinard, P.Y., Bauman, D.E. (1997). Trans fatty acid hypothesis of milk fat depression revised. In: Proc Cornell Nutr Conf, Ithaca, NY. pp 208-216.
- Griinari, J.M., Dwyer, D.A., McGuire, M.A., Bauman, D.E., Palmquist, D.L., Nurmela, K.V.V. (1998). Transoctadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 81, 1251-1261.
- Griinari, J.M., Barman, D.E. (1999). Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza, and G. J. Nelson (Ed.) *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research* vol. 1, pp 180-200. AOCS Press, Champaign, IL.
- Griinari, J.M., Corl, B.A., Lacy, S.H., Chouinard, P.Y., Nurmela, K.V.V., Bauman, D.E., (2000). Conjugated Linoleic Acid Is Synthesized Endogenously in Lactating Dairy Cows by D9-Desaturase. *J. Nutr.* (130) 2285–2291.
- Grousclaude F., Ricordeau G., Martin P., Remuef F., Vassal L., Buillon J. (1994). Du gene au fromage: le polymorphisme de la caseine α 1 caprine, ses effets, son evolution. *Prod. Anim.* 7, 3 – 9.
- Grummer, R.R. (1991). Effect of feed on the composition of milk fat. *J Dairy Sci.* 74, 3244-3257.
- Gu Z, Eleswarapu S, Jiang H. (2007). Identification and characterization of microRNAs from the bovine adipose tissue and mammary gland. *FEBS Lett* 581: 981–988.
- Haenlein, G.F.W., Sherman, D.M. (Eds.). (2004). Invited papers Roundtable IGA 20th Anniversary Meeting and EAAP Annual Conference, Cairo, Egypt, September 2, 2002. *Small Rumin. Res.* 51, 115–200.

- Hansen, J., A. Lacis, D. Rind, G. Russell, P. Stone, I. Fung, R. Ruedy, J. Lerner. (1984). Climate sensitivity: analysis of feedback mechanisms, Geophys.Mono. Series 29, American Geophysical Union, Washington, pp 130-163.
- Harfoot, C.G. (1978). Lipid metabolism in the rumen. *Prog Lipid Res* 17, 21-54.
- Harfoot, C. G. (1981). Lipid metabolism in the rumen. In: W. W. Christie (ed.) *Lipid Metabolism in Ruminant Animals*. pp 21-55. Pergamon Press Ltd., Oxford, UK.
- Harfoot, C.G., Hazlewood, G.P. (1988). Lipid metabolism in the rumen. In: P.N. Hobson (Ed.) *The Rumen Microbial Ecosystem*. pp 285-322. Elsevier Applied Science Publishers, London
- Harfoot, C.G. and Hazlewood, G.P. (1997). Lipid metabolism in the rumen. In: Hobson, P.N. and Stewart, C.S. eds. *The rumen microbial ecosystem*. 2nd edn. Blackie Academic and Professional, London, 382-426.
- Hasler, C.M. (1998). A new look at an ancient concept. *Chem. Industry Feb.* 2: 84-89.
- Hata T, Murakami K, Nakatani H, Yamamoto Y, Matsuda T, Aoki N. (2010). Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 396: 528–533.
- Hawke, J.C. (1973). Lipids. In: Butler, G.W., Bailey, R.W. (Eds.), *Chemistry and Biochemistry of Herbage*. Academic Press, London, UK, pp. 213–263
- Hilditch, T.P., Jasperson, H. (1941). Milk fats from cows fed on fresh pasture and on ensiled greed fodder. I. Observations on the component fatty acids. *J Soc Chem Ind* 60, 305-310.

Hilditch, T.P., Jasperson, H. (1945). The polyethenoid acids of the C18 series present in milk and grass fats. *J Soc Chem Ind* 64, 109-111.

Hiraoka-Yamamoto, J., Ikeda, K., Negishi, H., Mori, M., Hirose, A., Sawada, S., Kitamori, K., Onobayashi, Y., Kitano, S., Tashiro, M, Miki, T., Yamori, Y. (2004). Serum lipid effects of a monounsaturated (palmitoleic) fatty acid-rich diet based on macadamia nuts in healthy, young japanese women. *Clin. Exp. Pharm. and Physiol.* 31, 37–38.

Holman, R.T., Mahfouz, M.M. (1981). Cis- and transpolyunsaturated octadecadienoic acid as precursors of fatty acids. *Prog Lipid Res* 20, 151-156.

Holtz J, Pasquinelli AE: Uncoupling of *lin-14* mRNA and protein repression by nutrient deprivation in *Caenorhabditis elegans*. *RNA* 2009; 15: 400–405.

Hornstra. (1990). Effects of dietary lipids on some aspects of the cardiovascular risk profile, In G Ziant (Ed.): *Lipids and Health: Proceedings of the 2nd European Symposium on Lipids and Health: Lipids and Cancer, Lipids and Cardiovascular Diseases*, Brussels, (International Congress Series). Amazon.com.

Hou Q, Huang J, Ju Z, Li Q, Li L, Wang C, Sun T, Wang L, Hou M, Hang S, Zhong J. (2012). Identification of splice variants, targeted microRNAs and functional single nucleotide polymorphisms of the BOLA-DQA2 gene in dairy cattle. *DNA Cell Biol* 31: 739–744.

Huang, Y., Schoonmaker, J.P., Bradford, B.J., Beitz, D.C. (2008). Response of milk fatty acid composition to dietary supplementation of soy oil, conjugated linoleic acid, or both. *J. Dairy Sci.* 91, 260–270.

INRA (1978), *Alimentation des Ruminants*, Ed. INRA Publications, 78000 Versailles France.

Izumi H, Kosaka N, Shimizu T, Sekine K, Ochiya T, Takase M. (2012). Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *J Dairy Sci* 95: 4831–4841.

Jahreis G., Fritsche J., Möckel P., Schöne F., Möller U., Steinhart H. (1999). The potential anticarcinogenic conjugated linoleic acid, cis-9, trans-11 C18:2, in milk of different species: cow, goat, ewe, sow, mare, woman. *Nutrition Research*, 19, 1541–1549.

Jenkins T. C. (1993). Lipid Metabolism in the Rumen. In: Symposium: Advances In Ruminant Lipid Metabolism *J Dairy Sci* 76:3851-3863

Jennifer S, Khosrow A. (2012). MicroRNAs: emerging roles in lipid and lipoprotein metabolism. *Lipid Metab* 23: 220–225.

Ji Z, Wang G, Xie Z, Wang J, Zhang C, Dong F, Chen C. (2012). Identification of novel and differentially expressed microRNAs of dairy goat mammary gland tissues using solexa sequencing and bioinformatics. *PLoS One* 7: e49463.

Ji Z, Wang G, Xie Z, Zhang C, Wang J. (2012). Identification and characterization of microRNA in the dairy goat (*Capra hircus*) mammary gland by Solexa deep-sequencing technology. *Mol Biol Rep* 39: 9361–9371.

Jiang, C., Ting, A.T., Seed, B. (1998). PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391, 82–6.

Kay, J.K., Mackle, T.R., Auldist, M.J., Thompson, N.A., Bauman, D.E. (2002). Endogenous synthesis of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in pasture-fed dairy cows. *J Dairy Sci* 85 (suppl. 1): 176 (Abstr.).

Keating, P. (2006). Phonetic Encoding of Prosodic Structure. *Speech Production: Models, phonetics processes, and techniques*, ed. Harrington, J., Tabain, M. 167-186.

- Kelley, D.S., Erickson, K.L. (2003). Modulation of body composition and immune cell functions by conjugated linoleic acid in humans and animal models: Benefits vs. risks. *Lipids* 38, 377-386.
- Kemp, P., & Lander, D. J. (1984). Hydrogenation in vitro of α -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. *J Gen Microbiol*, 130, 527-533.
- Kepler C.R., Hirons K.I., McNeill P.H., Tove S.B. (1967). - Intermediates and products of biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 241: 1350-1354.
- Khanal, R.C., Dhiman, T.R., McMahon, D.J., Boman, R.L. (2002). Influence of diet on conjugated linoleic acid content of milk, cheese and blood serum. *J Dairy Sci* 85: (Suppl. 1): 142 (Abstr.).
- Khanal, RC, Olson, KC. (2004). Factors affecting conjugated linoleic acid (CLA) content in milk, meat, and egg: a review. *Pakistan J. Nutr.* 3, 82-98.
- Kim, Y. J., Liu, R. H., Bond, D. R., & Russell, J. B. (2000). Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. *Appl Environ Microbiol*, 66, 5226-5230.
- Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 126-139.
- Kinsella, J.E. (1972). Stearyl CoA as a precursor of oleic acid and glycerolipids in mammary microsomes from lactating bovine: possible regulatory step in milk triglyceride synthesis. *Lipids* 7, 349-355.
- Koh, C.S. (2007). Comments on Draft Document: Diet, Nutrition, and the Prevention of Chronic Diseases.

Kott, R. W., Hatfield, P. G., Bergman, J. W., Flynn, C. R., Van Wagoner, H., Boles, J. A. (2003). Feedlot performance, carcass composition, and muscle and fat CLA concentrations of lambs fed diets supplemented with safflower seeds. *Small Rumin. Res.* 49,11.–17.

Kramer, J.K.G., Sehat, N., Dugan, M.E.R., Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P., Roach, J.A.G., Eulitz, K., Aalhus, J.L., Schaefer, A.L., and Ku, K. (1998). Distribution of Conjugated Linoleic acid (CLA) Isomers in Tissue Lipid Classes of Pigs Fed a Commercial CLA Mixture Analyzed by GC and Silver Ion-HPLC, *Lipids* 33, 549–558.

Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, Khrapko K, Kosik KS. (2003). A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA* 9: 1274–1281.

Kris-Etherton, P. M., and S. Yu. (1997). Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins: human studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 65(Suppl.): 1628S-1644S.

Kris-Etherton, P., S. R. Daniels, R. H. Eckel, M. Engler, B. V. Howard, R. M. Krauss, A. H. Lichtenstein, F. Sacks, S. St. Jeor, and M. Stampfer. (2001). AHA scientific statement: Summary of the scientific conference on dietary fatty acids and cardiovascular health. Conference summary from the nutritional committee of the American Heart Association. 1. *Nutr.* 131: 1322-1326.

Larsen LF, Bladbjerg EM, Jespersen J, Marckman P. (1997). Effects of fat quality and quantity on postprandial activation of blood coagulation factor VII. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 17: 2904-2909.

LeDoux, M., Rouzeau, A., Bas, P., Sauvant, D. (2002). Occurrence of trans-C fatty acid isomers in goat 18:1 milk: effect of two dietary regimens. *J Dairy Sci* 85, 190-197.

- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75: 843-854.
- Lee, K.N., Kritchevsky, D., Pariza, M.W. (1994). Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 108, 19–25.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S., and Kim, V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo J*, 21:4663-4670.
- Lee, M.R.F., Harris, L.J., Dewhurst, R.J., Merry, R.J., Scollan, N.D. (2003a). The effect of clover silages on long-chain fatty acid rumen transformations and digestion in beef steers. *Anim. Sci.* 76, 491–501.
- Lee, M.R.F., Winters, A.L., Scollan, N.D., Dewhurst, R.J., Theodorou, M.K., Minchen, F.R. (2003b). Plant-mediated lipolysis and proteolysis in red clover with different polyphenol oxidase activities. *J. Sci. Food Agric.* 84, 1639–1645.
- Leung AK, Sharp PA. (2010). MicroRNA functions in stress responses. *Mol Cell*; 40: 205–215.
- Li L, Huang J, Ju Z, Li Q, Wang C, Qi C, Zhang Y, Hou Q, Hang S, Zhong J. (2012). Multiple promoters and targeted microRNAs direct the expressions of HMGB3 gene transcripts in dairy cattle. *Anim Genet*.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Weinstein, E.G., Abdelhakim, A., Yekta, S., Rhoades, M.W., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2003). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev*, 17: 991-1008.
- Lin, X.-Z., Luo, J., Zhang, L.-p., Wang, W., Shi, H.-b., Zhu, J.-j. (2013a). miR-27a suppresses triglyceride accumulation and affects gene mRNA expression associated with fat metabolism in dairy goat mammary gland epithelial cells. *Gene*. 2013;521:15–23.

Lin X, Luo J, Zhang L, Wang W, Gou D. (2013b). MiR-103 Controls Milk Fat Accumulation in Goat (*Capra hircus*) Mammary Gland during Lactation. *PLoS ONE* 8(11): e79258.

Lock, A.L., Garnsworthy, P.C. (2002). Independent effects of dietary linoleic and linolenic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cows' milk. *Anim Sci* 74, 163-176.

Lock, A.L., Garnsworthy, P.C. (2003). Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and $\Delta 9$ -desaturase activity in dairy cows. *Livestock Prod. Sci.* 79, 47-59.

Loewenstein, M., Frank, J.L. and Speck, S.J. (1984). Goat cheese. In: *Extension Goat Handbook*. USDA, Washington, DC, 10 pp.

Loor, J.J., Herbein, J.H., Polan C.E. (2002). Trans18:1 and 18:2 isomers in blood plasma and milk fat of grazing cows fed a grain supplement containing solvent-extracted or mechanically extracted soybean meal. *J Dairy Sci* 85, 1197-1207.

Loor J.J., Ferlay A., Ollier A., Ueda K., Doreau M., Chilliard Y. (2005). High-Concentrate Diets and Polyunsaturated Oils Alter Trans and Conjugated Isomers in Bovine Rumen, Blood, and Milk. *J. Dairy Sci.* 88:3986-3999.

Maczulak, A.E., Dehority, B.A., Palmquist, D.L. (1981). Effects of long-chain fatty acids on growth of rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 42, 856-862.

Madron, M.S., Peterson, D.G., Dwyer, D.A., Corl, B.A., Baumgard, L.H., Beerman, D.H., Bauman, D.E. (2002). Effect of extruded full-fat soybeans on conjugated linoleic acid content of intramuscular, intermuscular and subcutaneous fat in beef steers. *J Anim Sci* 80, 1135-1143.

Mahfouz, M.M., Valicenti, A.J., Holman, R.T. (1980). Desaturation of isomeric trans-octadecenoic acids by rat liver microsomes. *Biochim Biophys Acta* 618, 1-12.

Maia MRG, Chaudhary LC, Figueres L and Wallace RJ. (2007). Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie van Leeuwenhoek* 91, 303–314.

Mallatou H., Pappa E., Massouras T. (2003). Changes in free fatty acids during ripening of Teleme cheese made with ewes', goats', cows' or a mixture of ewes' and goats' milk *International Dairy Journal*, Volume 13, Issues 2-3, , Pages 211-219.

Mann GV. (1993). A short history of the diet/heart hypothesis, In: GV Mann (Ed.): *Coronary Heart Disease: The Dietary Sense and Nonsense*. London: Janus Publishing, pp. 1-17.

Manso, T., Bodas, R., Vieira, C., Mantecon, A.R., Castro, T. (2011). Feeding vegetable oils to lactating ewes modifies the fatty acid profile of suckling lambs. *Animal* 5,1659-1667.

Marckman P, Sandstrom B, Jespersen J. (1990). Effect of total fat content and fatty acid composition in diet on factor VII coagulant activity and blood lipids. *Atherosclerosis*, 80: 227-233.

Martin, G.S., Lunt, D.K., Britain, K.G., Smith, S.B. (1999). Postnatal development of stearoyl coenzyme A desaturase gene expression and adiposity in bovine subcutaneous adipose tissue. *J Anim Sci* 77, 630-636.

Matsushita M., Tazinafo N.M., Padre R.G., Oliveira C.C., Souza N.E., Visentainer J.V., Macedo F.A.F., Ribas N.P. (2007). Fatty acid profile of milk of Saanen goats fed a diet enriched with three vegetable oils. *Small Ruminant Research* 72, 127-132.

- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D. (1992). *Nutrizione animale. Tecniche nuove*, Milano Italia.
- Medrano J. F., Johnson A., DePeters E. J., Islas A. (1999). Genetic modification of the composition of milk fat: identification of polymorphisms within the bovine stearoyl-CoA desaturase gene. *J. Dairy Sci.* 82(Suppl. 1):71. (Abstr.).
- Mele C., Medagli P., Accogli R., Beccarisi L., Albano A., Marchiori S. (2006). Flora of Salento (Apulia, Southeastern Italy): an annotated checklist. *Flora Medit.*, 16: 193-245.
- Mensink GBM, Hermann-Kunz E, Thamm M. (1998). Der Ernährungssurvey. *Gesundheitswesen*, 60: ((Suppl 2)) S83-S86, (in German).
- Milner, J. A. (1999). Functional foods and health promotion. *J. Nutr.* 129:1395S-1397S. National Research Council. 2003. *Frontiers in Agricultural Research: Food, Health, Environment and Communities*. National Academy Press, Washington DC.
- Modesto, P., Peletto, S., Pisoni, G., Cremonesi, P., Castiglioni, B., Colussi, S., Caramelli, M., Bronzo, V., Moroni, P., Acutis, P.L. (2013). Evaluation of internal reference genes for quantitative expression analysis by real-time reverse transcription-PCR in somatic cells from goat milk. *J. Dairy Sci.* 96, 7932–7944.
- Moioli B., Orrù L., Catillo G., Congiu G.B., Napolitano F. (2005). Partial sequencing of Stearoyl-CoA desaturase gene in buffalo. *Italian J Anim Sci*, 4, 25-27.
- Moore J.H., Christie W.W. (1981). Lipid metabolism in the mammary gland of ruminant animals, in Christie W.W. (Ed.), *Lipid metabolism in ruminant animals*, Pergamon Press, pp.227-277.

Moore, T. (1939). Spectroscopic changes in fatty acids. VI. *General Biochem J* 33, 1635-1638.

Munday, J.S., Thompson, K.G., James, K.A. (1999). Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *Br J Nutr* 81, 251-5.

Mura, M.C., Daga, C., Bodano, S., Paludo, M., Luridiana, S., Pazzola, M., Dettori, M.L., Vacca, G.M., 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.

National Research Council. (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 6th Rev. Ed. National Academy of Sciences, Washington, D.C.

Nicolosi, R. J. (1997). Dietary fat saturation effects on low-density-lipoprotein concentrations and metabolism in various animal models. *Am. J. Clin. Nutr.* 65(Suppl.):1617S-1627S.

Ntambi, J.M. (1995). The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD). *Prog Lipid Res* 34, 139-150

Ntambi, J.M. (1999). Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *Journal of Lipid Research*, 40, 1549-1558.

Nudda, A.; Mele, M.; Battacone, G.; Usai, M. G. and Macciotta, N. P.P. (2003). Comparison of conjugated linoleic acid (CLA) content in milk of ewes and goats with the same dietary regimen. *Italian Journal of Animal Science* 2(Suppl. 1):515-517.

Nudda A., Battacone G., Usai M.G., Fancellu S., Pulina G. (2006). Supplementation with extruded linseed cake affects concentrations of conjugated linoleic acid and vaccenic acid in goat milk. *Journal of Dairy Science* 89, 277-282.

Ochoa, J.J., Farquharson, A.J., Grant, I., Moffat, L.E., Heys, S.D., Wahle, K.W.J. (2004). Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation: different molecular mechanisms for cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 isomers. *Carcinogenesis* 25, 1185-91.

Oliveira AP, Sauer U. (2012). The importance of post-translational modifications in regulating *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *FEMS Yeast Res* 12: 104–117

Page, A.M., Sturdivant, C.A., Lunt, D.K., Smith, S.B. (1997). Dietary whole cottonseed depresses lipogenesis but has no effect on stearoyl coenzyme desaturase activity in bovine subcutaneous adipose tissue. *Comp Biochem Physiol* 118, 79-84.

Palmquist, D.L.; Conrad, H.R. (1978). High fat rations for dairy cows. effects on feed intake, milk and fat production, and plasma metabolites. *Journal of Dairy Science*, v.61, n.7, p.890-901.

Palmquist, D.L., Jenkins, T.C. (1980). Fat in lactation rations: review. *JDairy Sci* 63, 1-14.

Palmquist D.L., Beaulieu A.D., Barbano D.M. (1993). Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J Dairy Sci.* 76, 1753-1771.

Pandya A.J., Ghodke K.M. (2007). Goat and sheep milk products other than cheeses and yoghurt. *Small Ruminant Research* 68, 193-206.

Pariza, M. W. & Hargraves, W. A. (1985). A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis* 6:591-593.

Park Y.W. (1994). Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Ruminant Research*, Volume 14, Issue 2, August, Pages 151-159.

- Park, Y., Albright, K.J., Storkson, J.M., Liu, W., Cook M.E., Pariza M.W. (1999). Changes in Body Composition in Mice During Feeding and Withdrawal of Conjugated Linoleic Acid. *Lipids* 34, 243-248.
- Park, Y.W., Juárez, M., Ramos, M., Haenlein, G.F.W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, Volume 68, Issues 1-2, March, Pages 88-113.
- Parodi, P.W. (1977). Conjugated octadecadienoic acids of milk fat. *J Dairy Sci* 60, 1550-1553.
- Parodi, P.W. (1994). Conjugated linoleic acid: an anticarcinogenic fatty acid present in milk fat. *Aust J Dairy Tec* 40, 93-97.
- Parodi, P. W. (1999). Conjugated Linoleic Acid and Other Anticarcinogenic Agents of Bovine Milk Fat. *Journal of Dairy Science*, 82, 1339-1349.
- Pastuschenko, V., Matthes, H.-D., Hein, T. & Holzer, Z. (2000). Impact of cattle grazing on meat fatty acid composition in relation to human nutrition. *Proceedings of the 13th International IFOAM Scientific Conference* (ed. T. Alföldi, W. Lockeretz, U. Niggli), Basel, Switzerland, pp. 293 – 296.
- Patsch JR. (1994). Triglyceride rich lipoproteins and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 110: S 23-S 26.
- Pauciullo A., Cosenza G., D'Avino A., Colimoro L., Iorio C., Nicodemo D., Di Berardino D., Ramunno L. (2007). Preliminary analysis of Stearoyl Co-A Desaturase gene transcripts in River buffalo. *Italian J Anim Sci*, 6: 283-286.
- Pauciullo A., G. Cosenza , A. D'Avino , L. Colimoro , D. Nicodemo , A. Coletta , M. Feligini , C. Marchitelli , D. Di Berardino , L. Ramunno. (2010). Sequence analysis and genetic variability of stearoyl CoA desaturase (SCD) gene in the Italian Mediterranean river buffalo. *Molecular and Cellular Probes*, 24: 407-410.

- Pechová A, Pavlata L, Lokajová E. (2006). Zinc supplementation and somatic cell count in milk dairy cows. *Acta Vet Brno* 75: 355-361.
- Pedersen A, Marckman P, Sandstrom B. (1999). Post prandial lipoprotein, glucose and insulin response after two consecutive meals containing rapeseed oil, sunflower oil or palm oil with or without glucose at the first meal. *British Journal of Nutrition*, 82: 97-104.
- Pérez Alba, L.M., De Souza, S., Pérez, M., Martínez, A., Fernández, G. (1997). Calcium soaps of olive fatty acids in the diets of Manchega dairy ewes: Effects on digestibility and production. *J. Dairy Sci.* 80, 3316-3324.
- Perfield, J.W., Bernal-Santos, G., Overton, T.R., Bauman, D.E. (2002). Effects of dietary supplementation of rumen-protected conjugated linoleic acid in dairy cows during established lactation. *J. Dairy Sci.* 85, 2609–2617.
- Piperova, L.S., Sampugna, J., Teter, B.B., Kalscheur, K.F., Yurawecz, M.P., Ku, Y., Morehouse, K.M., Erdman, R.A. (2002). Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9-containing CLA in lactating dairy cows. *J Nutr* 132, 1235-1241.
- Pizzillo M., Claps S., Cifuni G.F., Fedele V., Rubino R. (2005). Effect of goat breed on the sensory, chemical and nutritional characteristics of ricotta cheese. *Livestock Production Science*; Volume 94, Issues 1-2, June 2005, Pages 33-40.
- Pollard, M.R., Gunstone, F.D., James, A.T., Morris, L.J. (1980). Desaturation of positional and geometric isomers of monoenoic fatty acids by microsomal preparations from rat liver. *Lipids* 15, 306-314.
- Porter, S.F. (2003). Conjugated linoleic acid in tissues from beef cattle fed different lipid supplements. Master's Thesis. Utah State University, UT, USA.

- Poulson, C.S. (2001). Influence of diet on the conjugated linoleic acid content and quality of beef. Master's Thesis. Utah State University, UT, USA.
- Priolo A, Bella M, Lanza M, Galofaro V, Biondi L, Barbagallo D, Ben Salem H, Pennisi P. (2005). Carcass and meat quality of lambs fed fresh sulla (*Hedysarum coronarium* L.) with or without polyethylene glycol or concentrate. *Small Rumin Res.*;59:281–288.
- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H., Moorman, A.F. (2003). Assumption free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosc. Lett.* 339, 62–66.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. (2000). *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*, in *Nature*, vol. 403, n° 6772, Febbraio, pp. 901–6,
- Riel, R.R. (1963). Physico-chemical characteristics of Canadian milk fat. Unsaturated fatty acids. *J Dairy Sci* 46, 102-106.
- Roche HM, Gibney MJ. (1995). Postprandial triacylglycerolemia-nutritional implications. *Progress in Lipid Research*, 34 (3): 249-266.
- Roche, HM. (2000). Low-fat diets, triglycerides and coronary heart disease risk. *Nutrition Bulletin*, 25:49-53.
- Rodriguez A, Vigorito E, ClareS, Warren MV, Couttet P, et al. (2007). Requirement of bic/microRNA-155 for Normal Immune Function. *Science* 316: 608–611.

- Romao JM, Jin W, He M, McAllister T, et al. (2012). Altered MicroRNA Expression in Bovine Subcutaneous and Visceral Adipose Tissues from Cattle under Different Diet. *PLoS ONE* 7(7): e40605.
- Rubino, R. (1996). *L'allevamento caprino*. ASSONAPA, Roma.
- Russo G. L., Della Pietra V., Mercurio C., Palumbo R., Iacomino G., Russo M., Tosto M., Zappia V. (1999). Protective Effects Of Butyric Acid In Colon Cancer . *Advances Experimental Medicine & Biology* ,Vol. 472:131-147.
- Sacco, J., Adeli, K., Jennifer, S., Khosrow, A. (2012). MicroRNAs: emerging roles in lipid and lipoprotein metabolism. *Lipid Metab.* 23, 220–225.
- Sackman, J.R., Duckett, S.K., Gillis, M.H., Bealin, C.E., Parks, A.H., Eggelston, R.B. (2003). Effects of forage and sunflower levels on ruminal biohydrogenation of fatty acids and conjugated linoleic acid formation in beef steers fed finishing diets. *J Anim Sci* 81, 3174-3181.
- Salado, E. E., Gagliostro, G. A., Becu-Villalobos, D., Lacau-Mengido, I. (2004). Partial replacement of corn grain by hydrogenated oil in grazing dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 87,1265–1278.
- Sangokoya C, Telen MJ, Chi JT. (2010). microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. *Blood* 116: 4338–4348.
- Santos-Silva, J.; Bessa, R.J.B.; Santos-Silva, F. (2002). Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs: fatty and composition of meat. *Liv. Prod. Sci.*, v.77, p.187-194.
- Sanz Sampelayo, M.R., Pérez, L., Martín Alonso, J.J., Amigo, L., Boza, J. (2002). Effects of concentrates with different contents of protected fat rich in PUFAs on the performance lactating Granadina goats Part II. Milk production and composition. *Small Rumin. Res.* 43, 141–148.

SAS, 2000. SAS/STAT Software: Changes and Enhancements Through Release 8.1. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Schmidely, P., Sauvant, D. (2001). Taux butyreux et la composition de la matière gras du lait chez les petits ruminants: effets de l'apport de matières grasses ou d'aliment concentré. *INRA Prod. Anim.* 14, 337–354.

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* Jan 31;7:3.

Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* 7, 3–12.

Schroeder, G. F., Delahoy, J. E., Vidaurreta, I., Bargo, F., Gagliostro, G. A. & Muller, L. D. (2003). Milk Fatty Acid Composition of Cows Fed a Total Mixed Ration or Pasture Plus Concentrates Replacing Corn with Fat. *J Dairy Sci* 86, 3237-3248.

Scollan, N. D.; Costa, P.; Hallett, K. G.; Nute, G. R.; Wood, J. D.; Richardson, R. I. (2006). The fatty acid composition of muscle fat and relationships to meat quality in Charolais steers: influence of level of red clover in the diet. *Proc. Brit. Soc. Anim. Sci.*, York, UK, March, 2006: 23.

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.

- Secchiari, P.; Campanile, G.; Mele, M. *et al.* (2005). *Fatty acid composition and CLA content of milk fat from Italian buffalo*. 339-343. In: Indicators of milk and beff quality. *EAAP Scientific Series* N° 112. Edit by Hocquette and Gili. p.339-343.
- Sehat, N., Kramer, J.K.G., Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P., Roach, J.A.G., Eulitz, K., Morehouse, K.M., Ku, Y. (1998). Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of chromatographic elution sequences. *Lipids* 33, 963–971.
- Sempere, L.F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., and Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol*, 5: R13.
- Singh, R.J., Chung, G.H., Nelson, R.L. (2007). Landmark research in legumes. *Genome* 50, 525–537.
- Slyper AH. (1992). A fresh look at the atherogenic remnant hypothesis. *Lancet*, 340: 289-291.
- Soyeurt, H., Dehareng, F., Mayeres, P., Bertozzi, C., Gengler, N. (2008). Variation of $\Delta 9$ -desaturase activity in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 91, 3211–3224.
- St. John, L.C., Lunt, D.K., Smith, S.B. (1991). Fatty acid elongation and desaturation enzyme activities of bovine liver and subcutaneous adipose tissue microsomes. *J Anim Sci* 69, 1064-1073.
- Storry, J. E., Brumby, P. E., Hall, A. J. & Tuckley, B. (1974). Effects of free and protected forms of cod-liver oil on milk fat secretion in the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 57:1046-1049.

- Strzałkowska N., Józ Wik A., Bagnicka E., Krzyżewski J., Horbaoczuk J.O. (2009). Studies upon genetic and environmental factors Stephan Thomanna, Arno Brechenmacher, Jörg Hinrichs. Strategy to evaluate cheesemaking properties of milk from different goat breeds *Small Ruminant Research* 74 172–178.
- Sun L, Xie HM, Mori MA, Alexander R, Yuan BB, et al. (2011). Mir193b–365 is essential for brown fat differentiation. *Nat Cell Biology* 13: 958–965.
- Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. (2006). NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *PNAS* 103: 12481–12486.
- Talpur, F.N., Bhangar, M.L. & Memon, N.N. (2009). Milk fatty acid composition of indigenous goat and ewe breeds from Sindh, Pakistan. *J. Food Comp. Anal.* 22, 59-64.
- Tanaka T, Haneda S, Imakawa K, Sakai S, Nagaoka K. (2009). A microRNA, miR-101a, controls mammary gland development by regulating cyclooxygenase-2 expression. *Differentiation* 77: 181–187.
- Taniguchi M., Utsugi T., Oyama K., Mannen H., Kobayashi M., Tanabe Y., Ogino A., Tsuji S. (2004). Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acids composition in Japanese Black cattle. *Mammalian Genome*, 14, 142- 148.
- Tholstrup, T., Hjerpsted, J., Raff, M. (2011). Palm oil increases plasma cholesterol moderately compared with olive oil in healthy individuals. *Am. J. Clin. Nutr.* 94, 1426–1432.
- Thomason MK, Storz G. (2010). Bacterial antisense RNAs: how many are there, and what are they doing. *Annu Rev Genet*; 44: 167–188.

- Thomsen C, Ramussen O, Lousen T, Holst JJ, Fenselau S, Schrezenmeir J, Hermansen K. (1999). Differential effects of saturated and monounsaturated fatty acids on postprandial lipemia and incretin responses in healthy subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69: 1135-43.
- Tocher, D.R., Leaver, M.J., Hodgson, P.A. (1998). Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases. *Prog Lipid Res* 37, 73-117.
- Toomey, S., Harhen, B., Roche, H.M., Fitzgerald, D., Belton, O. (2006). Profound resolution of early atherosclerosis with conjugated linoleic acid. *Atherosclerosis* 187, 40–49.
- Tricon, S., Burdge, G.C., Williams, C.M., Calder, P.C., Yaqoob, P. (2005). The effects of conjugated linoleic acid on human health-related outcomes. *Proc Nutr Soc* 64, 171-182.
- Trygve Skjvedal. (1979). Flavour of goat's milk: A review of studies on the sources of its variations. *Livestock Production Science* Volume 6, Issue 4, October, Pages 397-405.
- Tsiplakou E., Mountzouris K.C., Zervas G. (2006). The effect of breed, stage of lactation and parity on sheep milk fat CLA content under the same feeding practices. *Livestock Science*, 105, 162–167.
- Tsiplakou, E., Flemetakis, E., Kalloniati, C., Papadomichelakis, G., Katinakis, P., Zervas, G. (2009). Sheep and goats differences in CLA and fatty acid milk fat content in relation with mRNA Stearoyl-CoA desaturase and lipogenic genes expression in their mammary gland. *J. Dairy Res.* 76, 392–401.
- Tsiplakou E, Hadjigeorgiou I, Sotirakoglou K, Zervas G. (2011). Differences in mean retention time of sheep and goats under controlled feeding practices. *Small Rumin Res.* ;95:48–53.

Tudisco,R.,Cutrignelli,M.I.,Calabrò',S.,Piccolo,G.,Bovera,F.,Guglielmelli,A., Infascelli, F. (2010). Influence of organic systems on milk fatty acid profile and CLA in goats. *Small Rum. Res.* 88, 151–155.

Tudisco, R., Calabrò, S., Cutrignelli, M.I., Moniello, G., Grossi, M., Gonzalez,O.J., Piccolo, V., Infascelli, F. (2012). Influence of organic systems on stearoyl-CoA-desaturase in goat milk. *Small Rumin. Res.* 106, 37–42.

Tudisco, S. Calabrò, M.I. Cutrignelli, G. Moniello, M. Grossi, O.J. Gonzalez, V. Piccolo, F. Infascelli. (2012). Influence of organic systems on Stearoyl-CoA desaturase gene expression in goat milk. *Small Rumin Res.* S37–S42.

Tudisco R., Grossi M., Calabrò S., Cutrignelli M.I., Musco N., Addi A., Infascelli F. (2014). Influence of pasture on goat milk fatty acids and Stearoyl-CoA desaturase expression in milk somatic cells. *Small Rumin. Re.* 122, 38–43.

Ulbricht, T.L.V., Southgate, D.A.T. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *The Lancet* 338, 985-992.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci.* 74, 3583–3597.

Ventura, A., Young, A.G., Winslow, M.M., Lintault, L., Meissner, A., Erkeland, S.J., Newman, J., Bronson, R.T., Crowley, D., Stone, J.R., Jaenisch, R., Sharp, P.A., and Jacks, T. (2008). Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*, 132: 875-886.

Vogel RA, Coretti MC, Plotnick GD. (1997). Effect of a single high fat meal on endothelial function in healthy subjects. *American Journal of Cardiology*, 79: 350-354.

- Wahle, K.W.J., Heys, S.D., Rotondo, D. (2004). Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Prog Lipid Res* 43, 553-587
- Wang M, Moisés S, Khan MJ, Wang J, Bu D, Loo JJ. (2012). MicroRNA expression patterns in the bovine mammary gland are affected by stage of lactation. *J Dairy Sci* 95: 6529–6535.
- Ward, R.J., Travers, M.T., Richards, S.E., Vernon, R.G., Salter, A.M., Buttery, P.J., Barber, M.C. (1998). Stearoyl-CoA desaturase mRNA is transcribed from a single gene in the ovine genome. *Biochim Biophys Acta* 1391, 145-156.
- West, D.B., DeLany, J.P., Camet, P.M., Blohm, F., Truett, A.A., Scimeca, J. (1998). Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *Am J Physiol* 44, 667-672.
- Whigham, L., Cook, M. E., Atkinson, R. L. (2000). Conjugated linoleic acid: implications for human health. *Pharmacol. Res.* 42,503-510.
- Wienholds, E. and Plasterk, R.H. (2005). MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett*, 579: 5911-5922.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*; 75:855–862.
- Wittwer F. (2000). Empleo Estratégico de Indicadores Bioquímicos en el Control de problemas metabólicos nutricionales en bovinos. En: XIII Reunión Científico Técnica. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Merlo, San Luis, Argentina.
- World Health Organization. (2003). Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases, WHO Technical Report Series 916, Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation, World Health Organization, Geneva, 88.

- Wu, Z., Huber, J.T, Sleiman, FT, Simas, J.M., Chen, K.H., Chan, S.C., Fontes, C. (1993). Effect of three supplemental fat sources on lactation and digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76, 3562-3570.
- Xiao CC, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, et al. (2007). MiR-150 Controls B Cell Differentiation by Targeting the Transcription Factor c-Myb. *Cell* 131: 146–159.
- Yu, Y., Correll, P.H., Vanden Heuvel, J.P. (2002). Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR gamma-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1581, 89-99.
- Yurawecz, M.P., Roach, J.A.G., Sehat, N., Mossoba, M.M., Kramer, J.K.G., Fritsche, J., Steinhart, H., Ku, Y. (1998). A new conjugated linoleic acid isomer, 7 trans, 9 cis-octadecadienoic acid, in cow milk, cheese beef and human milk and adipose tissue. *Lipids* 33, 803–809.
- Zan, M.; Stibilj, V.; Rogelj, I. (2006). Milk fatty acid composition of goats grazing on alpine pasture. *Small Ruminant Research* 64:45–52.
- Zhang CM, Guo YQ, Yuan ZP, Wu YM, Wang JK, Liu JX and Zhu WY. (2008). Effect of octadeca carbon fatty acids on microbial fermentation, methanogenesis and microbial flora in vitro. *Animal Feed Science and Technology* 146, 259–269.
- Zhang J, Ping W, Chunrong W, Shou XC, Keyou G. (1997). Nonhypercholesterolemic Effects of a Palm Oil Diet in Chinese Adults. *The Journal of Nutrition*, 127: 509S-513S.
- Zhang L, Ge L, Parimoo S, Stenn K, Prouty SM. (1999). Human stearoyl-CoA desaturase: alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem polyadenylation sites. *Biochem J*, 340:255-64.

- Zhang, B.H., Pan, X.P., Wang, Q.L., Cobb, G P., and Anderson, T.A. (2005). Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. *Cell Res*, *15*: 336-360.
- Zhang, B., Pan, X., and Anderson, T.A. (2006). Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets. *FEBS Lett*, *580*: 3753-3762.
- Zhang, R., Mustafa, A.F., Zhao, X. (2006). Effects of flaxseed supplementation to lactating ewes on milk composition, cheese yield, and fatty acid composition of milk and cheese. *Small Rumin. Res.* *63*, 233–241.
- Zhang X, Rossi JJ. (2011). Phylogenetic comparison of small RNA-triggered transcriptional gene silencing. *J Biol Chem*; *286*: 29443–29448.
- Zhu, Z., Hang, S., Zhu, H., Zhong, S., Mao, S., Zhu, W. (2013). Effects of garlicoil on milk fatty acid profile and lipogenesis-related gene expression in mammary gland of dairy goats. *J. Sci. Food Agric.* *93*, 560–567.
- Zock, P.L., de Vries, J.K.M., Katan, M.B. (1994). Impact of myristic acid versus palmitic acid on serum lipid and lipoprotein levels in healthy women and men. *Arterioscler Thromb.* *14*, 567-75.