

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE DELL'ALIMENTAZIONE E DELLA NUTRIZIONE
XX CICLO**

**PROFILO ACIDICO E CONTENUTO DI CLA DEL LATTE:
INDAGINI SPERIMENTALI SU DIVERSE SPECIE RUMINANTI**

Tutore:

Ch.^{mo} Prof.

Federico Infascelli

Candidata:

Dott.^{ssa}

Simona D'Urso

Coordinatore:

Ch.^{mo} Prof.

Claudio Falconi

NOVEMBRE 2007

INDICE

<u>INTRODUZIONE</u>	5
RUOLO DEI GRASSI NELL'ALIMENTAZIONE UMANA	5
CLA E SALUTE UMANA	13
Fonti di CLA nella dieta umana	16
Consumo alimentare di CLA nell'uomo	17
Effetti dei CLA sulla funzione infiammatoria	19
CLA nella prevenzione e nel trattamento del cancro	26
<i>Meccanismi cellulari degli effetti anti-cancerogeni</i>	37
<i>Inibizione dell'angiogenesi</i>	42
<i>Attenuazione delle metastasi</i>	44
<i>Riduzione della cachessia</i>	45
Effetti dei CLA sulla composizione corporea e sul metabolismo energetico	46
<i>Composizione corporea negli animali</i>	46
<i>Composizione corporea nell'uomo</i>	48
Effetti dei CLA sull'insulino-resistenza e sul diabete	50
Effetti dei CLA sui disturbi cardiovascolari	52
COMPOSIZIONE ACIDICA DEL LATTE	54
Metabolismo lipidico nel rumine	54
Sintesi di acidi grassi microbici nel rumine	56
Digestione ed assorbimento dei lipidi nell'intestino	57
Sintesi intestinale delle lipoproteine	58

Sintesi del grasso del latte	59
CONTENUTO DI CLA NEL LATTE	61
Origine dei CLA nei prodotti dei ruminanti	62
<i>Bioidrogenazione ruminale</i>	62
<i>Sintesi endogena</i>	67
<u>PARTE SPERIMENTALE</u>	73
1°CONTRIBUTO SPERIMENTALE	75
Materiali e metodi	75
Analisi statistica	80
Risultati e discussione	81
<i>Composizione chimica e valore nutritivo degli alimenti</i>	81
<i>Produzione e composizione chimica del latte</i>	82
<i>Composizione acidica e contenuto di CLA nel latte</i>	84
Conclusioni	92
2°CONTRIBUTO SPERIMENTALE	94
Materiali e metodi	94
Analisi statistica	98
Risultati e discussione	99
<i>Composizione chimica e valore nutritivo degli insilati</i>	99
<i>Composizione acidica degli insilati</i>	100

<i>Produzione e composizione chimica del latte</i>	101
<i>Composizione acidica e contenuto di CLA nel latte</i>	103
Conclusioni	109
3°CONTRIBUTO SPERIMENTALE	110
Introduzione	110
Materiali e metodi	112
Analisi statistica	114
Risultati e discussione	115
<i>Produzione di IL-1</i>	115
<i>Produzione di IL-6</i>	116
<i>Produzione di TNF-α</i>	117
Conclusioni	118
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	119

INTRODUZIONE

RUOLO DEI GRASSI NELL'ALIMENTAZIONE UMANA

I grassi hanno un'importanza notevole nell'alimentazione umana; con le proteine ed i carboidrati costituiscono la frazione nutrizionale prevalente, svolgendo le seguenti funzioni:

1. *energetica*, permettendo la costituzione di riserve in poco volume (9 Kcal di energia lorda/g);
2. *plastica*, sono componenti fondamentali delle membrane cellulari in tutti i tessuti;
3. di *protezione e sostegno* delle strutture anatomiche;
4. di *isolamento termico* per il mantenimento della temperatura corporea;
5. *veicolante* vitamine e altre sostanze liposolubili;
6. di *appetibilità* degli alimenti;
7. *estetica*, in quanto contribuiscono alla definizione della morfologia dell'organismo.

Tra i requisiti di qualità maggiormente richiesti dal consumatore, rientra la composizione acidica del grasso, per le ripercussioni che essa eserciterebbe sulla salute umana. Nel corso degli ultimi quaranta anni lo studio delle relazioni tra grassi alimentari e salute e, più specificamente, tra grassi alimentari e patologia, è stato prevalentemente orientato verso il problema dell'arteriosclerosi, delle malattie cardiovascolari ed in particolare delle cardiopatie coronariche. Relazioni positive tra livelli

serici di colesterolemia totale, ed in particolare del colesterolo associato alle lipoproteine a bassa densità (LDL), ed insorgenza di cardiopatie coronariche sono state registrate in numerosi studi epidemiologici, sia inter- che intra-popolazioni (Keys, 1967; Keys *et al.*, 1986; Parchi *et al.*, 1989; Fidanza *et al.*, 1999).

I grassi alimentari sono costituiti per il 98-99% da trigliceridi ed in minima parte da costituenti minori quali steroli, alcoli triterpenici, alcoli alifatici, vitamine liposolubili, carotenoidi ed idrocarburi. Tutti i trigliceridi sono costituiti da una molecola di glicerolo (alcool trivalente) esterificata con tre molecole di acidi grassi (per lo più differenti tra loro). Questi ultimi, in funzione del numero dei doppi legami presenti nella catena di atomi di carbonio vengono classificati in:

- saturi (SFA) (Cn:0): privi di doppi legami;
- monoinsaturi (MUFA) (Cn:1): con un solo doppio legame;
- polinsaturi (PUFA) (Cn:2-3-4-5 – n): con più di un doppio legame.

Gli acidi grassi saturi (SFA) hanno prevalentemente significato energetico e sono presenti nei grassi animali, negli oli tropicali e nell'olio di semi di cotone. Numerosi studi epidemiologici indicano che diete con un alto contenuto di SFA sono associate ad alti livelli di colesterolo serico (in particolare LDL) e, quindi, ad un'elevata incidenza di cardiopatie coronariche. Le lipoproteine a bassa densità trasportano la maggior parte del colesterolo nel plasma. Viene generalmente accettata la teoria secondo la quale l'aumento dei livelli di lipoproteine a bassa densità abbia un ruolo eziologico nell'insorgenza dell'aterosclerosi e delle patologie

Formattati: Elenchi puntati e numerati

Formattati: Elenchi puntati e numerati

cardi coronariche. Sembra che queste lipoproteine, praticamente innocue allo stato "originario", diventino "pericolose" dopo un processo di ossidazione che avviene a livello epatico. Esse sono particelle sferiche composte da grassi e proteine e formate da un monolayer esterno contenente la proteina denominata apolipoproteina B (Apo B), disposta attorno ad un nucleo centrale contenente trigliceridi e/o esteri del colesterolo (grassi non polari). Una particella di queste lipoproteine contiene circa 3600 acidi grassi, la metà dei quali è di tipo polinsaturo. Le lipoproteine a bassa densità contengono anche antiossidanti, tra i quali il più importante è l'alfa-tocoferolo (vitamina E). L'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità, definita perossidazione, è una reazione a catena originata dai radicali liberi, che divengono maggiormente reattivi a contatto con l'ossigeno. Gli acidi grassi polinsaturi sono particolarmente predisposti alla perossidazione ed alla divisione in una serie di prodotti, che si legano all'Apo B delle LDL. Il processo di insorgenza dell'aterosclerosi ha inizio quando i macrofagi, cellule che si formano quando i monociti provenienti dal circolo passano attraverso la parete dell'arteria, fagocitano le lipoproteine a bassa densità modificate, contribuendo alla loro trasformazione in cellule schiumose. L'accumulo di cellule schiumose nell'intima determina la formazione di strie lipidiche. Queste non producono un'ostruzione significativa dell'arteria, ma vengono gradualmente convertite, con un meccanismo simile alla formazione delle cicatrici, in placche fibrose, che a loro volta si trasformano gradualmente in lesioni aterosclerotiche, responsabili della maggior parte degli eventi clinicamente rilevabili. Il processo di

ossidazione delle lipoproteine a bassa densità *in vivo* non è molto conosciuto e si pensa possa essere inibito dalla presenza nel plasma di antiossidanti, come ad esempio l'acido ascorbico (vitamina C).

I principali risultati emersi, nel 1984 dalla relazione della Committee on Medical Aspects of Food Policy (COMA) e discussi da Ulbricht e Wheelock. (1989), sono stati:

1. le diete ricche di acido stearico (C18:0), non determinano aumento del colesterolo serico;
2. gli SFA a corta catena (\leq C10), allo stesso modo, non comportano aumento del colesterolo nel sangue, mentre gli SFA a media catena, laurico (C12:0), miristico (C14:0) e palmitico (C16:0) sono aterogenici come già osservato da Keys *et al.* nel 1965.

Molti studi hanno, poi, dimostrato che gli SFA a lunga catena, miristico (C14:0), palmitico (C16:0) e stearico (C18:0) sono anche trombogenici. L'acido miristico è il principale aterogenico poiché ha un potere ipercolesterolemico quattro volte superiore rispetto a quello dell'acido palmitico (Hegsted, 1965).

Gli acidi grassi monoinsaturi (MUFA), costituiti essenzialmente da acido palmitoleico (C16:1) ed oleico (C18:1), sono contenuti negli oli d'oliva, di colza e di avocado.

È stata ampiamente esaminata la correlazione fra gli acidi grassi monoinsaturi e la riduzione della predisposizione all'ossidazione delle LDL. Studi sperimentali sul coniglio mostrano che le lipoproteine a bassa densità ricche di acido oleico, il principale acido grasso dell'olio di oliva, sono molto resistenti all'ossidazione. I risultati ottenuti suggeriscono che

l'assunzione di acidi grassi monoinsaturi può, quindi, associare i vantaggi derivanti dalla riduzione del colesterolo con la diminuzione delle lipoproteine a bassa densità e l'inibizione dell'ossidazione cellulare (Parthasarathy *et al.*, 1990).

Per quanto riguarda gli acidi grassi polinsaturi, infine, alcuni di essi sono denominati "essenziali" (EFA) perché non sono sintetizzabili dall'organismo e devono essere necessariamente introdotti con la dieta, pena l'insorgenza di carenze. Gli EFA sono generalmente suddivisi in due classi n-3 e n-6, a seconda della posizione del loro primo doppio legame a partire dal metile terminale della molecola.

Gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) della serie n-6 hanno quale progenitore l'acido linoleico (C18:2, n-6) che si trova comunemente negli oli vegetali. I PUFA della serie n-3, invece, hanno quale precursore l'acido α -linolenico (C18:3, n-3), che si trova comunemente nei vegetali a foglia verde, nei legumi, nella frutta secca, in alcuni oli come quelli di lino e di soia. Altri PUFA della serie n-3 sono contenuti soprattutto nei grassi del pesce (salmone, sgombri, acciughe ecc.) e nell'olio di fegato di pesce; i più importanti sono l'acido eicosapentanoico (EPA, C20:5), precursore delle prostaglandine della serie 3 e l'acido docosaesanoico (DHA, C22:6), fondamentale per la composizione dei lipidi del cervello e dei fosfolipidi delle membrane sinaptiche, implicate nella trasmissione dell'impulso nervoso; essi sono non essenziali perché sintetizzati dall'organismo a partire da altri acidi grassi.

L'interesse per gli effetti favorevoli degli acidi grassi n-3 sullo stato di salute, soprattutto in rapporto alle patologie cardiovascolari, è nato verso

la fine degli anni '70, in seguito all'osservazione che nelle popolazioni Eschimesi della Groenlandia, che consumano grandi quantità di pesce, particolarmente ricco in tali acidi grassi, l'incidenza della mortalità cardiaca per cause tromboemboliche era molto più bassa rispetto a quella registrata nelle altre popolazioni. Questo fenomeno è denominato "paradosso degli Eschimesi" in quanto le popolazioni della Groenlandia, pur consumando una dieta ricca di grassi animali, presentavano una bassa incidenza di malattie cardiovascolari (Bang e Dyerberg, 1973).

Recenti studi clinici hanno mostrato che gli acidi grassi polinsaturi della famiglia n-6 determinano principalmente una riduzione della colesterolemia (sia lipoproteine ad alta densità, HDL, sia LDL) per cui svolgono un'importante funzione anti-aterogenica. Gli acidi grassi polinsaturi della famiglia n-3, invece, hanno un'attività anti-trombogenica particolarmente evidente, in quanto riducono l'aggregazione piastrinica (Bertoni e Trevisi, 1999).

L'acido linoleico è il più importante precursore alimentare delle prostaglandine. Una piccola aliquota di questo acido è trasformata nel fegato per allungamento e desaturazione in acido arachidonico ed in parte in acido diomo- α -linoleico (DHHLA, C20:3). Il DHHLA è il precursore della prostaglandina E1 (PGE1), un agente antiaggregante; mentre l'acido arachidonico (C20:4) è il precursore del trombossano A2 (TXA2), un potente agente aggregante, e della prostaglandina I2 (PGI2), anch'essa caratterizzata da potere antiaggregante, anche se molto meno forte (Gibney, 1993; Miles e Calder, 1998). Gli acidi grassi polinsaturi della famiglia n-3 agiscono come antiaggreganti attraverso:

1. l'EPA, precursore del trombossano A₃ (TXA₃), un debole agente aggregante e della prostaglandina I₃ (PGI₃), un potente antiaggregante. Quindi, una sostituzione nella dieta di acidi grassi polinsaturi n-6 con quelli n-3, come precursori di prostaglandine e trombossani, indurrebbe uno squilibrio tra agenti aggreganti/agenti antiaggreganti facendo prevalere questi ultimi;
2. l'inibizione della conversione dell'acido arachidonico in TXA₂ nelle piastrine.

Alla luce di tutte queste considerazioni, il solo rapporto acidi grassi polinsaturi/saturi (PUFA/SFA) non viene più considerato un valido indice per la stima dell'aterogenicità e/o della trombogenicità di una dieta o di un alimento, in quanto tale teoria partiva dall'assunto che tutti gli acidi grassi saturi fossero dannosi per la salute umana. Attualmente, come suggerito da Ulbricht e Southgate (1991), vengono, invece, presi in considerazione anche gli acidi grassi monoinsaturi e le potenzialità aterogenetiche e trombogenetiche vengono espresse con i seguenti indici:

Indice di Aterogenicità (IA):

$$IA = [C12:0 + (4 \times C14:0) + C16:0]/(n-3 + n-6 + MUFA)$$

Indice di Trombogenicità (IT):

$$IT = (C14:0 + C16:0 + C18:0)/[(0,5 \times C18:1) + (0,5 \times MUFA) + (0,5 \times n-6) + (3 \times n-3) + (n-3/n-6)]$$

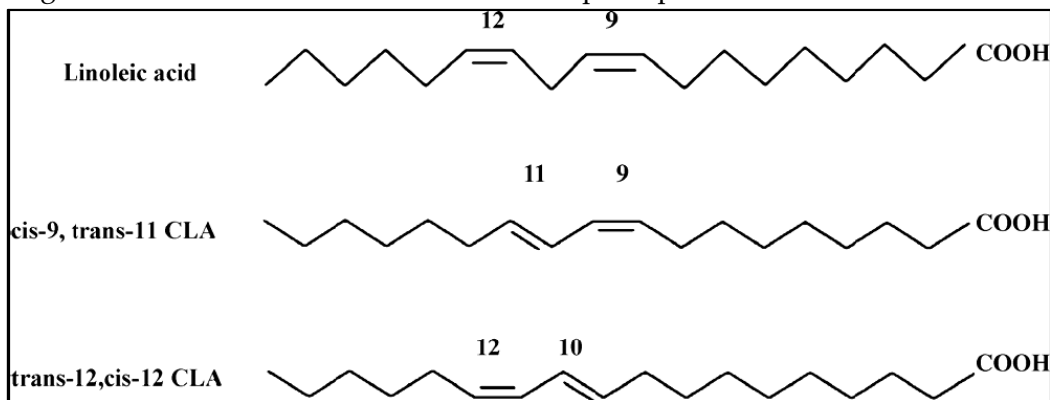
È necessario, quindi, correggere molti pregiudizi riguardo il ruolo dei lipidi alimentari che, per decenni, sono stati considerati dannosi alla salute al punto da arrivare ad escluderli completamente dalle diete destinate a soggetti affetti da patologie cardiovascolari. Oggi è possibile affermare che non tutti i grassi sono nocivi, anzi alcuni intervengono nella prevenzione delle malattie cardiovascolari e di alcuni tumori.

Recentemente ad alcuni acidi grassi insaturi a 18 atomi di carbonio, caratterizzati da peculiari strutture a dieni coniugati che li distinguono dall'acido linoleico, è stata attribuita una potente azione anti-cancerogena. Tali acidi grassi sono stati definiti acido linoleico a dieni coniugati o CLA, acronimo dall'inglese Conjugated Linoleic Acids. La National Academy of Sciences degli Stati Uniti ha definito i CLA come gli unici acidi grassi che hanno mostrato di possedere una chiara attività anti-cancerogena. Queste molecole sono, oggi, oggetto di numerosi studi per le specifiche attività anti-cancerogene, anti-aterogene ed anti-diabetiche. Poiché i CLA sono prodotti intermedi dei processi di bioidrogenazione degli acidi grassi nel ruminante, essi sono presenti nel latte, nei prodotti lattiero caseari e nelle carni dei ruminanti. In particolare nella carne bovina sono state registrate concentrazioni tra 2,9 e 4,3 mg/g di grasso, mentre in quella di agnello valori di 5,6 mg/g di grasso; nelle carni di maiale, pollo e delle specie ittiche i tenori in CLA sono molto inferiori, fatta eccezione per il tacchino che ha fatto registrare concentrazioni di 2,5 mg/g di lipidi (Banni *et al.*, 1999).

CLA E SALUTE UMANA

Il termine CLA (conjugated linoleic acid) si riferisce ad un gruppo di isomeri posizionali e geometrici dell'acido octadecadienoico o linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12), caratterizzati dalla presenza di due doppi legami coniugati, diversi dai classici legami metilenici presenti nella struttura dell'acido linoleico (Fig.1). 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).

Fig.1 Struttura dell'acido linoleico e dei due principali isomeri dei CLA



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 anzichè 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 diversi aspetti della salute umana, quali la composizione corporea, la carcinogenesi, i disturbi cardiovascolari, l'insulino-resistenza e il diabete, la funzione immunitaria (tab.1).

Tab. 1 Alcuni effetti benefici dei CLA sulla salute umana

Anti-cancerogenesi	<ul style="list-style-type: none"> • Inibizione crescita/metastatizzazione del tumore • Inibizione della proliferazione cellulare • Inibizione dell'angiogenesi • Promozione di condizioni pro-apoptotiche
Anti-aterosclerosi	<ul style="list-style-type: none"> • Riduzione della formazione di placche • Riduzione dell'espressione di molecole di adesione • Inibizione della produzione di citochine • Inibizione dell'angiogenesi • Promozione della regressione delle placche
Anti-obesità	<ul style="list-style-type: none"> • Riduzione del deposito di grasso • Riduzione dell'insulino-resistenza/diabete • Aumento dell'apoptosi degli adipociti • Inibizione dell'attività della lipoprotein-lipasi
Infiammazione	<ul style="list-style-type: none"> • Inibizione delle citochine infiammatorie • Inibizione degli eicosanoidi infiammatori

Possono inoltre modulare l'espressione di importanti geni, o direttamente attivando specifici elementi di risposta per gli acidi grassi o indirettamente attraverso la regolazione dell'espressione genica di specifici fattori di trascrizione coinvolti in molti processi metabolici.

La maggioranza degli studi atti a valutare gli effetti dei CLA sulla salute umana è stata condotta utilizzando prodotti sintetizzati chimicamente, contenenti una miscela di *cis* e *trans* isomeri, in diverse proporzioni. Studi più recenti sono invece stati effettuati usando singolarmente il *cis-9*, *trans-11* e il *trans-10*, *cis-12* in forme altamente purificate. I risultati ottenuti in seguito all'utilizzo di miscele sono in contrasto con quelli osservati nel caso dei singoli isomeri e ciò suggerirebbe che i due isomeri abbiano effetti diversi sulla fisiologia dell'organismo e sui meccanismi cellulari che ne sono alla base. L'isomero *trans-10*, *cis-12* sembra inoltre avere effetti negativi sulla salute, soprattutto a causa dell'aumento dei processi ossidativi a carico dei lipidi e della conseguente formazione di isoprostani (Whale *et al.*, 2004; Tricon *et al.*, 2005; Bhattacharya *et al.*, 2006). Tali osservazioni necessitano di ulteriori chiarimenti prima di poter essere considerate scientificamente dimostrate. In ogni caso è interessante chiedersi perché nessun effetto negativo venga osservato quando l'isomero meno presente in natura, il *trans-10*, *cis-12*, viene somministrato in associazione al più comune isomero, il *cis-9*, *trans-11*.

Fonti di CLA nella dieta umana

Le principali fonti di CLA sono i prodotti dei ruminanti o di animali con processi fermentativo-digestivi simili a quelli dei ruminanti, come i canguri e i wallaby. Conseguentemente, la principale risorsa di CLA nell'alimentazione occidentale deriva dalla carne dei ruminanti e dai loro prodotti lattiero-caseari (tab. 2). Il latte è il prodotto dei ruminanti più ricco in CLA, il cui contenuto può variare da 5.4 a 7.0 mg/g lipidi in base alla specie animale considerata.

I CLA sono totalmente assenti negli oli vegetali. Piccole quantità di CLA (0.1-0.7 mg/g di olio) possono, però, essere prodotte durante il riscaldamento, la decolorazione e la deodorizzazione nei processi di raffinazione degli oli alimentari (Saebo, 2003). Oli parzialmente idrogenati, usati nella produzione di margarine e grassi per pasticceria, contengono una vasta gamma di *cis* e *trans* isomeri. Negli anni '90, studi metabolici ed epidemiologici hanno riportato che gli acidi grassi alimentari *trans* degli oli idrogenati potevano essere dannosi per la salute umana, in particolare per un aumento del rischio di disturbi coronarici. Originariamente si credeva che tali effetti fossero legati all'induzione di profili lipoproteici altamente rischiosi (aumento del colesterolo totale e LDL e diminuzione del colesterolo HDL) e all'attenuazione della sintesi cellulare di eicosanoidi regolatori (Katan *et al.* 1995; Hwang e Kinsella, 1979). L'industria degli oli alimentari mise a punto pertanto alcuni processi per eliminare gli isomeri parzialmente idrogenati dai suoi prodotti, così che attualmente margarine e grassi di pasticceria

contengono irrilevanti quantità di acidi *trans*, compresi TVA e CLA (Whale e James, 1993; Whale, 1994).

Tab. 2 Valori medi di CLA (mg/g di grasso) di alcuni alimenti

Prodotto	CLA <i>mg/g grasso</i>
Latte	5.4-7.0
Formaggi	2.9-7.1
Manzo	2.9-4.3
Vitello	2.7
Agnello	5.6
Maiale	0.6
Pollo	0.9
Tacchino	2.6
Tuorlo d'uovo	0.6
Olio d'oliva	0.2
Olio di girasole	0.4
Olio di cartamo	0.7

Consumo alimentare di CLA nell'uomo

I metodi usati per stimare l'ingestione quotidiana di CLA nelle popolazioni sono: sondaggi su vasta scala, dettagliate valutazioni su piccoli gruppi di popolazione basate su dati acquisiti nel corso di periodi della durata da 24 ore a 7 giorni, questionari retrospettivi o combinazioni di questi metodi (Parodi, 2003; Fritsche *et al.*, 1999). Ognuno di essi presenta dei limiti; in particolare, i questionari retrospettivi a lungo termine sulla frequenza alimentare sono soggetti ad errori di valutazione a causa dell'inaffidabilità del ricordo e delle variazioni individuali. Sono stati pubblicati dati circa le quantità stimate di ingestione di CLA in

diversi popolazioni, a partire da quelle in cui il consumo di carne e prodotti lattiero-caseari è quasi nullo fino a quelle australiane in cui il consumo di CLA è di circa 1500 mg/giorno (Parodi 2003; Fritsche *et al.*, 1999). In Italia l'ingestione media di CLA è stata stimata intorno ai 300 mg/giorno, negli Stati Uniti è di 52 e 137 mg/giorno per uomini e donne rispettivamente, in Gran Bretagna è di circa 400-600 mg/giorno e per uomini e donne tedesche è rispettivamente di 430 e 350 mg/giorno. In genere nelle donne l'ingestione di CLA è minore e ciò è probabilmente dovuto a un più basso consumo di grassi di origine animale (Parodi, 1997; McGuire *et al.*, 1999; Parodi, 2003).

L'ingestione media di CLA, tuttavia, non è indicativa della quantità assoluta di CLA disponibile per un individuo, a causa della conversione endogena di TVA in CLA che avviene anche nell'uomo è attraverso l'enzima SCD1 (Kuhnt *et al.*, 2006; Moseley *et al.*, 2006). E' stato infatti stimato che circa il 20% del TVA potrebbe essere convertito in CLA (Turpeinen *et al.*, 2002; Bauman and Griinari, 2003).

Il raggiungimento di un apporto giornaliero di CLA di 3-6 g, cioè il livello al quale sono previsti effetti benefici sulla salute, non è assicurato dall'ingestione degli alimenti naturali non arricchiti. Tale obiettivo sarebbe invece raggiungibile attraverso l'aumento della concentrazione di CLA nel latte e quindi nei prodotti lattiero-caseari, grazie alla manipolazione delle diete destinate agli animali, attraverso l'ingestione di capsule di oli arricchiti con CLA, o semplicemente attraverso l'ingestione di alimenti additivati (cibi funzionali). L'industria alimentare è

particolarmente interessata allo sviluppo di tali cibi funzionali arricchiti con diversi acidi grassi bioattivi come i PUFA n-3 e n-6 e i CLA.

Effetti dei CLA sulla funzione infiammatoria

Le variazioni della funzione immunitaria e infiammatoria legati all'età, a deficienze o eccessi alimentari, sono implicate nell'eziologia di molti comuni disturbi della salute umana. E' ormai chiaro che le alterazioni del livello degli acidi grassi ematici influenzano la funzione immunitaria in condizioni sia fisiologiche che fisio-patologiche. Il profilo acidico della dieta è uno dei fattori che maggiormente influenza la composizione in acidi grassi del sangue e della membrana cellulare. Ciò è particolarmente importante in situazioni quali stress, traumi, esercizi fisici intensi e diabete. L'effetto dei diversi acidi grassi saturi ed insaturi sui processi infiammatori è stato studiato in modo approfondito (Wahle *et al.*, 2004; Tricon *et al.*, 2005; Bhattacharya *et al.*, 2006; Grimble, 1998; Harbige, 2003). Tuttavia, non esistono molte informazioni circa gli effetti dei CLA sulla funzione immunitaria di uomini e animali.

La risposta iniziale del sistema immunitario ad un agente estraneo, quale ad esempio l'endotossina (lipopolisaccaridi, LPS) della parete cellulare esterna di un batterio Gram-negativo, è rappresentata dall'attivazione dei monociti circolanti nel sangue o dei macrofagi residenti nei tessuti. Si ritiene che i monociti abbiano un ruolo fondamentale durante la fase acuta della risposta immunitaria e che diano inizio ai fenomeni immuno-

infiammatori. Infatti, quando essi vengono attivati dalla presenza di un agente estraneo, rilasciano diverse citochine, tra le quali le principali sono rappresentate dal *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) e dall'interleuchina-1 (IL-1). Questa fase è cruciale per la coordinazione e il mantenimento delle successive fasi della risposta immunitaria (Dinarello *et al.*, 1997; Suffredini *et al.*, 1999). IL-1 e TNF- α , infatti, possono anche attivare le fosfolipasi A₂ o C, le quali inducono il rilascio dei PUFA dai fosfolipidi di membrana e la conseguente formazione di eicosanoidi.

Gli eicosanoidi sono una famiglia di derivati ossigenati degli acidi arachidonico (AA), eicosapentanoico (EPA) e γ -linolenico e comprendono le prostaglandine, i trombossani ed i leucotrieni. Molto importanti risultano essere le prostaglandine, in particolar modo la PGE₂, i cui effetti sono ben documentati. *In vivo*, le prostaglandine sono coinvolte nella modulazione dell'intensità e della durata della risposta infiammatoria e immunitaria; la PGE₂ ha diversi effetti pro-infiammatori, quali la promozione di febbre ed eritema, l'aumento di permeabilità vascolare e di vasodilatazione e l'aumento di dolore e edema causati da altri agenti quali bradichinina e istamina. Inoltre la PGE₂ regola la produzione di citochine da parte di monociti, macrofagi e linfociti (Rola-Pleszczynski e Stankova, 1992).

Gli eicosanoidi vengono prodotti, nella maggior parte dei casi, a partire dall'acido arachidonico attraverso la via della ciclossigenasi (prostaglandine e trombossani) e attraverso quella della lipossigenasi (leucotrieni). La quantità ed il tipo di eicosanoidi sintetizzati dipende quindi da diversi fattori, quali la disponibilità di AA, l'attività delle

fosfolipasi, quella di ciclossigenasi e di lipossigenasi, il tipo di cellula coinvolta e la natura dello stimolo.

Cruciale risulta la disponibilità dell'AA che può variare a seconda della presenza, tra i fosfolipidi di membrana, di altri acidi grassi insaturi, potenzialmente in competizione (Dinarelli, 1999). La presenza di altri PUFA a sua volta dipende della loro introduzione con la dieta e del loro livello di incorporazione nelle membrane cellulari (Wahle e Rotondo, 1999).

In quest'ottica risulta interessante che diversi studi hanno dimostrato che i CLA riducono la produzione di eicosanoidi ed in particolar modo di PGE₂, sia *in vivo* che in colture cellulari (Ma *et al.*, 2002; Ogborn *et al.*, 2003; Nakanishi *et al.*, 2003). Non è ancora chiaro se l'effetto inibente dei CLA sulla produzione di prostaglandine sia dovuto interamente alla loro competizione con l'AA nella reazione della ciclossigenasi (COX). Infatti i CLA sembrano essere anche capaci di sopprimere l'espressione genica degli enzimi COX, il che fa ipotizzare un effetto di questi acidi grassi nella regolazione genica (Iwakiri *et al.*, 2002).

E' stato inoltre dimostrato che i CLA riducono il rilascio di citochine proinfiammatorie, in particolar modo di TNF- α negli animali (Akahoshi *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003; Akahoshi *et al.*, 2004). Nello studio di Akahoshi *et al.*, una miscela di isomeri di CLA induceva una riduzione del livello serico di TNF- α di circa il 50% rispetto alla somministrazione di acido linoleico. In accordo con questi risultati, Yang e Cook dimostrarono che alimentando animali con CLA, in particolare con l'isomero *cis*-9, *trans*-11, la produzione di TNF- α a seguito di un'iniezione

con LPS diminuiva a confronto con un gruppo di animali alimentati con olio di semi.

Anche *in vitro* l'isomero *cis-9, trans-11* si è dimostrato capace di ridurre la produzione di TNF- α in una linea cellulare RAW di macrofagi. Ciò indica che gli effetti della dieta osservati *in vivo* possono aver luogo direttamente a livello di macrofagi/monociti.

Possibili meccanismi di azione dei CLA sul sistema immunitario:

1) La PGE₂ è formata alla fine della sequenza infiammatoria ed è un potente prostanoide immuno-depressivo. Elevati livelli di PGE₂, infatti, limitano la progressione della cascata citochinica (Rotondo *et al.*, 1988; Davidson *et al.*, 2001), facendo sì che le reazioni immunitarie e infiammatorie non diventino dannose per l'organismo.

Esistono diverse testimonianze di questo meccanismo *in vivo*. Lipopolisaccaridi (LPS) somministrati *in vivo* portano ad un aumento dei livelli plasmatici di PGD che raggiungono i 450-500 pg/ml nel contro livelli di 30-40 pg/ml in animali non stimolati (Rotondo *et al.*, 1988; Davidson *et al.*, 2001). Inoltre, è stato osservato che in presenza di PGE₂ esocrine, vengono prodotti minori quantità di TNF- α e IL- β in risposta a stimolazione con LPS, mentre queste citochine aumentavano in presenza di inibitori della sintesi di PGE₂ dimostrando così che i prostanoidei endogeni sopprimono attivamente la produzione di citochine.

Quindi, affinché i CLA esercitino i loro effetti antinfiammatori attraverso i meccanismi descritti, dovrebbe verificarsi un aumento di PGE₂ o altri

prostanoidi inibitori. Tuttavia è stato dimostrato che i CLA riducono la produzione di prostaglandine, in particolare di PGE₂ (Ma *et al.*, 2002; Ogborn *et al.*, 2003; Torres-Duarte *et al.*, 2003; Whigham *et al.*, 2001). Sembra, quindi, inverosimile che l'azione dei CLA nel ridurre il rilascio di citochine sia mediata dall'aumento dei livelli di prostanoidi. Potrebbe essere più probabile invece che i CLA agiscano sull'espressione genica delle citochine infiammatorie, o direttamente attraverso elementi di risposta degli acidi grassi nelle regioni promotrici dei geni delle citochine o attraverso l'attivazione dei PPAR (Wahle *et al.*, 2003).

2) Un altro potenziale meccanismo per la soppressione della produzione di citochine da parte degli acidi grassi avverrebbe attraverso i PPARs (*peroxisome proliferator activated receptors*). Questi ultimi sono fattori di trascrizione, attivati da un gruppo di diverse sostanze che includono acidi grassi, eicosanoidi e farmaci. Poiché essi possono essere attivati dai tiazolidinedioni, un gruppo di farmaci antidiabetici, alcuni di questi (troglitazone e roglitazone) sono stati usati per chiarire i meccanismi di attivazione di PPARs. Si è visto che questi composti si legano direttamente ai PPARs (Lehmann *et al.*, 1995) e ciò ha portato alla ricerca di legandi fisiologici dei PPARs, specialmente dei PPARs- γ che si trovano principalmente nelle cellule adipose. E' generalmente riconosciuto che un ligando naturale per PPAR- γ è la 15-deossi- Δ 12,14-prostaglandina J₂ (12d-PGJ₂) che può derivare direttamente dalla prostaglandina D₂ (PGD₂). Quest'ultima è il maggiore prodotto del metabolismo dell'AA nei macrofagi e la PGD₂ sintasi, enzima richiesto per la sintesi di 15d-PGJ₂, è

espresso principalmente nei macrofagi e in altre cellule del sistema immunitario (Urade *et al.*, 1989). Quindi PPAR- γ potenzialmente possiede un ruolo importante nella regolazione della risposta infiammatoria, modulando l'attività dei macrofagi/monociti. Infatti, diversi studi hanno dimostrato che l'attivazione di PPAR- γ attenua l'attività dei macrofagi e l'infiammazione (Ricote *et al.*, 1998) e che sostanze agoniste del PPAR- γ , quali PGJ2 e 15d-PGJ2, inibiscono la produzione di citochine infiammatorie da parte dei monociti (Jiang *et al.*, 1998). Anche l'mRNA per le citochine infiammatorie veniva ridotto e ciò indica che il PPAR- γ inibisce la sintesi delle citochine a livello pretrascrizionale (a livello quindi di espressione genica). I PPARs agiscono come fattori di trascrizione e alcuni geni contengono PPAREs (elementi di risposta PPAR) nelle loro regioni promotrici (Fruchart *et al.*, 1999).

Per spiegare il meccanismo di azione dei CLA sul sistema immunitario, risulta interessante la capacità di ridurre la produzione di IL-1 β e TNF- α attraverso l'attivazione di PPAR- γ in linee cellulari RAW di macrofagi, riportata da Yu *et al.* (2002). Attualmente, tuttavia, non risulta ancora chiaro se gli effetti dei CLA su PPAR- γ sono diretti o mediati da alcuni prostanoidi metaboliti dei CLA.

3) Un altro importante fattore trascrizionale coinvolto nell'attivazione della cascata di segnali in seguito a stimolazione delle cellule e quindi nella formazione di citochine proinfiammatorie è il fattore nucleare kB (NF-kB) che è presente nel citoplasma cellulare come complesso inattivato associato ad uno specifico inibitore chiamato I κ B. Una serie di

endotossine batteriche può attivare la I κ B chinasi che fosforila I κ B a due residui serinici (Ser 32 e 36). Tali residui portano alla dissociazione di NF- κ B (Chen *et al.*, 1996; Traeckner *et al.*, 1995; Zandi *et al.*, 1997) e la sua migrazione nel nucleo dove si lega a specifici siti di regioni promotrici di geni codificanti per citochine, molecole di adesione, proteine *heat shock* e altre molecole indotte dallo stress (Baldwin *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2002). Si è visto che i CLA possono anche interferire con il passaggio iniziale di attivazione del NF- κ B, cioè la fosforilazione del componente I κ B del complesso inattivo nelle cellule cancerogene (Song *et al.*, 2004).

E' stato, inoltre, ipotizzato che le azioni di PPARs e NF- κ B all'interno delle cellule siano integrate e che PPARs possa inibire l'attivazione di NF- κ B legandosi direttamente alla molecola libera in una maniera simile all'I κ B, quindi prevenendone la traslocazione nel nucleo (Delerive *et al.*, 2001). Infatti complessi PPAR/NF- κ B sono stati ritrovati nel citoplasma di cellule attivate da PPAR (Delerive *et al.*, 2001). Inoltre l'attivazione di NF- κ B e il legame di NF- κ B libero alle regioni promotrici dei geni è attenuato dall'aumento dello stato riducente delle cellule e alcuni studi hanno dimostrato che i CLA, come anche altri PUFA n-3 a lunga catena, possono aumentare l'espressione degli enzimi riduttivi delle cellule (Crosby e Wahle, 1996; Sneddon *et al.*, 2003).

CLA nella prevenzione e nel trattamento del cancro

Dopo l'identificazione dei CLA come componenti anti-cancerogene della carne di manzo grigliata (Pariza, 1985), numerosi dati, ottenuti da studi effettuati su diversi tipi di cancro con modelli animali o mediante colture cellulari, hanno confermato il ruolo anticancerogeno di tali acidi grassi. Gli effetti interessano la crescita e la metastatizzazione dei tumori in animali con tumori chimicamente indotti o impiantati con tumori umani, la regolazione di specifici meccanismi di segnali cellulari e di espressione di oncogeni coinvolti nel ciclo cellulare e in quello di apoptosi di varie linee cellulari tumorali.

CLA e cancro mammario

Nel tentativo di comprendere la relazione fra ingestione di grasso e cancro mammario, sono state riportate due importanti metanalisi, una che si basa su studi di caso-controllo e l'altra su studi di coorte (Howe *et al.*, 1990; Hunter *et al.*, 1996). La prima riportava un aumento del rischio di cancro mammario correlato alla maggiore ingestione di grassi (Howe *et al.*, 1990). Al contrario, nessuna relazione fu riscontrata negli studi di coorte (Hunter *et al.*, 1996). Successivamente, invece, uno studio dettagliato, condotto su oltre 13000 donne, indicava che il rischio di cancro mammario era associato all'aumento dell'ingestione di grassi e soprattutto di grassi saturi (Bingham *et al.*, 2003). In tempi più recenti la convinzione che tutti i tipi di grassi contenuti nella dieta siano associati

ad un aumento del rischio e dell'incidenza di cancro mammario è stata messa in discussione, soprattutto alla luce di studi su modelli animali in cui i tumori erano stati indotti chimicamente o su cui cellule di tumori mammari umani erano state impiantate.

Karmali *et al.* (1984) dimostrarono che il consumo di oli di pesce, e quindi una più elevata ingestione di PUFA n-3, consente di ridurre significativamente la carcinogenesi in modelli animali. Studi simili condotti su animali impiantati con cellule di cancro mammario e alimentati con CLA hanno suggerito la possibilità che questo tipo di acidi grassi siano anticancerogeni. In contrasto esistono anche pubblicazioni che indicano che i CLA non hanno alcun effetto nell'inibizione della crescita del tumore mammario negli animali. Nonostante queste ultime rappresentino una minoranza, esse hanno generato dubbi circa gli effetti anticancerogeni dei CLA (Wong *et al.*, 1997).

Dal momento che le principali fonti di CLA sono rappresentate da latte, prodotti caseari e carne, risultano interessanti quegli studi nei quali sono state analizzate singolarmente tali componenti della dieta in relazione al rischio di cancro mammario. La letteratura in merito riporta ancora risultati contrastanti: infatti, a seguito di un aumento di ingestione di tali prodotti, alcuni autori non osservarono alcun effetto (Chajes *et al.*, 2002; Voorrips *et al.*, 2002), altri registrarono un aumento del rischio di cancro mammario (Knekt e Jarvinnen, 1999; Aro *et al.*, 2000) e altri ancora una diminuzione del rischio (Talamini *et al.*, 1984; Landa *et al.*, 1994). Le ragioni di tali discordanze non sono chiare, ma potrebbero includere il disegno sperimentale, la fonte di prodotti lattiero-caseari o la sensibilità

analitica. Inoltre il latte contiene anche altre sostanze con attività anticancerogena quali la sfingomieline e l'acido butirrico (potenti agenti apoptotici), i quali possono variare in concentrazione e conseguentemente rendere ancora più difficile l'interpretazione dei risultati.

Sulla base dei precedenti e di altri studi (Ledoux *et al.*, 2003, Landa *et al.*, 1994; Talamini *et al.*, 1984; Voorrips *et al.*, 2002), il World Cancer Research Foundation ha concluso che al momento i dati sono insufficienti per stabilire una positiva o negativa relazione fra il rischio di cancro mammario e l'ingestione di latte, prodotti lattiero-caseari e carne (<http://www.airc/report2htm>).

Inoltre, determinare i dati di ingestione alimentare e successivamente estrapolare l'ingestione di CLA è estremamente difficile a causa della mancanza di dati circa il contenuto di CLA di tutti gli alimenti e anche a causa dell'elevata variabilità (Ledoux *et al.*, 2003).

Sono stati effettuati due studi sul contenuto di CLA del tessuto adiposo in relazione al rischio di cancro alla mammella e di sviluppo di metastasi. Nel primo (Chajes *et al.*, 2002) non è stata riscontrata nessuna associazione fra il rischio di cancro e i livelli di CLA nel tessuto adiposo, ma gli autori misero in luce alcuni limiti del loro studio, quali il ristretto range dei livelli di CLA studiati. Successivamente gli stessi autori (Chajes *et al.*, 2003) hanno determinato i livelli di CLA nel tessuto adiposo al momento della diagnosi di cancro mammario e dopo il successivo sviluppo di metastasi in 209 pazienti. Anche in questo caso, non è stata trovata alcuna relazione fra il contenuto di CLA nel tessuto adiposo e vari indicatori prognostici.

Nel complesso, tali studi epidemiologico/clinici non hanno stabilito un definitivo legame fra ingestione di CLA attraverso prodotti di origine animale, presenza di CLA nel tessuto adiposo mammario e il rischio di incidenza del cancro. Non è da escludere che un consumo di CLA in concentrazioni più elevate rispetto a quelle ottenibili dai normali prodotti lattiero-caseari o carnei possa avere effetti benefici. Ciò è molto importante considerando che sono stati osservati effetti benefici contro il cancro mammario con concentrazioni relativamente più alte di questi acidi grassi usate in modelli animali e in studi in vitro con linee cellulari del cancro.

E' quindi molto difficile arrivare ad una conclusione univoca circa la relazione fra ingestione di CLA, contenuto di CLA nel tessuto adiposo e rischio di cancro mammario. Per chiarire definitivamente tale relazione sono necessari ulteriori ricerche da effettuarsi utilizzando supplementi di CLA (ben definiti nel tipo di isomero e nelle relative concentrazioni) a differenti livelli di ingestioni, per periodi di tempo più lunghi e a differenti stadi fisiologici e patologici.

CLA e cancro della prostata

Non vi sono studi epidemiologici che mettano in relazione l'ingestione di CLA e il rischio o l'incidenza di cancro alla prostata negli esseri umani. Può, comunque, essere ipotizzato che l'elevata incidenza, in continua crescita, di tale cancro nelle società industrializzate sia probabilmente

dovuto a fattori ambientali, tra i quali non poca importanza avrebbe l'alimentazione.

Invece, studi condotti su modelli animali di cancro alla prostata hanno mostrato chiari effetti anticancerogeni dei CLA simili a quelli osservati con modelli di cancro mammario quando impiantati in topi SCID (*severe combined immuno-deficiency*). Gli effetti erano opposti a quelli osservati con la somministrazione di acido linoleico che, infatti, ha mostrato effetti pro-cancerogeni. Il volume medio del tumore nei topi SCID risultava ridotto di circa il 70 e 75% rispetto ai soggetti controllo e a quelli alimentati con acido linoleico, rispettivamente (Cesano *et al.*, 1998).

La 2-Amino-1-metil-6-fenilimidazol [4,5-b]piridina (PhIP) è un potente agente mutageno e cancerogeno derivante dalla carne cotta ad alte temperature, che provoca tumori prostatici e mammari quando somministrato a topi maschi e femmine rispettivamente (Yang *et al.*, 2003). La somministrazione di 100 ppm di PhIP per 47 giorni aumentava di 5 volte la frequenza di mutazione nella prostata di topi transgenici Big Blue. L'aggiunta di una miscela di CLA all'1% alla dieta dei topi per una settimana prima della stimolazione con PhIP determinava una diminuzione della mutagenesi del 38% (Cohen *et al.*, 2003). Questi risultati portarono gli autori ad ipotizzare che i CLA potessero essere utilizzati nella prevenzione del cancro alla prostata. Tuttavia, ricerche effettuate su modelli animali stabilizzati impiantati con cellule tumorali della prostata, hanno mostrato un significativo aumento del volume del tumore in seguito alla somministrazione di CLA rispetto al controllo e

nessuna inibizione della crescita e dello sviluppo del tumore (Cohen *et al.*, 2003). Tali risultati contrastano con la maggioranza delle osservazioni pubblicate che indicano effetti anti-cancerogeni dei CLA in animali e cellule e potrebbero essere dovuti all'utilizzo di topi transgenici. Questi risultati, tuttavia, rendono difficile la formulazione di un giudizio conclusivo riguardo gli effetti dei CLA sul cancro 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 *trans-10, cis-12* attenua principalmente la produzione di eicosanoidi e l'espressione degli enzimi LOX-5 e COX-2 mentre il *cis-9, trans-11* influenza l'espressione degli oncogeni p53, p21WAF1/CIP1 e bcl-2 promuovendo l'apoptosi.

L'inibizione della proliferazione e l'induzione dell'apoptosi nelle cellule di cancro alla prostata (LNCaP) da parte dei CLA sono anche state collegate agli effetti regolatori positivi o negativi sulle isoforme della proteina chinasi C (PKC); in particolare regolazione positiva delle PKC α e δ e negativa della PKC ι (Song *et al.*, 2004).

Attualmente diversi studi indicano che sia il *cis-9, trans-11* che il *trans-10, cis-12* CLA presentano effetti benefici sull'attenuazione della proliferazione e progressione del cancro alla prostata, tuttavia sembra che essi agiscano secondo meccanismi cellulari completamente diversi (metabolismo lipidico o espressione oncogenica). Considerando che questo tipo di cancro è sempre più diffuso nella popolazione e che esistono pochissime terapie per combatterlo, è molto avvertita l'esigenza di approfondire le conoscenze sul ruolo dei CLA nell'attenuazione del cancro alla prostata e identificare i relativi meccanismi cellulari. In particolare vivo interesse desta l'effettuazione di studi clinici con impiego di CLA da soli o in aggiunta a terapie classiche, che attualmente includono tassani e tamoxifene, dal momento che i CLA sembrano avere minimi effetti collaterali e non sembrano esporre l'uomo a rischi significativi, a parte per la formazione ossidativa di isoprostani che, però, potrebbe essere efficace nella prevenzione e nell'apoptosi del cancro.

CLA e cancro gastro-intestinale

Non esistono in bibliografia molti studi che mettono in relazione l'ingestione di CLA con il rischio di cancro del colon-retto negli esseri umani. Tuttavia, è stato pubblicato una ricerca piuttosto recente che mette in luce l'effetto positivo dell'assunzione di prodotti lattiero-caseari sulla riduzione del rischio di cancro gastro-intestinale. Anche in questo caso si deve sottolineare l'impossibilità di attribuire interamente tali effetti al contenuto di CLA dei prodotti (Larsson *et al.*, 2005).

Effetti benefici dei CLA sul cancro gastro-intestinale sono stati osservati principalmente in tumori chimicamente indotti su modelli animali. Uno studio ha dimostrato che il CLA inibiva la neoplasia indotta con benzo(a)pirene nella parte anteriore dello stomaco (Ha *et al.*, 1990). Il CLA, inoltre, proteggeva dallo sviluppo di tumore al colon indotto con metilimidazo[4,5-f]quinolina in topi (Liew *et al.*, 1995). Aggiunto nella dieta all'1%, esso riduceva l'incidenza di tumore al colon in ratti trattati con 1,2-dimetilidrazina (DMH) (Park *et al.*, 2001). Ciò era il risultato di un aumento del 251% nell'indice apoptotico. Il ruolo degli eicosanoidi era evidente dato che il CLA riduceva anche i livelli di prostaglandine E₂, trombossani B₂ e il loro precursore acido arachidonico nella mucosa. Come nel caso del cancro mammario indotto con PhIP, tale composto chimico induceva un aumento di 8-26 volte della frequenza di mutazione nel colon distale di ratti transgenici Big Blue mentre non aveva alcun effetto sul colon prossimale e sul cieco (Yang *et al.*, 2003). Le frequenze di mutazione venivano significativamente ridotte (14-24%) in seguito alla supplementazione della dieta con CLA.

Anche in questo caso, sono state riportate osservazioni contraddittorie circa gli effetti dei CLA. Infatti, in un interessante confronto con gli acidi grassi di olio di pesce su un modello murino di cancro al colon, il CLA, a differenza degli LCPUFA n-3 del pesce, non riduceva l'entità del tumore (Petrik *et al.*, 2000).

In una ricerca volta a valutare l'effetto della somministrazione di diete individuali contenenti uno dei due principali isomeri di CLA all'1% a modelli di cancro intestinale (topi), sorprendentemente l'isomero *trans*-10,

cis-12 sembrava promuovere anziché inibire la carcinogenesi nel colon (Rajakangas *et al.*, 2003). Questi autori misero anche in evidenza gli effetti dannosi del CLA *trans*-10, *cis*-12, che, a causa di un'aumentata perossidazione dei lipidi, provocava una maggiore escrezione di isoprostani con le urine.

In contrasto con le osservazioni appena riportate, uno studio sugli effetti dei CLA sulla carcinogenesi del colon di ratti Sprague Dawley ha riscontrato una diminuzione della produzione di PGE₂ e TXB₂ e un aumento dell'indice apoptotico, che suggerirebbero l'esistenza di sistemi di segnali cellulari a livello della mucosa del colon, quali mediatori degli effetti benefici dei CLA sulla carcinogenesi nel colon (Kim *et al.*, 2003). Questi risultati sono stati supportati da un recente studio su ratti dove i CLA somministrati in ragione dell'1% della dieta hanno indotto una riduzione dello sviluppo tumorale nel colon e delle metastasi peritoneali, collegata alla riduzione dei livelli di PGE₂ e all'aumento del rapporto Bax:Bcl-1 (pro-apoptotico:anti-apoptotico) (Park *et al.*, 2004).

In vitro, in cellule cancerogene prostatiche e mammarie, sono stati riportati effetti simili dei CLA sull'espressione degli oncogeni Bax:Bcl-2 e p53, p21WAF1/CIP1 a quelli riportati nei tessuti dei topi (Wahle *et al.*, 2004, Bhattacharya *et al.*, 2006, Ochoa *et al.*, 2004, Majumder *et al.*, 2004).

Gli isomeri di CLA esercitavano significativi effetti anti-proliferativi su cellule di cancro colon-rettale umano, attraverso l'inibizione della sintesi di DNA e l'induzione dell'apoptosi (Cho *et al.*, 2003).

Successivi studi suggerirono che gli effetti benefici associati ai CLA potevano essere collegati alla loro capacità di inibire l'espressione del fattore di crescita insulino-simile (IGF) II e di attenuare la via della chinasi 1/2 e il segnale dei recettori IGF (Kim *et al.*, 2003). In cellule Caco2, gli stessi autori dimostravano che gli effetti sulla regolazione di IGFII erano isomero-specifici e che solo l'isomero *trans*-10, *cis*-12 risultava efficace (Kim *et al.*, 2002). Analogamente, è stato dimostrato da Cho *et al.* (2005), che era solo l'isomero *trans*-10, *cis*-12 a diminuire l'espressione ErbB3 in cellule di cancro al colon. È stato suggerito che tali effetti inibitori dei CLA fossero mediati dai loro effetti su IGFII e dall'inibizione della proteina p21CIP1/WAF1 regolatrice del ciclo cellulare (Cho *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2005).

Infine, un recente studio ha dimostrato che il *trans*-10, *cis*-12 e non il *cis*-9, *trans*-11 né l'acido linoleico inibisce la proliferazione cellulare e induce apoptosi attraverso l'aumento dell'espressione di altri geni pro-apoptotici, geni-1 (NAG-1) in cellule di cancro colon-rettale (Lee *et al.*, 2006).

CLA e altri tipi di cancro (fegato, pancreas)

Non sono ancora stati effettuati studi epidemiologici su esseri umani circa gli effetti dei CLA sul rischio di cancro epatico, pancreatico

In un modello animale di cancro epatico, i CLA allo 0.5% e al 2.0% (p/p) della dieta stimolavano la crescita di cellule di un epatoma trapiantato in ratti (Yamasaki *et al.*, 2002). Sorprendentemente, ciò avveniva nonostante

una riduzione di PGE₂ e COX-2, effetto che è di solito associato ad una diminuzione della carcinogenesi. Allo stesso modo, i CLA non miglioravano il peso corporeo (inibizione della cachessia) o lo stato nutrizionale di ratti impiantati con epatoma (McCarthy-Beckett, 2002). Tali effetti negativi dei CLA *in vivo* non sono stati ancora chiariti e senza dubbio destano preoccupazione per il possibile uso di questi composti nella terapia del cancro e necessitano, quindi, di ulteriori approfondimenti.

I CLA, invece, mostravano un effetto fortemente citotossico per cellule di epatoma di ratto alla concentrazione di 1 µM quando confrontate con cellule controllo e l'isomero attivo è risultato essere il *trans*-10, *cis*-12 e non il *cis*-9, *trans*-11 (Yamasaki *et al.*, 2002). Tale isomero provocava anche un aumento della popolazione sub-G₁ di cellule, di caspasi-3 e -9 attivate (indicatori di inibizione del ciclo cellulare e di apoptosi rispettivamente) e della divisione tempo-dipendente della poli (-ADP-ribosio) polimerasi. Questi effetti citotossici dei CLA sono risultati più deboli in epatociti normali, ad indicare una maggiore sensibilità delle cellule cancerogene ai CLA.

Igarishi e Miyazawa (2001) osservarono che i CLA inibivano anche la crescita di linee cellulari di epatoma umano (HepG2) *in vitro* e che tali effetti non erano dovuti all'aumento della perossidazione lipidica a livello cellulare, ma probabilmente ad alterato metabolismo degli acidi grassi. Il *trans*-10, *cis*-12 CLA risultava essere anche responsabile della maggiore produzione di prostaglandine in cellule HepG2 alla concentrazione di 100µM, mentre il *cis*-9, *trans*-11 non esercitava alcun effetto. Tale risultato

è in accordo con le osservazioni effettuate *in vivo* su ratti impiantati con epatoma (Yamasaki *et al.*, 2002; McCarthy-Beckett, 2002). Tuttavia questi effetti negativi contrastano con un vasto numero di studi che dimostrano chiaramente che i CLA inibiscono la produzione di eicosanoidi in cellule sia cancerogene che normali.

Infatti, un aumento della formazione di eicosanoidi è generalmente considerata una caratteristica di malignità e la sua riduzione rappresenta l'effetto anticancerogeno principale dei CLA (Fisher, 1995).

Meccanismi cellulari degli effetti anti-cancerogeni dei CLA

La regressione di un tumore stabilizzato può avvenire a causa di:

- una minore proliferazione cellulare;
- un aumento della morte programmata della cellula (apoptosi);
- una necrosi del tumore dovuta a privazione di nutrienti e ossigeno (inibizione dell'angiogenesi).

I CLA, sia l'isomero *cis-9, trans-11* che la miscela dei due isomeri, sono in grado di indurre un aumento dell'apoptosi in colture di cellule di tumore mammario e di ridurre la proliferazione cellulare (Ip *et al.*, 1999; Ip *et al.*, 2000). E' stato, inoltre, osservato che la somministrazione di CLA a femmine di ratti fino al raggiungimento della pubertà, riduce la suscettibilità del tessuto mammario allo sviluppo di tumore indotto, ciò indicherebbe un possibile effetto benefico e protettivo dei CLA sullo sviluppo del tessuto mammario (Ip *et al.*, 1995).

Altri autori hanno esaminato gli effetti dei CLA sull'apoptosi del cancro al colon in modelli sperimentali. In colture di cellule di cancro al colon (SW480) il trattamento con CLA provocava apoptosi (Miller *et al.*, 2002). Una supplementazione nella dieta destinata a ratti con miscela di CLA all'1% risultava in una significativa diminuzione dell'entità di cancro al colon indotto.

Il meccanismo di questi effetti anti-cancerogeni non è ancora stato chiarito. Tuttavia, studi preliminari hanno rivelato alcuni importanti meccanismi cellulari che potrebbero essere alla base dell'attività anti-cancerogena dei CLA, con particolare riferimento alla loro efficacia nel ridurre la proliferazione cellulare e nell'aumentare l'apoptosi.

Come già precedentemente menzionato, uno studio ha messo in evidenza, in una linea cellulare di cancro alla prostata (LNCaP), che i CLA, oltre a ridurre la proliferazione e ad aumentare l'apoptosi, modificavano anche le attività delle isoforme PKC nelle cellule. Si notava, infatti, un aumento dei livelli di PKC- δ , PKC- α , PKC- ξ e una diminuzione di quelli di PKC- ι (Song *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2001). Tuttavia altri autori non hanno trovato alcun effetto sulle isoforme PKC (Masso-Welch *et al.*, 2001). Tali differenze potrebbero essere dovute a differenze nella tipologia di tumore, nelle specie studiate e nell'abilità delle varie tecniche usate di identificare le isoforme (Wahle e Heys, 2002). Lo studio degli effetti dei CLA sui meccanismi pro- e anti-apoptotici e i loro geni controllori ha anche rivelato alcuni interessanti elementi chiave. L'espressione di bcl-2, un proto-oncogene anti-apoptotico, diminuiva nei tumori mammari e in cellule tumorali in ratti quando alimentati o trattate

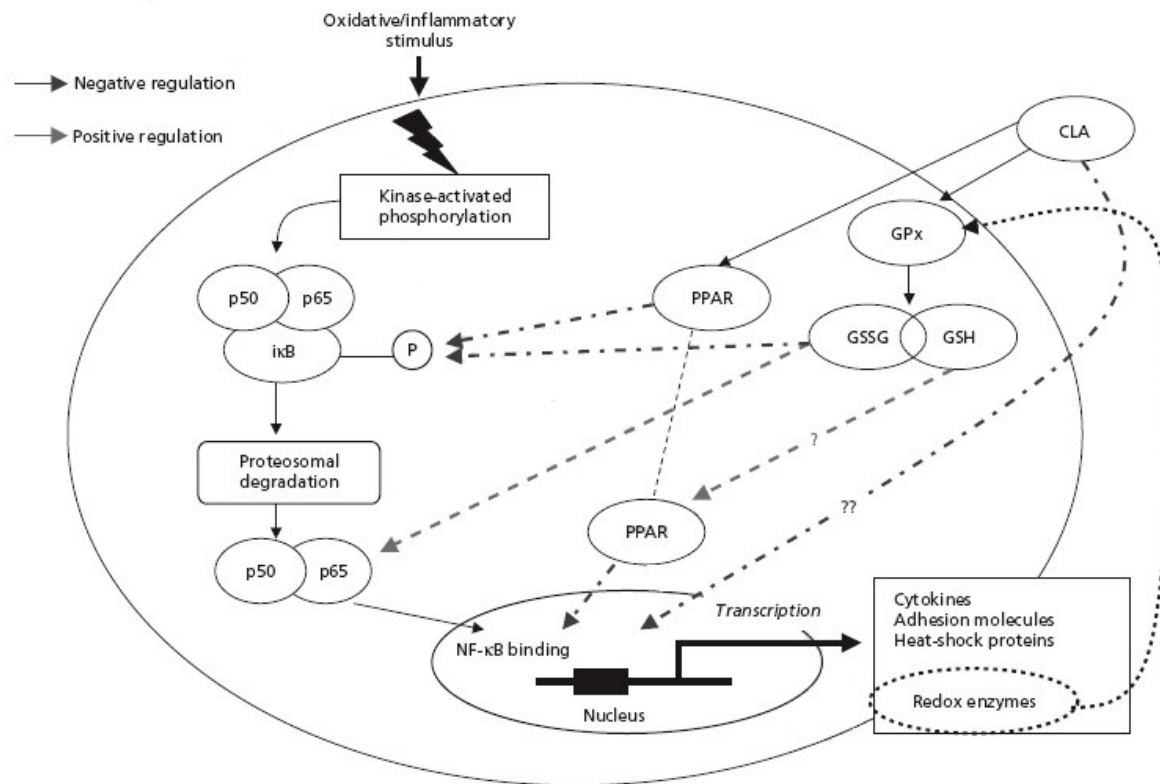
rispettivamente con CLA; altri oncogeni coinvolti nell'apoptosi quali bax o bak (Ip *et al.*, 1999; Ip *et al.*, 2000; Banni *et al.*, 2003) o non erano influenzati o non determinati. Fu osservato che i CLA promuovevano un effetto oncostatico, inibitore sul ciclo cellulare di cellule estrogeno-recettive positive di cancro mammario MCF-7 mentre l'acido linoleico aveva un effetto opposto (Durgam e Fernandes, 1997). Al contrario, cellule ER-negative MDA-MB-231 non mostravano alcuna risposta al CLA, il che indica un possibile coinvolgimento dei recettori dell'estrogeno negli effetti dei CLA.

Due studi (Ochoa *et al.*, 2004; Majumder *et al.*, 2002) hanno effettuato una dettagliata valutazione degli effetti di una miscela di CLA e degli isomeri individuali sull'espressione di oncogeni pro- e anti-apoptotici in cellule umane di cancro mammario e cancro alla prostata. Allo scopo sono state usate cellule ER-positive MCF-7 e ER-negative MDA-MB-231 di cancro mammario e cellule androgeno-sensitive LNCaP di cancro alla prostata. E' stata determinata l'espressione dei maggiori oncogeni (p53, p21 WAF1/CIP1, bcl-2, bax, bcl-Xs) a livello trascrizionale (mRNA) e translazionale (proteine) usando Northern e Western blotting e specifiche ELISA. Il trattamento con CLA inibiva la proliferazione e induceva apoptosi e ciò era accompagnato da un aumento di circa 2-5 volte dell'espressione (mRNA e proteine) dei geni pro-apoptotici p53 e p21 WAF1/CIP1 e da una riduzione dell'espressione dell'anti-apoptotico bcl-2 di circa il 20-30% nelle cellule MCF-7. Le cellule MCF-10a che sono considerate cellule normali o benigne non venivano influenzate. In cellule ER-negative MDA-MB-231 che esprimono la forma mutante di p53, che

previene l'apoptosi, l'mRNA p53 non era influenzato dai CLA mentre gli mRNA p21WAF1/CIP1 e bcl-2 (anti-apoptotico) aumentavano. Effetti simili di miscele di CLA e degli isomeri individuali sull'espressione (mRNA e proteine) dei geni p53, p21WAF1/CIP1 e bcl-2 furono osservati su cellule di cancro alla prostata (Ochoa *et al.*, 2004). In tale studio l'isomero *cis*-9, *trans*-11 risultava il più efficace nel modulare l'espressione dell'oncogene, mentre l'isomero *trans*-10, *cis*-12 inibiva la produzione di eicosanoidi e l'espressione del gene COX. Tali osservazioni dimostrano chiaramente che i due principali isomeri dei CLA inibiscono la crescita e lo sviluppo del tumore attraverso diversi meccanismi cellulari nelle cellule di cancro alla prostata. L'inibizione di COX e la concomitante diminuzione nella produzione di eicosanoidi da parte dei CLA in vari tessuti/cellule è stata valutata da Belury *et al.* (Belury e Vanden Heuvel, 1997; Belury, 2002; Belury *et al.*, 2002). Gli effetti potrebbero essere dovuti al dislocamento dell'acido arachidonico, precursore delle prostaglandine della serie-2 e dei leucotrieni della serie-4, o all'attenuazione dell'espressione enzimatica (COX-2 e LOX-5,-12 e -15).

E' già stato brevemente affrontato il ruolo dei fattori nucleari di trascrizione NF-kB e PPARs nei potenziali effetti benefici dei CLA sulle funzioni cellulari, in particolare nell'attenuazione delle cascate di segnali indotte dallo stress. L'attivazione di NF-kB può essere inibita dai CLA attraverso la riduzione dei livelli di fosforilazione dell'IkB in residui serinici e la riduzione del legame alle regioni kB nei rispettivi geni promotori (Fig. 2).

Fig. 2. Alcuni meccanismi cellulari attraverso i quali i CLA influenzano l'espressione dei geni. Gli stimoli stressori inducono una cascata di segnali che attivano il complesso NF- κ B/I κ B presente in forma inattivata nel citoplasma, provocando il rilascio di NF- κ B, il suo passaggio nel nucleo ed il suo legame con specifici elementi di risposta nelle regioni promotrici di vari geni. Questi includono geni per molecole di adesione, citochine, enzimi redox, proteine heat shock, ciclossigenasi, ecc. (Whale *et al.*, 2007)



Era stato postulato che i CLA (e gli n-3) potevano indurre gli enzimi redox intrinseci nelle cellule (GPx1 e GPx4) e che questo poteva essere il meccanismo attraverso il quale essi influenzano la trascrizione (Sporn *et al.*, 2001; Masso-Welch *et al.*, 2002). E' plausibile anche che i CLA influenzino gli elementi specifici di risposta nei geni o direttamente o attraverso l'azione degli eicosanoidi derivati. I CLA, inoltre, attivano i recettori nucleari ormonali PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*) e in modo specifico il PPAR γ , in vari tessuti e tipi di cellule (Belury e Vanden Heuvel, 1997; Belury, 2002; Belury *et al.*, 2002). Recenti studi hanno suggerito che gli attivatori di PPAR γ potrebbero essere protettivi contro il cancro della mammella, del colon e della prostata (Sporn *et al.*, 2001). Un aumento dell'attivazione di PPARs può risultare in una diminuzione dell'attività del NF-kB stress-indotto, probabilmente attraverso l'interazione diretta dei due fattori di trascrizione, dove il PPAR e l'IkB hanno azioni simili. E' quindi plausibile che l'attivazione del PPAR γ sia un importante meccanismo che può spiegare gli effetti anti-cancerogeni dei CLA. Quest'ipotesi però richiede approfondimenti.

Inibizione dell'angiogenesi

Lo sviluppo di nuovi vasi sanguigni (neovascolarizzazione o angiogenesi) è di importanza fondamentale per lo sviluppo e il mantenimento di tutti i tipi di tumori, come anche in quello delle placche aterosclerotiche, in quanto garantisce un adeguato apporto di ossigeno, di fattori di crescita e di nutrienti. L'inibizione dell'angiogenesi quindi sarebbe un obiettivo

terapeutico eccellente contro la crescita tumorale e la progressione delle placche. Masso-Welch *et al.* (2002) furono i primi a dimostrare che la somministrazione di CLA all'1 o 2% a topi per 6 settimane riduceva l'angiogenesi in tumore mammari impiantati. I topi alimentati con CLA mostravano più basse concentrazioni di fattori di crescita endotelio-vascolari (VEGF), fattori essenziali per la crescita di nuovi vasi sanguigni. Lo stesso gruppo di ricerca in uno studio successivo (Masso-Welch *et al.*, 2004) osservò *in vivo* che entrambi gli isomeri dei CLA, quando somministrati allo 0.5% o all'1% della dieta, provocavano una diminuzione della concentrazione di VEGF e inibivano l'angiogenesi in topi. Sorprendentemente, i livelli di leptina, che è un altro fattore pro-angiogenico oltre ad essere importante nella regolazione energetica e nell'obesità, venivano ridotti solo dall'isomero *trans*-10, *cis*-12. Gli stessi autori, inoltre, osservarono inibizione dell'angiogenesi *in vitro* da parte di entrambe gli isomeri e attribuirono tali effetti all'attenuazione dell'espressione di VEGF e alla riduzione dell'espressione del suo recettore Flk-1. E' stato dimostrato, inoltre, che i CLA inibiscono l'angiogenesi indotta da bFGF (*basic fibroblast growth factor*) sia *in vivo* che in cellule endoteliali e la sintesi di DNA indotta dal fattore di crescita *in vitro* (Moon *et al.*, 2003). E' anche plausibile che gli effetti dei CLA sulla regressione delle placche aterosclerotiche riportate da Kritchevsky *et al.* (2004) e da Toomey *et al.* (2006) siano il risultato, almeno in parte, di una riduzione dell'angiogenesi, ma questa ipotesi necessita di ulteriori approfondimenti (Wahle *et al.*, 2007).

L'aumento dell'angiogenesi rappresenta un problema anche nelle retinopatie diabetiche dove può risultare in un danneggiamento della funzione retinica (Oetken, 2001). Il meccanismo cellulare attraverso il quale i CLA possono ridurre l'angiogenesi necessita di ulteriori delucidazioni al fine di definire possibili applicazioni cliniche a scopo preventivo nel cancro, nelle retinopatie diabetiche e nell'aterosclerosi.

Attenuazione delle metastasi

Nel processo neoplastico si possono distinguere tre stadi principali: iniziazione, progressione/crescita del tumore e metastatizzazione. L'ultima fase è quella più difficile da controllare clinicamente ed è la più grave in quanto responsabile della diffusione del cancro in numerosi tessuti e organi.

Hubbard *et al.* (2000) in topi alimentati con diete contenenti una miscela di CLA o singoli isomeri alle concentrazioni di 0.5 e 1%, riscontrarono un significativo effetto inibitore sullo sviluppo di metastasi del tumore polmonare, con significativo aumento del tempo di latenza rispetto ai soggetti del gruppo controllo. Tali effetti risultarono essere dose-dipendenti.

Considerando che la prima fase della metastatizzazione è rappresentata dall'adesione di cellule tumorali circolanti all'epitelio dei capillari dei tessuti (fase che precede lo stravasamento e l'invasione del tessuto) e che è stato dimostrato che i CLA possono ridurre l'espressione genica di molecole di adesione, è ipotizzabile che la riduzione delle metastasi in animali con

tumore alimentati con CLA sia dovuta proprio a tale effetto (Wahle *et al.*, 2007).

Riduzione della cachessia

La prevenzione della cachessia in pazienti con cancro o anoressici migliorerebbe la loro qualità di vita e permetterebbe una maggiore durata, e quindi efficacia, delle terapie. E' stato osservato che gli n-3 attenuano la cachessia in modelli animali di cancro (Wigmore *et al.*, 2000), e nel cancro del pancreas (Barber *et al.*, 2001) e della prostata (Heys *et al.*, dati non pubblicati) nell'uomo. Tali effetti sono principalmente dovuti all'attenuazione della produzione della citochina infiammatoria TNF- α e di uno specifico fattore cachettico. I CLA riducono anche la produzione di TNF- α a livello di espressione genica. Uno studio recente ha riportato una simile diminuzione della cachessia, della produzione di TNF- α da parte dei macrofagi e un'attenuazione nella produzione di citochine infiammatorie da parte di splenociti in un modello animale di cachessia trattato con CLA (Yang e Cook, 2003).

Anche IL-6 è considerata importante nell'induzione della cachessia, dato che riduce l'attività della lipoprotein-lipasi nel topo e in linee cellulari di adipociti (Greenberg *et al.*, 1992). Insieme a IL-1 e TNF- α , essa induce perdita di peso soprattutto modificando la produzione di eicosanoidi (Cook *et al.*, 2003). Gli effetti anti-cachettici dei CLA nei modelli animali (Cook *et al.*, 2003) suggeriscono che essi inibiscono anche la produzione di IL-6, ma ancora non esiste una chiara evidenza di tale meccanismo. Al

contrario, in un altro studio, la produzione di IL-6 da parte di adipociti di ratti non veniva influenzata da una miscela di CLA, che invece provocava una diminuzione della produzione di leptina e sorprendentemente un aumento di TNF- α (Ha *et al.*, 2003). Tale risultato contrasta con altri studi in cui i CLA riducevano la produzione di citochine infiammatorie *in vivo* in animali e in uomini (Tricon *et al.*, 2004; Tricon *et al.*, 2005). Non è ancora chiaro perché ci siano tali discordanze ma ciò evidenzia la complessità e la diversità delle risposte ai CLA *in vivo* e *in vitro*.

Effetti dei CLA sulla composizione corporea e sul metabolismo energetico

Uno dei più interessanti effetti dei CLA sulla salute umana e animale è quello relativo alla regolazione del metabolismo energetico e alla riduzione dell'adiposità. Questi effetti sono stati studiati in diverse specie animali e negli esseri umani.

Composizione corporea negli animali

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). Un'ingestione di CLA nelle concentrazioni di 0.5-2.0 g/100g di dieta riducono il contenuto corporeo di grasso e in certi casi aumenta la massa magra in animali in fase di accrescimento, quali topi, ratti e maiali (Wahle *et al.*, 2004; Tricon *et*

al., 2005; Bhattacharya *et al.*, 2006; Keim 2003). I meccanismi proposti per spiegare tali effetti dei CLA includono: aumento della lipolisi, aumento dell'ossidazione degli acidi grassi o riduzione dell'assorbimento di acidi grassi da parte degli adipociti con conseguente diminuzione del loro volume, riduzione dell'apporto energetico o inibizione degli enzimi lipogenici.

Gli effetti anabolici sembrano precedere la riduzione di grasso corporeo (Wahle *et al.*, 2004; Tricon *et al.*, 2005; Bhattacharya *et al.*, 2006; Keim, 2003; Wang e Jones, 2004). Diete arricchite con CLA riducono la taglia degli adipociti anzichè il loro numero nei ratti (Azain *et al.*, 2000). Questi risultati sono in contrasto con quelli riscontrati in topi dove i CLA inducevano apoptosi degli adipociti (Tsuboyama-Kasaoka *et al.*, 2000).

L'efficacia dei CLA nel modificare la composizione corporea dipende dalla specie e anche dalla razza degli animali da laboratorio. I topi sono quelli che rispondono in maniera più intensa a livelli di CLA dello 0.5% della dieta, che provocano una diminuzione del 40-80% del grasso corporeo (Keim, 2003). In alcuni studi è stato osservato anche un aumento della massa magra e dell'accrescimento proteico, non sempre accompagnato da variazioni del peso corporeo (Keim, 2003). I ratti rispondono ai CLA in maniera simile ai topi, ma accumulano meno grasso corporeo in fase di crescita e quindi l'entità della riduzione dell'accumulo di grasso è minore rispetto a quella osservata nei topi ed è dipendente dalla razza e dallo specifico sito anatomico del tessuto adiposo (Keim, 2003; Azain *et al.*, 2000).

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. 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).

Composizione corporea nell'uomo

Nonostante i CLA siano risultati molto efficaci nell'indurre diminuzione del grasso corporeo negli animali, scarsa appare la letteratura in campo umano. Tale azione dei CLA è particolarmente interessante se si considera la crescente incidenza dell'obesità e dei disturbi metabolici ad essa associati nelle popolazioni occidentali. Tuttavia, i risultati circa gli effetti dei CLA sulla composizione corporea umana sono piuttosto contraddittori; in alcune ricerche, infatti, non è stata segnalata riduzione significativa del grasso corporeo.

In confronto agli studi effettuati su animali da laboratorio, è da tener conto che il periodo di supplementazione, in proporzione alla durata della vita, è molto più lungo nei roditori rispetto ai volontari umani. Infatti studi recenti dove la supplementazione con CLA era di maggiore durata (da 12 a 24 mesi) mostravano una forte riduzione della massa grassa corporea in volontari sani soprappeso (Gaulhier *et al.*, 2004; Gaulhier *et al.*, 2005).

Anche la dose di CLA usata per gli uomini (g/kg di peso corporeo) è molto più bassa rispetto a quella testata negli animali. Inoltre risultati ottenuti con animali adulti maturi hanno suggerito che l'età gioca un ruolo molto importante nella suscettibilità agli effetti dei CLA nella riduzione del grasso corporeo. La maggior parte degli studi sull'uomo, al contrario di quelli animali, ricorre a volontari in età matura, non in fase di accrescimento.

E' importante inoltre notare che la composizione corporea dell'uomo, a differenza di quanto succede con l'animale, non può essere misurata direttamente, per cui vengono usate varie equazioni di stima approssimativa del contenuto di massa magra e grassa, che però portano ad inevitabili errori. E' probabile che il fatto che differenti studi usano diverse equazioni di stima sia la causa della discordanza dei risultati relativi all'uomo (Keim, 2003).

Effetti dei CLA sull'insulino-resistenza e sul diabete

Attualmente, l'incidenza del diabete e dell'alterazione del metabolismo del glucosio (impaired glucose metabolism, IGM) è in notevole aumento ed inizia ad interessare anche persone in giovane età (Belury e Vandel Heuvel, 1999; Belury, 2003). Il potenziale costo sanitario del trattamento di questa malattia e di quelle ad essa relative, quali disturbi cardiovascolari, retinopatie e gangrena, è enorme. Un ruolo importante nello sviluppo di tale malattia è spesso svolto dall'obesità e anche piccoli cambiamenti dello stile di vita risultanti in una riduzione di peso corporeo (circa 7%) sono associati ad un notevole abbassamento del rischio di insorgenza di diabete in persone a rischio. Recenti osservazioni, che indicano che il tessuto adiposo produce citochine infiammatorie come anche ormoni, quali la leptina e l'adiponectina, coinvolti nella regolazione del metabolismo energetico, suggeriscono che il tessuto adiposo gioca un ruolo molto importante nell'omeostasi energetica normale e anomala (Hotamisligil *et al.*, 1995; Yamasaki *et al.*, 2003).

L'aumento della produzione di citochine infiammatorie attribuito al tessuto adiposo di persone obese potrebbe spiegare l'aumento del rischio di diabete e di disturbi cardiovascolari in questi pazienti dato che le citochine intensificano il processo infiammatorio nei vasi e aumentano la lipolisi, provocando così una possibile insulino-resistenza (Belury e Vandel Heuvel, 1999; Belury, 2003). 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). In ratti alimentati con diete contenenti 1.5 g di mix di CLA o 0.02 g/100g di troglitazone, un farmaco antidiabetico e PPAR-agonista, sono state osservate significative riduzioni del glucosio plasmatico a digiuno, di insulina, di trigliceridi, di acidi grassi non esterificati e di leptina. Tali effetti sull'insulino-resistenza e sulla IGM non erano dovuti solo ad una ridotta ingestione di cibo (Belury e Vandel Heuvel, 1999; Belury, 2003). In contrasto con questi risultati, una somministrazione prolungata di CLA a suini e topi non diabetici risultava in un leggero aumento dei livelli serici di glucosio e/o insulina (Belury e Vandel Heuvel, 1999; Belury, 2003). Effetti simili sono stati osservati negli esseri umani (Medina *et al.*, 2000; Riserus *et al.*, 2001).

Effetti dei CLA sui disturbi cardiovascolari

Per disturbo cardiovascolare (CVD) si intende una patologia piuttosto complessa con implicazioni metaboliche (in particolare metabolismo lipidico) e infiammatorie legate all'endotelio vascolare. La risposta infiammatoria delle cellule dalla parete vascolare provoca l'attivazione di molecole di adesione, lo stravasamento di linfociti e monociti nell'intima, la formazione finale di cellule schiumose e l'aterogenesi (Bhattacharya *et al.*, 2006; Tricon *et al.*, 2004, 2005; Wahle *et al.*, 2004; Wahle e Rotondo, 1999).

E' stato dimostrato che la somministrazione di una miscela di CLA o dei singoli isomeri riduce l'entità delle lesioni aterosclerotiche indotte dal colesterolo nell'arco aortico e nell'aorta toracica sia di conigli che di criceti (Kritchevsky, 1999; Nicolosi *et al.*, 1997). Anche quando somministrati a livelli bassi quali lo 0.1% della dieta, le lesioni risultavano ridotte del 28% nell'arco aortico e del 41% nell'aorta toracica. Tale effetto fu ulteriormente intensificato aumentando il livello di CLA allo 0.5% (Kritchevsky *et al.*, 2002). Ciò risulta particolarmente interessante in quanto un livello di CLA così basso, che può essere benefico nella prevenzione di disturbi cardiaci, è facilmente raggiungibile nella dieta umana. Interessante è anche l'osservazione che la somministrazione di CLA a conigli con placche aterosclerotiche stabilizzate risultava in una regressione di tali placche, effetto che non era mai stato osservato nel caso di altri acidi grassi (Kritchevsky *et al.*, 2004). Una regressione simile di lesioni aterosclerotiche è stata recentemente osservata anche in topi (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. Come è stato già detto i CLA attenuano l'espressione di citochine infiammatorie in animali e esseri umani. E' stato recentemente dimostrato che essi inibiscono l'espressione di molecole di adesione indotte da citochine in cellule endoteliali e muscolari a livello sia di mRNA che di proteine (Goua *et al.*, 2003; Goua e Wahle, 2007; Masso-Welch *et al.*, 2002; Sneddon *et al.*, 2006). Inoltre è stato dimostrato che i CLA attenuano l'attivazione del complesso NF-kB/IkB citosolico prevenendo la fosforilazione del componente IkB in cellule vascolari (Goua *et al.*, 2003; Masso-Welch *et al.*, 2002). L'inibizione dell'attivazione del complesso NF-kB/IkB dovrebbe ridurre la trascrizione delle citochine, delle molecole di

adesione e dei geni COX, coinvolti nell'iniziazione e nella progressione dell'aterogenesi. E' quindi probabile che i CLA siano capaci di attenuare il processo aterosclerotico attraverso l'inibizione delle citochine infiammatorie, nonché attraverso l'inibizione della cascata di segnali di stress che tali citochine innescano.

COMPOSIZIONE ACIDICA DEL LATTE

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.

Infatti, al fine di evitare eccessive interferenze dei grassi sull'attività microbica ruminale e consentire il passaggio degli acidi grassi insaturi al duodeno evitando le trasformazioni ruminali, sono stati proposti vari metodi di protezione per la fonte lipidica della dieta:

- incapsulazione con proteine e formaldeide
- inclusione nella dieta di semi integrali di oleaginose affinché il tegumento possa proteggere l'olio contenuto all'interno
- somministrazione sotto forma di sali di calcio che limiterebbero la disponibilità di gruppi carbossilici liberi

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 valerato portano alla sintesi di acidi grassi a lunga catena con catena lineare e numero dispari di atomi di C. Utilizzando, invece, come precursori isobutirrato, isovalerato e 2-metil-butirrato, la cellula microbica sintetizza acidi ramificati nelle forme *iso* e *anteiso*. Gli acidi grassi moninsaturi vengono infine sintetizzati per via anaerobica a partire da beta-idrossidecanoato.

Digestione ed assorbimento dei lipidi nell'intestino

I lipidi che giungono al duodeno sono composti per la maggior parte da acidi grassi liberi (di origine alimentare e microbica, 70%), da piccole quantità di fosfolipidi microbici (dal 10 al 20%) assorbiti sulle particelle alimentari ed alcuni trigliceridi alimentari che hanno oltrepassato il rumine senza subire modifiche (*by-pass*). In questa sede la digestione dei lipidi avviene in un *medium* bifasico in cui c'è una fase particellare, alla quale aderiscono gli acidi grassi liberi (FFA) e i fosfolipidi, ed una micellare, contenente gli acidi grassi dissolti. Il trasferimento degli FFA alla fase micellare avviene gradualmente con il procedere del bolo lungo il tratto intestinale e viene favorita dalla secrezione biliare, che porta alla completa emulsione dei grassi. Questa condizione è indispensabile per l'azione delle lipasi pancreatiche che semplifica i lipidi fino a renderne possibile l'assorbimento attraverso i villi intestinali.

Sintesi intestinale delle lipoproteine

Mentre nelle cellule della mucosa intestinale dei monogastrici, gli FFA vengono esterificati con i 2-monogliceridi, provenienti dall'idrolisi intestinale dei trigliceridi alimentari, per formare nuovi di e trigliceridi, nel caso dei ruminanti questa via metabolica è limitata dalla bassa quantità di trigliceridi che riesce ad oltrepassare la barriera ruminale. Pertanto la via preferenziale è quella dell' α -glicerofosfato in cui il glucosio è il precursore della glicerina usata per l'esterificazione degli acidi grassi.

I trigliceridi, i rimanenti monogliceridi, i fosfolipidi, il colesterolo e alcune specifiche apoproteine vengono assemblati in chilomicroni all'interno delle cellule della mucosa intestinale e trasferiti negli spazi intercellulari da dove vengono drenati tramite il sistema linfatico. Fanno eccezione gli acidi grassi con meno di 14 atomi di C, che accedono direttamente come NEFA al sangue per poi venire rapidamente ossidati. I chilomicroni vengono metabolizzati a livello epatico e gli acidi grassi che ne derivano subiscono diversi destini (ossidazione, desaturazione, elongazione, riesterificazione e successivo assemblaggio con lipoproteine a varia densità).

Gli acidi grassi trasportati nel plasma all'interno di chilomicroni e lipoproteine (HDL, LDL, VLDL) raggiungono la ghiandola mammaria, dove vengono utilizzati per la sintesi del grasso del latte.

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 mobilizzazione 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.

Poiché il sistema enzimatico della ghiandola mammaria non è capace di allungare la catena carboniosa da C16 a C18, la quota di acidi grassi neosintetizzata comprende solo quelli a corta o a media catena (da C4 a C14). L'acido palmitico (C16:0) proviene per metà dalla sintesi endogena e per metà dalla dieta. Tutti gli acidi grassi a catena più lunga di 18 atomi di C devono essere forniti all'animale con l'alimentazione che, pertanto, rappresenta l'elemento principale per la definizione della frazione acidica a lunga catena del latte.

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).

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 acidico 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 (Sehart *et al.*, 1998; Yurawecz *et al.*, 1998).

Origine dei CLA nei prodotti dei ruminanti

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

I lipidi di origine alimentare subiscono due importanti trasformazioni nel rumine (Dawson e Kemp, 1970; Keeney, 1970; Dawson *et al.*, 1977). La prima è l'idrolisi dei legami esteri catalizzata dalle lipasi microbiche, che porta alla produzione di acidi grassi liberi; la seconda è la bioidrogenazione degli acidi grassi insaturi.

I batteri sono i principali responsabili della bioidrogenazione degli acidi grassi insaturi nel rumine, mentre i protozoi sembrano svolgere un ruolo minore (Harfoot e Hazlewood, 1988). Per molto tempo, il *Butyrivibrio*

fibrisolvens è stato considerato il solo batterio in grado di bioidrogenare i lipidi (Kepler *et al.*, 1966). Successivamente, sono stati isolati diversi batteri ruminali coinvolti nella bioidrogenazione (Harfoot e Hazlewood, 1988) che sono stati suddivisi da Kemp e Lander (1984) in due gruppi, in funzione del tipo di reazione che catalizzano e dei relativi prodotti finali:

- il gruppo A capace di idrogenare gli acidi linoleico e α -linolenico, producendo principalmente *trans*-11 C18:1;
- il gruppo B che utilizza quest'ultimo come principale substrato per la produzione di acido stearico.

La sequenza di bioidrogenazione dell'acido linoleico (*cis*-9, *cis*-12 C18:2) inizia con l'isomerizzazione del doppio legame dalla posizione 12 a quella 11, formando così il *cis*-9, *trans*-11 CLA.

L'enzima responsabile della formazione di doppi legami coniugati a partire dai doppi legami *cis*-9, *cis*-12 dell'acido linoleico e degli acidi α - e γ -linolenico è la linoleate isomerasi (EC 5.2.1.5), enzima parzialmente purificato e le cui proprietà cinetiche sono state caratterizzate in diverse specie batteriche (Kepler e Tove, 1967; Kepler *et al.*, 1970; Yokoyama e Davis, 1971; Kemp *et al.*, 1984). Normalmente quest'isomerasi è legata alla membrana cellulare batterica (Griinari e Barman, 1999) e può utilizzare, come substrato, sia l'acido linoleico sia il linolenico, in quanto entrambi posseggono una struttura a dieni *cis*-9, *cis*-12 ed un gruppo carbossilico libero (Kepler *et al.*, 1970).

L' isomerizzazione è seguita da una rapida idrogenazione del legame *cis*-9, ad opera di una reduttasi (Hughes *et al.*, 1982), che porta alla conversione del *cis*-9, *trans*-11 CLA in *trans*-11 C18:1 (acido

transvaccenico, TVA), il più abbondante *trans*-isomero nei tessuti dei ruminanti. L'idrogenazione di quest'ultimo avviene con minore rapidità, determinando un suo accumulo a livello ruminale (Tanaka e Shigeno, 1976; Singh e Hawke, 1979).

Anche la bioidrogenazione dell'acido α -linolenico (C18:3) inizia con un'isomerizzazione, seguita da una sequenza di riduzioni per terminare con la formazione di acido stearico. Tra i due isomeri (α e γ) dell'acido linolenico il più abbondante C18:3 in natura è l'acido α -linolenico (*cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 acido octadecatrienoico). La bioidrogenazione ruminale dell'acido α -linolenico porta alla formazione di *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 acido coniugato octadecatrienoico, come predominante prodotto iniziale dell'isomerizzazione, seguita dalla riduzione dei doppi legami *cis*. Di conseguenza, l'acido *trans* vaccenico rappresenta il prodotto intermedio comune della bioidrogenazione degli acidi linoleico ed α -linolenico. Analogamente, anche la bioidrogenazione dell'acido γ -linolenico (*cis*-6, *cis*-9, *cis*-12 acido octadecatrienoico) porta alla formazione di acido *trans* vaccenico (Harfoot e Hazelwood, 1988; Griinari e Barman, 1999).

Una riduzione del pH ruminale induce variazioni nella popolazione batterica e, conseguentemente, modifica i prodotti finali della fermentazione (Van Soest, 1994). Leat *et al.* (1977) hanno dimostrato che variazioni della popolazione batterica ruminale sono associate a modifiche del processo di idrogenazione e, di conseguenza, del contenuto di acido *trans* vaccenico nel liquido ruminale e nei lipidi tissutali. Inoltre,

Griinari *et al.* (1998) hanno evidenziato come le modificazioni dell'ambiente ruminale, indotte dalla somministrazione di diete caratterizzate da un basso rapporto foraggi:concentrati, si associno a variazioni del contenuto in acido *trans* vaccenico nel latte. In questa situazione, l'acido octadecenoico *trans*-10 sostituisce il C18:1 *trans*-11, diventando il *trans* isomero C18:1 più abbondante nel grasso del latte. Sono state avanzate diverse ipotesi sui meccanismi che portano alla produzione dell'acido octadecenoico *trans*-10 (Griinari e Barman, 1999). La più plausibile di queste prevede l'azione di una specifica *cis*-9, *trans*-10 isomerasi di origine batterica che porterebbe alla formazione dei doppi legami coniugati *trans*-10, *cis*-12. Quest'ipotesi è avvalorata dal fatto che la somministrazione di diete a basso contenuto di fibra induce un aumento della concentrazione di CLA *trans*-10, *cis*-12 nel latte (Griinari e Barman, 1999). Infatti la *cis*-12, *trans*-11 isomerasi prodotta dal *B. fibrisolvens* può idrogenare il CLA *trans*-10, *cis*-12 (Kepler *et al.* 1966), producendo acido octadecenoico *trans*-10. È stato dimostrato che il 50% dell'acido linoleico è convertito in CLA *trans*-10, *cis*-12 e solo il 10% in C18:2 *trans*-10 dal batterio anaerobio *Propionibacterium* isolato dal cieco di topo (Verhulst *et al.*, 1987). Si è anche osservato che un altro batterio ruminale, *Megasphaera elsdenii* YJ-4, è capace di produrre CLA *trans*-10, *cis*-12 (Kim *et al.*, 2000). Questo isomero viene formato però solo a partire dall'acido linoleico e non dall'acido linolenico, a differenza di quanto accade per l'isomero *cis*-9, *trans*-11. Non è chiaro però se l'acido octadecenoico viene desaturato in posizione *cis*-12 per produrre l'isomero *trans*-10, *cis*-12 nel ruminale o in altri tessuti per via endogena.

Mosley *et al.* (2002) hanno dimostrato *in vitro* che anche l'acido oleico, durante la sua bioidrogenazione ad acido stearico, porta alla formazione di diversi *trans* isomeri del C18:1, incluso il *trans* vaccenico. Ciò suggerirebbe che l'impiego di semi od oli ricchi di acido oleico, quali quelli di arachide, colza, palma e girasole, nell'alimentazione dei ruminanti potrebbe far aumentare il contenuto di CLA e TVA del latte.

Il pH ruminale riveste un ruolo fondamentale nel mantenimento delle condizioni ambientali ottimali per il *B. Fibrisolvens*. È stato dimostrato, infatti, che un pH ruminale uguale o superiore a 6.0 ha effetto positivo sulla produzione di TVA e CLA *in vitro* (Troegeler-Meynadir *et al.*, 2003; Martin e Jenkins, 2002). Tale osservazione è particolarmente importante in quanto nella formulazione di diete per vacche da latte ad alta produzione o per bovini da carne spesso vengono utilizzate elevate quantità di granelle, che fanno diminuire il pH ruminale a valori inferiori a 6.0. Oltre all'effetto sul *B. Fibrisolvens*, non è ancora stato del tutto chiarito se il pH influenzi anche il processo di bioidrogenazione degli acidi grassi insaturi con 18, 20 o 22 atomi di carbonio.

E' stato, inoltre, osservato che la produzione di CLA aumenta arricchendo la dieta con olio di pesce o con alghe marine (*Schizochytrium sp.*) (Franklin *et al.*, 1999; Donovan *et al.*, 2000). Non è chiaro come l'impiego di tali prodotti marini possa far aumentare il contenuto di CLA e TVA, in quanto gli acidi grassi a lunga catena di cui tali prodotti sono ricchi (da 20 a 22 atomi di carbonio) non dovrebbero essere implicati nella produzione di CLA e TVA. E' stato ipotizzato che la presenza nel rumine di acidi grassi a lunga catena inibendo la crescita dei batteri responsabili

della bioidrogenazione o dell'idrogenazione del TVA a stearico, limiti la completa bioidrogenazione del C18:2 (Griinari e Barman, 1999), facendo sì che il TVA passi immodificato nei tessuti.

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 CLA *cis*-9, *trans*-11 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.

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 TVA ad opera di una Δ^9 -desaturasi (Parodi, 1994).

Una stretta correlazione fra acidi *trans*-octadecenoici e acidi grassi a dieni coniugati fu osservata per la prima volta in campioni di burro sottoposti a spettroscopia ad infrarossi (Barlett e Chapman, 1961). Ricerche successive, effettuate utilizzando diversi tipi di diete (Jiang *et al.*, 1996; Jahreis *et al.*, 1997; Precht e Molquentin, 1997; Griinari e Bauman, 1999), dimostrarono che era il contenuto dell'isomero *trans*-11 C18:1 ad essere direttamente proporzionale a quello del CLA *cis*-9, *trans*-11 nel grasso del latte.

Griinari *et al.* (1997), in una serie di ricerche, ipotizzarono che una parte dei CLA del latte fosse di origine endogena e che il CLA *cis*-9, *trans*-11 originasse da una desaturazione dell'acido *trans* vaccenico ad opera di una Δ^9 -desaturasi mammaria. In un primo esperimento (Corl *et al.* 1998) infusero per tre giorni acido *trans* 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 Δ^9 -desaturasi (Corl *et al.*, 1999). Ciò determinò una drastica diminuzione del contenuto di CLA *cis*-9, *trans*-11 nel latte. Secondo Griinari *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; Looor *et al.*, 2002).

Anche nel grasso di infiltrazione muscolare è stata individuata l'attività della Δ^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 TVA (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 CLA *cis-9, trans-11* del grasso della carne bovina viene prodotto dalla desaturazione del TVA. La desaturazione endogena del TVA a CLA *cis-9, trans-11*, inoltre, aumenterebbe con l'aumentare della quantità di foraggio nella dieta (Sackman *et al.*, 2003)

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 TVA indicherebbe che anche nei piccoli ruminanti la sintesi post ruminale giochi un ruolo predominante. LeDoux *et al.* (2002) hanno dimostrato che il TVA 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.

Δ^9 -desaturasi

Il sistema della desaturasi è un complesso multienzimatico che include NADH-citocromo- b₅ reduttasi, citocromo b₅, acil-CoA sintasi e Δ^9 -desaturasi. 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 (Enoch *et al.*, 1976; Mahofouz *et al.*, 1980; Pollard *et al.*, 1980).

Oltre che alla formazione del CLA *cis*-9, *trans*-11, la Δ^9 -desaturasi ha un ruolo attivo anche in quella di altri acidi grassi C18:2 *cis*-9, *trans*-n, quali il *trans*-7, *cis*-9 e il *cis*-9, *trans*-13 CLA identificati da Yurawecz *et al.* (1998).

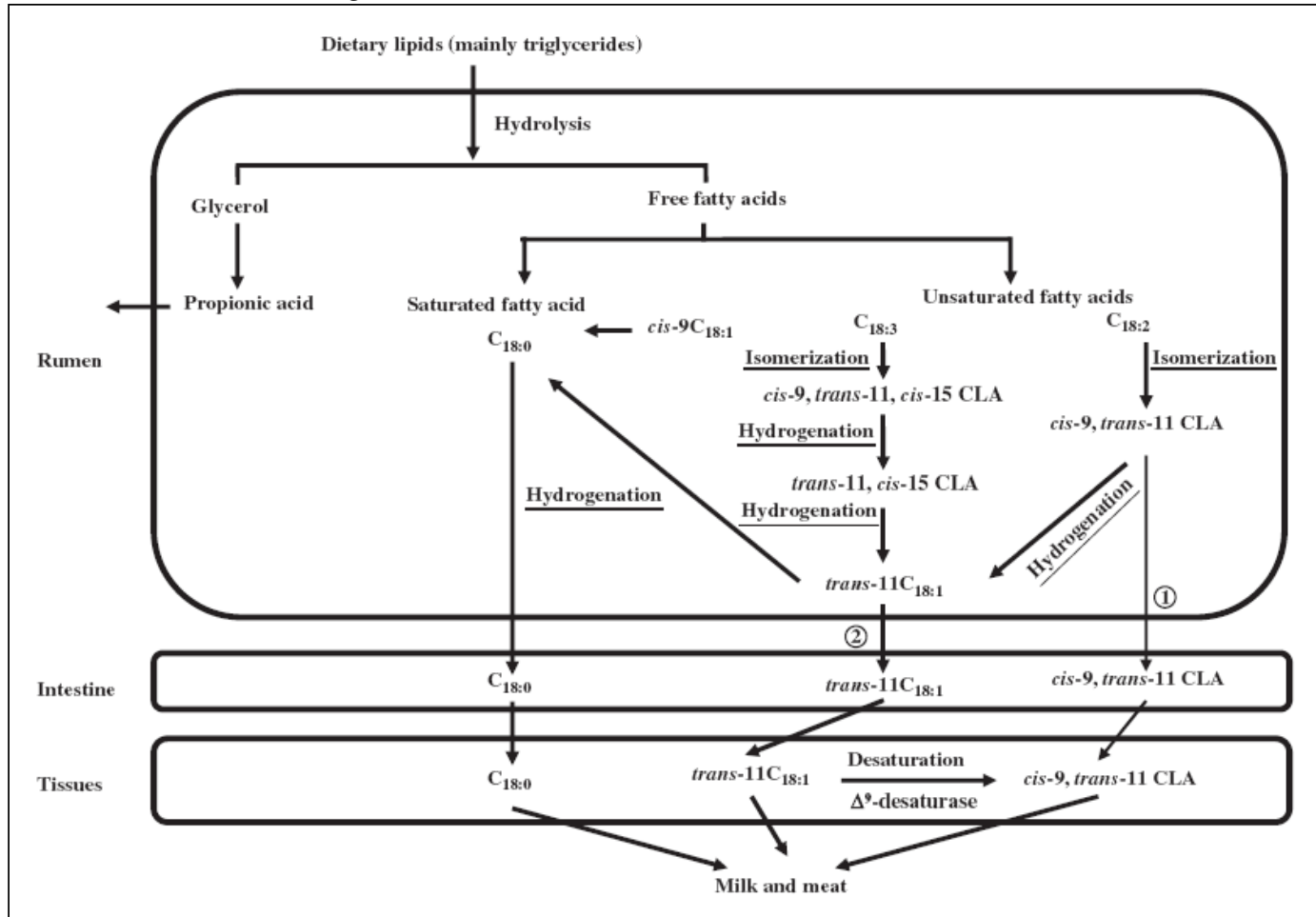
Per quanto riguarda la localizzazione della Δ^9 -desaturasi nei tessuti, essa cambia a seconda della specie animale considerata. Nei roditori, le maggiori concentrazioni di mRNA e la maggiore attività enzimatica si riscontrano nel fegato (Ntambi, 1995; Tocher *et al.*, 1998). Al contrario, ovini e bovini presentano maggiore concentrazione e attività dell'enzima nel tessuto adiposo, che, quindi, sembra essere la maggiore fonte di sintesi endogena di CLA *c*-9, *t*-11 nel caso di animali da carne (Wahle, 1974, St. John *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1992; Cameron *et al.*, 1994; Page *et al.*, 1997). Nel caso di ruminanti da latte, studi dell'attività della Δ^9 -desaturasi hanno portato a definire la ghiandola mammaria come il principale sito della sintesi endogena di CLA (Bickerstaffe e Annison, 1970; Kinsella, 1972). Ciò è stato dimostrato anche *in vivo* da Bickerstaffe e Johnson (1972) che con infusione intravenosa di acido sterculico in capre in lattazione registrarono una notevole riduzione del rapporto acido oleico: acido stearico nel latte, mentre la composizione acidica del plasma risultava quasi inalterata. Dal momento che l'acido sterculico in

circolo avrebbe dovuto inibire la Δ^9 -desaturasi in tutti gli organi, gli autori conclusero che la ghiandola mammaria è il maggior sito di desaturazione degli acidi grassi del latte.

Studi sull'attività della Δ^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 (Ntambi, 1995, Tocher *et al.*, 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 Δ^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. Gli stessi autori hanno inoltre dimostrato che l'insulina regola l'espressione genica della Δ^9 -desaturasi in espianti di tessuto adiposo ovino.

Fig.3 Meccanismi di formazione dei CLA (Tanaka, 2005)



PARTE SPERIMENTALE

Allo scopo di apportare un nostro contributo sul ruolo svolto dall'alimentazione degli animali sulla composizione acidica e sul contenuto in CLA delle derrate da essi forniti, sono state effettuate due prove sperimentali, una sulla specie caprina, l'altra su quella bufalina.

La prima indagine ha previsto il confronto tra tre diverse tipologie di allevamento (intensivo, estensivo, biologico) e quindi tra tre differenti piani alimentari. La scelta di operare in tal senso è scaturita dalla sempre crescente domanda del consumatore nei riguardi di alimenti prodotti con l'impiego di tecniche di allevamento meno "dure", rispettose dell'ambiente e del benessere animale. Tale esigenza nasce anche dalla convinzione che in questa ultima maniera vengano prodotte derrate con caratteristiche dietetico-nutrizionali in grado di svolgere effetti favorevoli sulla salute umana. In questo contesto, l'impiego del pascolo viene considerato come uno dei mezzi per migliorare la composizione acidica del grasso nonché di aumentare il contenuto dei CLA dei prodotti animali. L'adozione, poi, del sistema di allevamento biologico, caratterizzato dal punto di vista del alimentare dall'impiego di razioni maggiormente rispettose della fisiologia animale, dovrebbe contribuire ad esaltare tali favorevoli caratteristiche.

Con la seconda indagine è stata valutata l'influenza sulla composizione acidica del grasso e dei contenuti in CLA del latte di bufale alimentate

con razioni che hanno previsto la sostituzione dell'insilato di mais con quello di sorgo. L'insilato di mais è un ingrediente molto comune nella razione di bovine e bufale da latte, in quanto è un foraggio molto energetico (0.80-0.85 Unità Foraggiere Latte/q di sostanza secca), caratterizzato da elevata appetibilità e buona digeribilità dei principi nutritivi. La coltivazione del mais per la produzione di insilati è particolarmente diffusa nelle zone della pianura padana, fertili e ricche di acqua; in aree asciutte e calde, invece, il mais non riesce ad esprimere al massimo la sua potenzialità produttiva, a meno che non ci sia una cospicua irrigazione, con un conseguente notevole dispendio energetico ed economico e forte impatto ambientale. Alla luce di ciò, si rende sempre più urgente, anche a causa del progressivo peggioramento delle condizioni di siccità di alcune zone del Sud Italia, la sostituzione del mais con un'essenza più adatta a tale ambiente. Il sorgo sembrerebbe essere una possibile alternativa, in quanto esso è caratterizzato da una buona resistenza a situazioni climatiche aride e siccitose, da una buona produzione di biomassa e un buon rendimento quando sottoposto al processo di insilamento.

In un terzo contributo sperimentale, si è invece valutato l'effetto di una supplementazione con CLA e altri acidi grassi a colture cellulari di monociti THP-1, stimolati con lipopolissaccaridi, sulla produzione di citochine infiammatorie.

1° CONTRIBUTO SPERIMENTALE

Materiali e metodi

L'indagine è stata effettuata presso l'Azienda Zootecnica Amato, sita in località *Affonnatore* del comune di Casaleto Spartano (provincia di Salerno) che ricade nell'area montuosa del Cilento.

L'azienda alleva circa 250 soggetti appartenenti al genotipo Cilentana, per l'85% della variante nera, mentre il restante 15% risulta equamente suddiviso tra quella fulva e grigia.

I parti bigemini rappresentano attualmente circa l'80% del totale mentre il numero di soggetti che forniscono tre capretti per parto è in costante aumento.

Come da consuetudine locale, i capretti vengono esitati sul mercato unicamente in occasione della Pasqua; l'azienda pertanto effettua la programmazione dei parti regolando la promiscuità sessuale degli animali, in funzione di tale evenienza.

La mungitura viene effettuata manualmente due volte al giorno in orari variabili in funzione della stagione dell'anno.

Il Servizio Veterinario della ASL di competenza effettua il periodico controllo del gregge ai fini dell'eradicazione della brucellosi e della tubercolosi; inoltre, con cadenza semestrale vengono condotti trattamenti profilattici per la prevenzione delle ecto ed endo-parassitosi.

La prova sperimentale è stata condotta su 45 capre pluripare del peso medio di 60 kg (± 2.5 kg), alimentate con fieno di avena *ad libitum* e con

200 – 300 e 400 g/capo/giorno di mangime concentrato [proteine grezze 18% della sostanza secca (SS); 1.03 Unità Foraggiere Latte (UFL)/kg SS; 1.4% Ca; 0.7% P], rispettivamente 45 – 30 e 15 giorni prima del parto. Successivamente le capre sono state equamente suddivise in tre gruppi, omogenei per ordine di lattazione e quantità di latte prodotta nella lattazione precedente, sottoposti a tre differenti sistemi di allevamento:

- intensivo_I: gli animali sono stati alimentati in stalla con fieno di erba medica e un con un mangime concentrato del commercio. La scelta di somministrare il fieno di medica è stata operata al fine di garantire lo stesso apporto proteico a tutti i gruppi; infatti, in indagini condotte precedentemente nella stessa area geografica (Infascelli *et al.*, 1998; Cutrignelli *et al.*, 2000), il contenuto di proteine grezze del pascolo era risultato prossimo al 16% sulla sostanza secca. L'ingestione giornaliera di fieno, misurata sottraendo il peso dei residui in mangiatoia alla quantità somministrata giornalmente, è stata pari a 1.2 kg di tal quale/capo.
- estensivo_E: gli animali hanno avuto libero accesso al pascolo (dalle ore 9.00 alle ore 16.00) e, rientrati in stalla, ricevevano lo stesso mangime somministrato al gruppo I;
- biologico_B: gli animali hanno avuto libero accesso al pascolo (dalle ore 9.00 alle ore 16.00) e, rientrati in stalla, ricevevano un mangime costituito da materie prime (tra cui il lino, non presente nel mangime precedente) coltivate con metodo biologico.

La somministrazione del mangime concentrato per tutti i gruppi è stata gradualmente aumentata fino a 700 g/capo/giorno.

Ogni mese sono stati raccolti campioni di pascolo attraverso lo sfalcio di tre aree campione (2.5 m² ognuna) a 3 cm di altezza dal suolo. Dopo averli pesati, i campioni di pascolo sono stati essiccati in stufa a ventilazione alla temperatura di 65°C, macinati ad 1 mm di granulometria e conservati. Campioni di pascolo, erba medica e dei due mangimi concentrati sono stati analizzati per determinare la composizione chimica (AOAC, 2000; Van Soest *et al.*, 1991). Il valore nutritivo è stato calcolato secondo il metodo INRA (1978).

Nei primi 60 giorni dopo il parto l'intera produzione lattea è stata destinata all'alimentazione dei capretti, mentre, dopo la vendita di questi ultimi (seconda metà di aprile), le capre sono state sottoposte a doppia mungitura giornaliera per un totale di 5 mesi.

La produzione di latte è stata monitorata mensilmente e campioni rappresentativi di latte sono stati analizzati per i contenuti di proteine, grassi e lattosio con metodo ad infrarossi utilizzando Milko Scan 133B (Foss Matic, Hillerod, Denmark) tarato per latte di capra.

Per determinare il profilo acidico del latte, è stata effettuata la separazione del grasso totale dai campioni di latte utilizzando una miscela di esano-isopropanolo (3/2 v/v) come descritto da Hara e Radin (1978). Gli acidi grassi, così estratti, sono stati *trans* mutilati 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

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) così composta: C4:0 (butirrico), C6:0 (caproico), C8:0 (caprilico), C10:0 (caprico), C11:0 (undecanoico), C12:0 (laurico), C13:0 (tridecanoico), C14:0 (miristica), C14:1 (miristoleico), C15:0 (pentadecanoico), C15:1 (pentadecanoico *cis*-10), C16:0 (palmitico), C16:1 (palmitoleico), C17:0 (eptadecanoico), C17:1 (eptadecanoico *cis*-10), C18:0 (stearico), C18:1 n-9 *trans* (elaidico), C18:1 n-9 *cis* (oleico), C18:2 n-6 *trans* (linolelaidico), C18:2 n-6 *cis* (linoleico), C20:0 (arachidonico), C18:3 n-6 (γ -linolenico), C20:1 (eicosanoico), C18:3 n-3 (linolenico), C21:0 (eneicosanoico), C20:2 (eicosadienoico), C22:0 (beenico), C20:3 n-6 (eicosatrienoico), C22:1 n-9 (erucico), C20:3 n-3 (eicosatrienoico), C20:4 n-6 (eicosatetraenoico), C23:0 (tricosanoico), C22:2

cis-13 (docosadienoico), C24:0 (lignoceric), C20:5 n-3 (eicosapentanoico), C24:1 (nervonico), C22:6 n-6 (docosaesapentanoico).

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).

Le classi di acidi grassi sono state formate nel seguente modo:

SCFA → C4-C12

MCFA → C14-C16:1

LCFA → >C18

n-3 → C18:3 n3
C20:3 n-3
C22:6

n-6 → C18:2 *cis*
C18:2 *trans*
C18:3 n-6
C20:3 n-6

Analisi statistica

I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza usando la procedura GLM (General Linear Model) del SAS (2000), secondo il seguente modello:

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

dove:

y_{ijk} = singola osservazione;

μ = media generale;

G_i = effetto gruppo ($i = 1, 2, 3$);

P_j = effetto mese di prelievo ($j = 1, \dots, 5$);

$G_i \times P_{ij}$ = interazione gruppo \times mese di prelievo;

ε_{ijk} = errore.

Il confronto fra le medie è stato effettuato mediante Tukey test (SAS, 2000)

Risultati e discussione

Composizione chimica e valore nutritivo degli alimenti

In tabella 3, si riportano la composizione chimica e il valore nutritivo degli alimenti utilizzati per la prova.

Tab. 3 Composizione chimica e valore nutritivo degli alimenti

	PG	EE	NDF	ADF	ADL	UFL
			% SS			UFL/Kg SS
Fieno medica	16.0	1.7	43.4	30.5	5.8	0.75
MCI bio	17.0	5.0	25.8	10.3	2.8	1.1
MCI	18.0	3.0	27.0	11.5	3.0	1.03
Pascolo	16.6	2.0	49.3	34.1	5.0	0.76

MCI: mangime concentrato integrato

In funzione della composizione chimica, il mangime concentrato costituito da materie prime di origine biologica ha mostrato un valore nutritivo leggermente superiore rispetto a quello convenzionale (1.10 vs 1.03 UFL/kg s.s.). La scelta di somministrare il fieno di medica al gruppo di animali allevati in stalla si è rilevata giusta, in quanto sia in termini di proteine grezze che di valore nutritivo, l'analisi chimica di questo foraggio e del pascolo ha fatto registrare dati quasi sovrapponibili (PG 16.0% vs 16.6%; UFL/kg s.s. 0.75 vs 0.76, rispettivamente per il fieno e il pascolo).

Produzione e composizione chimica del latte

La produzione media di latte (tabella 4) non è risultata significativamente diversa tra i gruppi a confronto anche se gli animali alimentati secondo il metodo biologico hanno fatto registrare valori leggermente superiori.

Tab. 4 Produzione e composizione chimica del latte

	Produzione	Proteine	Grasso	Lattosio
	<i>g/d</i>		<i>%</i>	
<i>Effetto gruppo</i>				
E	1337.2	3.53	4.45 ^A	4.59 ^B
B	1432.7	3.58	4.60 ^A	4.58 ^B
I	1418.1	3.64	3.79 ^B	4.67 ^A
<i>Effetto prelievo</i>				
I	2043.7 ^A	3.28 ^C	4.23 ^B	4.76 ^A
II	1703.3 ^B	3.50 ^{BC}	4.50 ^A	4.74 ^A
III	1367.8 ^C	3.55 ^B	3.97 ^C	4.60 ^B
IV	1154.6 ^C	3.44 ^{BC}	4.18 ^B	4.53 ^{BC}
V	710.8 ^D	4.14 ^A	4.52 ^A	4.43 ^C
<i>Significatività</i>				
Gruppo	NS	NS	**	**
Prelievo	**	**	**	**
Gruppo*prel	NS	NS	NS	*
SEM	10.47 x 10 ⁴	0.14	0.39	0.12

A, B e **: P < 0.01; a, b e *: P < 0.05; NS: non-significativo

In termini di composizione chimica, i gruppi allevati al pascolo hanno mostrato una percentuale di grasso significativamente superiore (4.45 e 4.60 vs 3.79%, rispettivamente per i gruppi E, B e I). Per tale parametro, i nostri risultati sono in accordo con quanto riportato per le capre Alpine da Soryal *et al.* (2004). Sebbene nel nostro caso non sia stato possibile misurare l'ingestione al pascolo, è ipotizzabile che gli animali dei gruppi E e B abbiano ingerito maggiori quantità di foraggio e quindi una quantità di fibra più elevata, probabilmente per la minore palatabilità delle leguminose per le capre (Malechek e Provenza, 1981).

Come atteso, col progredire della lattazione, la produzione di latte è andata via via decrescendo; la percentuale di proteine pur mostrando un trend all'aumento progressivo ha mostrato una leggera flessione in occasione del 4° prelievo. Per quanto riguarda il grasso i valori massimi sono stati registrati al 2° e al 5° prelievo.

Composizione acidica e contenuto di CLA del latte

Gli esteri metilici degli acidi grassi e dei CLA identificati in questa prova, insieme ai relativi tempi di ritenzione sono, di seguito, riportati :

Acidi grassi	Tempi di ritenzione (min)
C4:0	23.46
C6:0	25.54
C8:0	27.91
C10:0	30.67
C11:0	32.30
C12:0	34.38
C13:0	36.91
C14:0	40.36
C14:1	43.07
C15:0	44.25
C15:1	46.43
C16:0	49.14
C16:1	50.98
C17:0	52.97
C17:1	55.08
C18:0	57.68
C18:1 n9t	59.15
C18:1 n9c	59.68
C18:2n6t	61.04
C18:2 n6c	62.44
C20:0	65.79
C18:3 n6	66.06
CLA c9, t11	66.99
C20:1	67.92
C18:3 n3	70.32
CLA t10,c12	70.57
CLA c9, c11	71.02
C22:0	75.32
C20:3 n6	76.07
C22:1 n9	81.00
C20:3 n3	81.26
C22:6 n3	95.15

In tabella 5 si riportano i valori relativi alle percentuali dei principali acidi grassi sul totale degli acidi grassi identificati. Le differenze dei valori di C4:0, C6:0, C8:0, riscontrate nel confronto fra i gruppi, non sono risultate statisticamente significative. Al contrario, vi è stato un effetto significativo del gruppo per tutti gli altri acidi grassi riportati. In particolare, il latte prodotto dagli animali del gruppo I ha mostrato le percentuali più elevate di C10:0, C12:0, C14:0 e C16:0 e quelle più basse di C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 n-6 e C18:3 n-3 quando confrontato con quello ottenuto dagli animali dei gruppi B ed E. Il gruppo B ha fatto registrare il contenuto di C18:0 significativamente più alto dagli altri due, ed il contenuto di C18:1 e C18:2 significativamente differente solo dal gruppo I. L'effetto del prelievo è risultato statisticamente significativo per tutti gli acidi grassi riportati in tabella. Tuttavia, non sembra esserci un trend particolare e comune durante i 5 mesi di lattazione in esame per tutti degli acidi grassi, ad eccezione che per il C18:2 il quale ha mostrato le percentuali più elevate nei primi due mesi di prelievo con progressiva diminuzione, per raggiungere il valore più basso nell'ultimo mese di lattazione. Si è, inoltre, avuto un effetto significativo dell'interazione fra gruppo e prelievo sui valori percentuali di C10:0, C16:1, C18:2, C18:3 n-6 e C18:3 n-3.

Tab. 5 Composizione acidica del grasso del latte

	C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C:16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3 n6	C18:3 n3
(% totale acidi grassi)													
<i>Effetto gruppo (G)</i>													
B	2.753	2.693	2.964	11,007 ^B	4,325 ^C	9,965 ^B	27,504 ^B	0.495 ^b	11,298 ^A	20,051 ^A	2,759 ^A	0,810 ^A	0,058 ^{ab}
I	2.842	2.786	3.032	12,549 ^A	5,736 ^A	11,236 ^A	29,851 ^A	0.619 ^a	7,052 ^C	18,056 ^B	2,173 ^B	0,566 ^B	0,046 ^b
E	2.837	2.350	2.925	11,111 ^B	4,890 ^B	10,724 ^A	28,210 ^B	0.600 ^a	10,115 ^B	19,538 ^{AB}	2,411 ^{AB}	0,857 ^A	0,060 ^a
<i>Effetto prelievo (P)</i>													
I	3,686 ^A	2,213 ^B	2,827 ^{AB}	10,642 ^{BC}	4,415 ^{CD}	9,907 ^{BC}	27.547 ^b	0,599 ^A	10,276 ^{AB}	19,770 ^{AB}	3,367 ^A	0,701 ^{ABC}	0,059 ^{BC}
II	2,019 ^B	2,299 ^B	3,031 ^{AB}	12,528 ^{AB}	5,318 ^B	10,453 ^B	27.656 ^{bc}	0,645 ^A	8,854 ^{BC}	19,657 ^{AB}	3,231 ^A	0,832 ^{AB}	0,042 ^{DC}
III	1,886 ^B	2,719 ^{AB}	3,115 ^{AB}	13,358 ^A	5,150 ^{CB}	10,815 ^B	29.428 ^{ab}	0,603 ^A	9,495 ^{AB}	16,935 ^C	2,002 ^B	0,697 ^{BC}	0,076 ^A
IV	4,509 ^A	2,277 ^B	2,428 ^B	9,232 ^C	3,792 ^D	8,871 ^C	29.541 ^a	0,296 ^B	11,204 ^A	21,881 ^A	2,234 ^B	0,940 ^A	0,064 ^{AB}
V	1,956 ^B	3,540 ^A	3,465 ^A	12,021 ^{AB}	6,244 ^A	13,162 ^A	28.438 ^c	0,714 ^A	7,614 ^C	17,833 ^{BC}	1,406 ^C	0,552 ^C	0,032 ^D
<i>Significatività</i>													
gruppo	NS	NS	NS	**	**	**	**	**	**	**	**	**	*
prel	**	**	**	**	**	**	NS	**	**	**	**	**	**
gruppo*prel	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	**	NS	**	**	**
SEM	1.343	0.921	0.7560	1.956	0.825	1.255	2.9350	0.17	2.068	2.43	0.574	0.237	0.021

A, B e **: P < 0.01; a, b e *: P < 0.05; NS: non-significativo

I raggruppamenti degli acidi grassi in base alla presenza o meno di doppi legami (SFA, MUFA, PUFA), alla posizione del primo doppio legame (n-3, n-6) e alla lunghezza della catena carboniosa (SCFA, MCFA, LCFA) sono riportati come percentuale sul totale degli acidi grassi, in tabella 6.

Il gruppo ha avuto effetto statisticamente significativo su tutte le classi di acidi grassi tranne che per gli n-3. Il gruppo I ha fatto registrare i valori di SFA, SCFA (C4-C12) e MCFA (C14-C16:1) significativamente più alti di quelli degli altri due gruppi. Per quanto riguarda invece i MUFA, PUFA, n-6, LCFA, essi sono risultati significativamente più elevati nei gruppi B ed E, quando confrontati con il gruppo I.

Il mese di lattazione ha avuto effetto significativo su tutte le classi riportate, mentre l'interazione fra gruppo e prelievo ha influenzato significativamente solo le percentuali di n-3 e LCFA.

I nostri risultati circa il ruolo del pascolo sulla composizione acidica del grasso del latte, hanno confermato quanto riportato da Banni *et al.* (1996), Cabiddu *et al.* (2001) e da Dhiman *et al.* (1999) rispettivamente i primi due per le pecore e il terzo le bovine. In particolare Cabiddu *et al.* (2001) trovarono nel latte di pecore alimentate al pascolo, percentuali di PUFA superiori rispetto a quello di animali allevati in stalla (6% vs 4.07% degli acidi grassi totali). Nella presente sperimentazione anche la concentrazione di MUFA è risultata superiore nel latte degli animali allevati al pascolo mentre quella degli acidi grassi a corta e media catena è risultata inferiore.

Tab. 6. Classi di acidi grassi

	SFA	MUFA	PUFA	n-3	n-6	SCFA	MCFA	LCFA
<i>(% totale acidi grassi)</i>								
<i>Effetto gruppo (G)</i>								
B	74,358 ^B	21,226 ^A	4,528 ^A	0.101	3,895 ^A	23,803 ^B	39,259 ^B	36,259 ^A
I	77,019 ^A	19,425 ^B	3,575 ^B	0.100	3,013 ^B	27,087 ^A	43,111 ^A	28,991 ^B
E	75,237 ^{AB}	20,000 ^{AB}	4,204 ^A	0.109	3,595 ^A	24,176 ^B	41,068 ^B	34,261 ^A
<i>Effetto prelievo (P)</i>								
I	73,629 ^B	21,278 ^{AB}	5,087 ^A	0,105 ^{AB}	4,396 ^A	23,853 ^{AB}	39,700 ^B	35,459 ^{AB}
II	73,969 ^B	21,025 ^{AB}	5,006 ^A	0,085 ^B	4,447 ^A	25,272 ^{AB}	40,107 ^B	33,868 ^B
III	78,335 ^A	18,297 ^C	3,417 ^C	0,112 ^{AB}	2,966 ^B	26,624 ^A	42,345 ^{AB}	30,224 ^C
IV	73,552 ^B	22,802 ^A	4,270 ^B	0,143 ^A	3,513 ^B	22,055 ^B	39,862 ^B	37,841 ^A
V	78,205 ^A	19,350 ^{BC}	2,733 ^C	0,072 ^B	2,184 ^C	27,307 ^A	43,715 ^A	28,461 ^C
<i>Significatività</i>								
Gruppo	**	**	**	NS	**	**	**	**
Prel	**	**	**	**	**	**	**	**
Gruppo*Prel	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**
SEM	3.036	2.590	0.766	0.051	0.725	3.992	3.537	3.674

A, B e **: P < 0.01; a, b e *: P < 0.05; NS: non-significativo

Per quanto riguarda i valori di CLA (tab. 7), il latte prodotto dagli animali allevati al pascolo ha fatto registrare percentuali dei singoli isomeri (*cis*-9, *trans*-11; *trans*-10, *cis*-12; *cis*-9, *trans*-11) e dei CLA totali più alte rispetto a quello del gruppo allevato in stalla. Le differenze sono tuttavia risultate significative soltanto tra il gruppo B e I, fatta eccezione per l'acido rumenico (*cis*-9, *trans*-11 CLA), per il quale le differenze non hanno in ogni caso raggiunto significatività statistica.

L'effetto prelievo ha mostrato significatività statistica ($P < 0.01$) per le percentuali di CLA *cis*-9, *trans*-11, di CLA *trans*-12, *cis*-10 e del totale dei CLA. Anche in questo caso non vi è stato un comportamento regolare delle percentuali rispetto ai mesi di lattazione.

Tab. 7 Contenuto di CLA del latte

	CLA c9t11	CLA t10c12	CLA c9c11	tot CLA
	(% totale acidi grassi)			
	Effetto gruppo (G)			
B	0.486	0,031 ^A	0.015 ^a	0.532 ^a
I	0.427	0,024 ^B	0.011 ^b	0.461 ^b
E	0.459	0,028 ^{AB}	0.013 ^{ab}	0.500 ^{ab}
	Effetto prelievo (P)			
I	0,537 ^{AB}	0,034 ^A	0.015	0,586 ^A
II	0,430 ^C	0,032 ^A	0.011	0,473 ^B
III	0,308 ^D	0,021 ^B	0.012	0,340 ^C
IV	0,568 ^A	0,029 ^A	0.017	0,613 ^A
V	0,445 ^{BC}	0,020 ^B	0.012	0,477 ^B
	Significatività			
gruppo	NS	**	*	*
prel	**	**	NS	**
gruppo*prel	**	*	NS	**
SEM	0.180	0.007	0.007	0.113

A, B e **: $P < 0.01$; a, b e *: $P < 0.05$; NS: non-significativo

L'interazione fra gli effetti di gruppo e prelievo è stata significativa per gli isomeri *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 e per il totale.

L'impiego del pascolo ha quindi influenzato il contenuto in CLA del latte; in ogni caso, infatti, i valori meno favorevoli sono stati registrati per i soggetti allevati in stalla. I nostri risultati sono 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 sulla bufala. In particolare questi ultimi autori rilevarono che, nel latte degli animali allevati al pascolo, oltre ad un significativo aumento della concentrazione di CLA, diminuivano gli acidi grassi con attività aterogenica e trombogenica (miristico, palmitico e palmitoleico) mentre si incrementavano i livelli di PUFA, soprattutto acido linoleico e linolenico. Al contrario, Jahreis *et al.* (1999) non osservarono differenze tra i contenuti in CLA nel latte di capre allevate al pascolo o in stalla.

Le concentrazioni più elevate di CLA riscontrate nel latte degli animali allevati al pascolo sono probabilmente da imputarsi al fatto che la somministrazione di quest'ultimo, come riportato da Tsiplakou *et al.* (2006) modifica l'ambiente ruminale, limitando la conversione del trans C18:1 in C18:0. Nel nostro caso, inoltre, la minore concentrazione di CLA ritrovata nel latte degli animali del gruppo I, alimentati con fieno di medica come base foraggera, può essere attribuita alla perdita di precursori durante il processo di fienaggione (Aii *et al.*, 1988). Le maggiori concentrazioni di CLA riscontrate nel latte del gruppo B anche nel

confronto con il gruppo E, sarebbero da imputarsi alla presenza del lino (materia prima ricca in acido linoleico, precursore dei CLA) tra gli ingredienti del mangime concentrato biologico.

Conclusioni

I risultati ottenuti in questa prima indagine sperimentale portano ad esprimere le seguenti considerazioni:

- l'impiego del pascolo non ha penalizzato la produzione di latte che, al contrario, è risultata praticamente sovrapponibile a quella degli animali stabulati per tutto il periodo della prova. Questo dato appare molto interessante se si considera che le diete dei tre gruppi erano molto simili in termini di apporti energetici e proteici, laddove ben diverso era il dispendio energetico per gli animali che usufruivano del pascolo in aree montane caratterizzate da forte pendenza. Va d'altro canto ricordato che gli animali oggetto della sperimentazione appartenevano al tipo genetico Cilentana, da secoli adattatosi all'allevamento su terreni marginali; è pertanto molto probabile che impiegando razze selezionate le performances produttive sarebbero risultate a favore degli soggetti allevati in stalla;

- il contenuto in grasso del latte è risultato significativamente più elevato nei gruppi allevati al pascolo, cosa particolarmente interessante se si considera che il latte di capra viene destinato quasi esclusivamente alla caseificazione. L'aver rilevato, inoltre, nell'ambito della caratterizzazione acidica del grasso del latte, un significativo incremento di alcuni acidi grassi poliinsaturi e dei contenuti di CLA rappresentano una ulteriore

conferma dell'effetto positivo esplicito dal pascolo sulle caratteristiche del latte;

- la composizione acidica e i contenuti di CLA del latte degli animali allevati con metodo biologico, risultati più favorevoli anche nei confronti dell'altro gruppo allevato al pascolo, sono probabilmente da imputarsi alla presenza del lino tra gli ingredienti del mangime concentrato.

2° CONTRIBUTO SPERIMENTALE

Materiali e metodi

L'indagine è stata effettuata presso un'azienda agrozootecnica, sita in località Sant'Angelo in Theodice, frazione di Cassino (Frosinone), dove vengono allevate 150 bufale di razza Mediterranea Italiana.

Per la prova sono state utilizzate 40 soggetti pluripari (PV: kg 650 \pm 12) che subito dopo il parto sono stati suddivisi equamente in due gruppi in funzione dell'ordine di parto e della produzione lattea ottenuta nella precedente lattazione. I due gruppi hanno ricevuto per tutta la durata della prova (120 d) razioni isoenergetiche ed isoproteiche (0.89 UFL/kg SS e 15.9 % PG/SS). Le razioni erano costituite da fieno di erba medica (4 kg t.q), un mangime concentrato del commercio (7 kg t.q; PG: 22% s.s.), un supplemento minerale-vitaminico e si differenziavano per la presenza di insilato di mais (*Zea mais*: 18.0 kg t.q.) o di sorgo (*Sorghum vulgare*: 23.0 kg t.q.), per il gruppo M e S, rispettivamente.

Campioni dei due insilati sono stati raccolti a cadenza settimanale ed sottoposti ad analisi della della composizione chimica (AOAC, 2000; Van Soest *et al.*, 1991). La produzione individuale di latte è stata registrata a partire da 30 giorni postpartum a cadenza mensile, quando campioni rappresentativi delle due mungiture giornaliere sono stati raccolti, miscelati e analizzati usando un analizzatore ad infrarossi opportunamente tarato per latte di bufala per la determinazione dei contenuti in grasso, proteine e lattosio (Milko Scan 133B, Foss Matic, Hillerod, Denmark).

Si è provveduto, inoltre a determinare il profilo acidico del grasso dei due insilati e del latte. L'estrazione del grasso dagli insilati è stata effettuata con una soluzione di cloroformio/metanolo (2/1 v/v) come indicato da Folch *et al.* (1957). Mentre per determinare il profilo acidico del latte la separazione è stata effettuata, utilizzando una miscela di esano-isopropanolo (3/2 v/v) come descritto da Hara e Radin (1978). In entrambi i casi gli acidi grassi 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 delle serie FOCUS, fornito di detector a ionizzazione di fiamma (ThermoElectron Corporation, Rodano -Milano- Italia) attraverso una colonna capillare (CP-SIL 88 fused 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: 75°C per 2 min \rightarrow 5°C/min \rightarrow 170°C per 40 min \rightarrow 5°C/min \rightarrow 220°C per 24 min. Le temperature di iniettore e detector sono state impostate a 270°C. La pressione del gas di trasporto (elio) è stato di 180 kPa.

I flussi degli altri gas sono riportati di seguito:

- idrogeno 30 ml/min;
- aria 350 ml/min;
- gas make-up (azoto) 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), così composta: C4:0 (butirrico), C6:0 (caproico), C8:0 (caprilico), C10:0 (caprico), C11:0 (undecanoico), C12:0 (laurico), C13:0 (tridecanoico), C14:0 (miristica), C14:1 (miristoleico), C15:0 (pentadecanoico), C15:1 (pentadecanoico *cis*-10), C16:0 (palmitico), C16:1 (palmitoleico), C17:0 (eptadecanoico), C17:1 (eptadecanoico *cis*-10), C18:0 (stearico), C18:1 n-9 *trans* (elaidico), C18:1 n-9 *cis* (oleico), C18:2 n-6 *trans* (linolelaidico), C18:2 n-6 *cis* (linoleico), C20:0 (arachidonico), C18:3 n-6 (γ -linolenico), C20:1 (eicosanoico), C18:3 n-3 (linolenico), C21:0 (eneicosanoico), C20:2 (eicosadienoico), C22:0 (beenico), C20:3 n-6 (eicosatrienoico), C22:1 n-9 (erucico), C20:3 n-3 (eicosatrienoico), C20:4 n-6 (eicosatetraenoico), C23:0 (tricosanoico), C22:2 *cis*-13 (docosadienoico), C24:0 (lignocerico), C20:5 n-3 (eicosapentanoico), C24:1 (nervonico), C22:6 n-6 (docosaesapentanoico).

L'identificazione dei diversi isomeri del CLA del latte 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).

Le classi di acidi grassi sono state formate nel seguente modo:

SCFA → C4-C12

MCFA → C14-C16:1

LCFA → >C18

n-3 → C18:3 n3

C20:3 n-3

C20:5

C22:6

n-6 → C18:2 *cis*

C18:2 *trans*

C18:3 n-6

C20:2

C20:3 n-6

C20:4

Analisi statistica

I dati quanti-qualitativi della produzione latte sono stati sottoposti ad analisi della varianza usando la procedura GLM (General Linear Model) del SAS (2000), secondo il seguente modello:

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

dove:

y_{ijk} = singola osservazione;

μ = media generale;

G_i = effetto gruppo ($i = 1, 2$);

P_j = effetto mese di mungitura ($j = 1, \dots, 4$);

$G_i \times P_{ij}$ = interazione gruppo x mese di mungitura;

ε_{ijk} = errore.

Il confronto fra le medie è stato effettuato mediante Tukey test (SAS, 2000).

Risultati e discussione

Composizione chimica e valore nutritivo degli insilati

In tabella 8 si riportano i valori relativi alla composizione chimica e al valore nutritivo degli insilati di sorgo e di mais.

La composizione chimica di entrambi i foraggi è risultata in linea con quanto riportato in letteratura per insilati di media qualità, in particolare per il mais; da sottolineare che l'insilato di sorgo, pur mostrando contenuti di NDF e ADF più elevati dell'insilato di mais, ha fatto registrare minore presenza di lignina (ADL). Il valore nutritivo è risultato pari a 0.73 e 0.70 UFL/kg ss, rispettivamente per l'insilato di mais e per quello di sorgo.

Tab. 8. Composizione chimica (% s.s.) e valore nutritivo degli insilati

	SS	PG	EE	NDF	ADF	ADL	Cen.	UFL/kg ss
Mais	28.2	8.6	3.4	56.1	36.2	4.3	8.8	0.73
Sorgo	23.0	7.9	3.3	58.6	40.7	3.6	8.7	0.70

Composizione acidica degli insilati

In tabella 9 vengono riportati, per entrambi gli insilati oggetto della prova, soltanto gli acidi grassi più rappresentativi, espressi come percentuale del totale degli acidi grassi.

Mentre le percentuali di acido palmitico (C16:0) e stearico (C18:0) sono risultate quasi sovrapponibili tra i due insilati, quello di mais ha fatto registrare valori superiori di acido oleico (C18:1: 29.2% vs 12.8%) linoleico (C18:2: 35.6% vs 30.4%) e linolenico (C18:3: 5.2% vs 6.2%). I valori da noi rilevati per l'insilato di mais non si discostano da quanto riportato da altri autori (Morand-Fehr e Tran, 2001), mentre non è stato possibile confrontare i dati relativi all'insilato di sorgo, per la mancanza di altre fonti bibliografiche in letteratura.

Tab.9. Composizione acidica (% acidi grassi totali) degli insilati

	Sorgo	Mais
C16:0	20.4	21.8
C18:0	2.7	2.5
C18:1	12.8	29.2
C18:2	30.4	35.6
C18:3	3.2	6.2

Produzione e composizione chimica del latte

Il gruppo di bufale alimentate con l'insilato di sorgo (tabella 10) ha fatto registrare una produzione media di latte significativamente maggiore di quella del gruppo M (kg/d 9.9 vs 9.0; P<0.05). Anche le percentuali di grasso e di proteine sono risultate più elevate nel gruppo S, ma in questo caso le differenze non hanno raggiunto la significatività statistica.

Tab. 10 Produzione e composizione chimica del latte

	Produzione	Proteine	Grasso	Lattosio
	<i>kg/d</i>		<i>%</i>	
<i>Effetto gruppo</i>				
M	9.0 b	4.60	8.30	5.01
S	9.9 a	4.63	8.49	5.00
<i>Effetto prelievo</i>				
I	9.3 B	4.45	7.59 ^B	4.88
II	11.1 A	4.31	8.54 ^A	5.01
III	9.3 B	4.31	8.46 ^A	5.00
IV	7.7 C	4.50	8.90 ^A	5.02
<i>Significatività</i>				
Gruppo	*	NS	NS	NS
Prelievo	**	NS	**	NS
Gruppo*prel	NS	NS	NS	NS
SEM	1.47	0.14	0.19	0.12

A, B e **: P < 0.01; a,b e *: P < 0.05; NS: non-significativo

La maggiore produzione di latte rilevata per il gruppo S, potrebbe essere ascritta alla minore percentuale di lignina presente nell'insilato di sorgo, cosa che si riflette positivamente sulla digeribilità dell'NDF.

La produzione di latte è risultata significativamente diversa in funzione del prelievo; il picco massimo è stato registrato a 60 giorni di lattazione, quello minimo a 120 giorni postpartum. Le percentuali di proteine e di grasso del latte durante l'intera prova hanno mostrato andamento fisiologico per la specie bufalina, facendo registrare differenze significative solo per il grasso, in particolare tra il primo prelievo e quelli successivi.

Composizione acidica e contenuto di CLA del latte

Gli esteri metilici degli acidi grassi identificati in questa prova, con i relativi tempi di ritenzione sono di seguito riportati:

Acidi grassi	Tempi di ritenzione (min)
C4:0	14.24
C6:0	17.27
C8:0	21.42
C10:0	25.89
C11:0	28.18
C12:0	30.43
C13:0	32.97
C14:0	36.00
C14:1	38.25
C15:0	39.34
C16:0	44.23
C16:1	46.66
C17:0	49.14
C17:1	52.56
C18:0	57.19
C18:1 n9t	59.80
C18:1 n9c	61.18
C18:2n6t	63.55
C18:2 n6c	66.37
C20:0	70.19
C18:3 n6	71.09
CLA c9,t11	71.96
C20:1	72.45
CLA t10,c12	72.60
CLA c9,c11	72.96
CLA t9,t11	73.73
C18:3 n3	74.57
C21:0	75.91
C20:2	78.21
C22:0	78.63
C20:3 n6	79.87
C22:1 n9	79.91

C20:3 n3	80.70
C20:4 n6	82.43
C23:0	83.81
C24:0	84.18
C20:5 n3	86.34
C24:1	88.69
C22:6 n3	95.15

In tab. 11 si riportano i valori relativi alle percentuali dei principali acidi grassi (% sul totale degli acidi grassi).

Le uniche differenze significative rilevate in funzione del tipo di foraggio impiegato nell'alimentazione delle bufale sono state quelle relative alle percentuali di C18:2 n-6 e C18:3 n-6, entrambe risultate maggiori nel latte dei soggetti appartenenti al gruppo M (C18:2 n-6: 2.641 % vs 2.250%; $P < 0.05$; C18:3 n-6: 0.609% vs 0.449%; $P < 0.01$). Per quanto riguarda invece l'effetto prelievo, l'unica differenza significativa è stata riscontrata nel caso del C18:3 n-6 che è risultato più elevato nel III prelievo. L'interazione gruppo-prelievo non ha avuto effetto statisticamente significativo su nessuno degli acidi grassi in tabella. In merito a questi risultati è da sottolineare che entrambi gli acidi grassi rilevati in misura significativamente superiore nel latte degli animali alimentati con insilato di mais, erano stati rilevati in misura maggiore in quest'ultimo rispetto a l'insilato di sorgo (tabella 19).

Tab. 11 Composizione acidica del latte

	C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3 n6	C18:3 n3
(% totale acidi grassi)													
<i>effetto gruppo (G)</i>													
S	4.020	1.824	0.914	1.892	2.563	11.208	32.178	1.399	13.446	23.870	2,250 ^b	0,449 ^B	0.082
M	3.687	1.733	0.909	1.942	2.613	11.322	32.917	1.405	12.981	23.974	2,641 ^a	0,609 ^A	0.080
<i>effetto prelievo (P)</i>													
I	3.899	1.788	0.919	1.941	2.647	11.458	32.650	1.250	13.205	22.301	2.500	0,460 ^B	0.063
II	3.924	1.767	0.902	1.878	2.502	10.908	31.149	1.278	13.319	22.650	2.435	0,589 ^{AB}	0.090
III	3.738	1.695	0.864	1.811	2.473	11.375	34.218	1.520	12.917	26.053	2.627	0,648 ^A	0.088
IV	3.837	1.856	0.959	2.035	2.720	11.269	32.000	1.539	13.383	24.975	2.251	0,442 ^B	0.085
<i>significatività</i>													
gruppo	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	**	NS
prel	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS
gruppo*prel	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SEM	1.087	0.406	0.225	0.502	0.584	1.624	6.159	0.308	1.561	4.063	0.402	0.072	0.023

A, B e **: P < 0.01; a,b e *: P < 0.05; NS: non-significativo

Le classi in cui gli acidi grassi sono suddivise in base alla presenza o meno di doppi legami (SFA, MUFA, PUFA), alla posizione del primo doppio legame (n-3, n-6) e alla lunghezza della catena carboniosa (SCFA, MCFA, LCFA) sono riportate come percentuale sul totale degli acidi grassi, in tabella 12.

Solo la percentuale di PUFA è risultata significativamente maggiore nel latte del gruppo alimentato con l'insilato di mais (4.55% vs 3.995; $P < 0.05$) anche i valori di n-6 e LCFA sono risultati più elevati in questo gruppo, ma in questi ultimi due casi le differenze non hanno raggiunto la significatività statistica. Il prelievo ha avuto un effetto significativo solo sulle percentuali di n-3 e n-6 che hanno raggiunto i valori più elevati al II prelievo.

Tab. 12 Classi di acidi grassi

	SFA	MUFA	PUFA	n-3	n-6	SCFA	MCFA	LCFA
<i>(% totale acidi grassi)</i>								
<i>Effetto gruppo (G)</i>								
S	69.097	26.910	3,993 ^b	0.213	3.086	10.477	46.443	41.867
M	68.305	26.512	4,553 ^a	0.221	4.266	10.904	45.763	42.399
<i>Effetto prelievo (P)</i>								
I	71.114	24.724	4.162	0.164 ^b	3,309 ^b	11.204	47.697	39.911
II	69.110	25.019	4.471	0.250 ^a	4,839 ^a	10.996	45.780	42.053
III	66.381	29.154	4.465	0.234 ^{ab}	3,744 ^{ab}	10.600	44.725	44.168
IV	67.639	28.304	4.056	0.233 ^{ab}	3,108 ^b	9.963	45.823	42.897
<i>Significatività</i>								
gruppo	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS
prel	NS	NS	NS	*	*	NS	NS	NS
gruppo*prel	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SEM	3.485	2.638	0.467	0.043	1.504	1.465	3.267	3.380

A, B e **: $P < 0.01$; a,b e *: $P < 0.05$; NS: non-significativo

In tabella 13 si riportano i valori di CLA totali e dei quattro isomeri identificati (*cis-9, trans-11; trans-10, cis-12; cis-9, cis-11; trans-9, trans-11*).

Il latte prodotto dagli animali del gruppo M ha fatto registrare valori di CLA *trans-10, cis-12, cis-9,cis-11* e CLA totali significativamente più elevati di quelli ottenuti nel caso del gruppo S. Anche la percentuale di acido rumenico (*cis-9, trans-11*) sul totale degli acidi grassi è risultata maggiore nel gruppo M, ma le differenze non sono state significative. Né il mese di prelievo né l'interazione fra gruppo e prelievo hanno avuto alcun effetto significativo.

Tab. 13 Contenuto di CLA del latte

	CLA c9t11	CLA t10c12	CLA c9c11	CLA t9t11	tot CLA
<i>(% totale acidi grassi)</i>					
<i>effetto gruppo (G)</i>					
S	0.582	0,051 ^b	0,026 ^B	0.014	0,673 ^b
M	0.678	0,061 ^a	0,053 ^A	0.011	0,803 ^a
<i>effetto prelievo (P)</i>					
I	0.585	0.055	0.036	0.012	0.689
II	0.666	0.054	0.050	0.013	0.783
III	0.709	0.059	0.041	0.012	0.820
IV	0.575	0.056	0.035	0.012	0.679
<i>Significatività</i>					
gruppo	NS	*	**	NS	*
prel	NS	NS	NS	NS	NS
gruppo*prel	NS	NS	NS	NS	NS
SEM	0.115	0.009	0.010	0.003	0.117

A, B e **: P < 0.01; a,b e *: P < 0.05; NS: non-significativo

La maggiore concentrazione di CLA registrata nel latte degli animali alimentati con insilato di mais sarebbe da ascrivere alla più elevata

concentrazione degli acidi linoleico e linolenico rilevata in questo foraggio, rispetto all'insilato di sorgo, come illustrato in tabella 9. Questa ipotesi trova conforto nei risultati riportati da Secchiari *et al.* (2005) in prove effettuate su bufale in lattazione; questi autori, infatti, trovarono nel latte degli animali allevati al pascolo (ricco di acidi grassi insaturi), oltre ad un incremento dei livelli di PUFA, aumento significativo della concentrazione di CLA. Anche Cutrignelli *et al.* (2005) registrarono aumento significativo del contenuto di CLA nel latte di bufale alimentate con una materia prima ricca in acido linoleico.

Ai nostri risultati, infine, potrebbe anche aver contribuito il contenuto di acido oleico che, come illustrato in tabella 9, è risultato superiore nell'insilato di mais rispetto a quello di sorgo. Mosley *et al.* (2002), infatti, dimostrarono *in vitro* che anche l'acido oleico, durante la sua bioidrogenazione ad acido stearico, porta alla formazione di diversi *trans* isomeri del C18:1, incluso il *trans* vaccenico. Ciò suggerirebbe che la somministrazione di alimenti ricchi di acido oleico porterebbe ad aumentare il contenuto di CLA e TVA del latte.

Conclusioni

I risultati della nostra indagine, volta a valutare la possibilità di sostituire nell'alimentazione delle bufale da latte l'insilato di mais con quello di sorgo appaiono confortanti dal punto di vista produttivo: Infatti, l'impiego del sorgo ha fatto registrare performance significativamente superiori senza che ciò comportasse una penalizzazione della composizione chimica del latte, in termini di concentrazione di proteine e di grassi.

Per quanto riguarda, invece, le caratteristiche del grasso, con l'impiego di insilato di mais sono stati rilevati contenuti di PUFA e di CLA totali significativamente maggiori, mentre non sono state rilevate differenze per i contenuti degli acidi grassi saturi, in particolare per quelli aterogenici e trombogenici, né degli acidi grassi monoinsaturi. Pertanto; dal punto di vista dietetico-nutrizionale, risulterebbe avere una composizione acidica più favorevole il latte fornito dagli animali alimentati con insilato di mais.

3° CONTRIBUTO SPERIMENTALE

Effetti dei CLA sulla produzione di citochine infiammatorie

Introduzione

La prima risposta del sistema immunitario nei confronti di un agente estraneo, quale ad esempio i lipopolisaccaridi (LPS) della parete cellulare esterna di un batterio Gram-negativo, è l'attivazione dei monociti circolanti nel sangue o dei macrofagi residenti nei tessuti. I monociti hanno un ruolo fondamentale durante la fase acuta della risposta immunitaria; essi, infatti, quando essi vengono attivati dalla presenza di un agente estraneo rilasciano diverse citochine, quali il *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), l'interleuchina-1 (IL-1) e l'interleuchina-6 (IL-6), che sono i principali promotori della risposta infiammatoria del sistema immunitario. Esse, infatti, possono anche attivare le fosfolipasi A₂ o C, le quali inducono il rilascio dei PUFA dai fosfolipidi di membrana e la conseguente formazione di eicosanoidi.

Nonostante il sistema immunitario giochi un ruolo decisivo nella difesa dell'organismo, alcune sue azioni possono danneggiarlo in vari modi. Ad esempio, nel caso di prolungate infezioni che possono provocare perdite di tessuto adiposo e/o muscolare e ridurre le riserve corporee di micronutrienti, le molecole ossidanti prodotte dalla risposta infiammatoria possono danneggiare i tessuti sani.

L'eccessiva produzione di citochine infiammatorie è causa di elevata morbilità e mortalità in un vasto numero di patologie infettive, quali sepsi, meningiti e malaria cerebrale.

Il sistema immunitario è anche responsabile di danni all'organismo in una vasta gamma di disturbi infiammatori, nei quali la risposta dell'organismo non è dovuta all'invasione da parte di agente estraneo. Tali disturbi includono l'artrite reumatoide, l'asma, o disturbi infiammatori del tratto gastrointestinale, la fibrosi cistica (Grimble, 1996). Inoltre, alcuni di queste condizioni infiammatorie (gastriti, esofagiti ed epatiti), che possono essere causate sia da agenti infettivi sia da agenti fisici e chimici, quali calore, acidi, fumo di sigaretta e corpi estranei, sono considerate fattori predisponenti lo sviluppo di tumore (Ohshima e Bartsch, 1994; Ohshima *et al.*, 2003).

Anche le reazioni autoimmuni e infiammatorie, come coliti ulcerose e pancreatiti, sono associate a rischio di cancro. Nel 2000 è stato stimato che il 18% dei circa 10 milioni di nuovi casi di cancro erano attribuibili a reazioni infiammatorie dovute ad infezioni croniche causate da agenti infettivi (Parkin, 2001); tale percentuale è ancora più elevata se si includono i disturbi infiammatori cronici indotti da fattori chimici e fisici o da cause sconosciute.

Durante il processo di cancerogenesi, le cellule infiammatorie che infiltrano il tumore producono diverse citochine. Alcuni autori hanno suggerito che le citochine pro-infiammatorie (TNF-alfa, IL-1, IL-6 e interferoni) contribuiscono alla carcinogenesi sia influenzando la sopravvivenza, la crescita, la mutazione, la proliferazione, la differenziazione e la metastatizzazione del processo tumorale e delle cellule stromali sia regolando l'angiogenesi (Balkwill e Mantovani, 2001; Coussens e Werb, 2002).

Alla luce di quanto detto, questa prova è stata finalizzata alla valutazione degli effetti dei CLA e di altri acidi grassi sulla produzione di citochine infiammatorie da parte di monociti THP-1.

Materiali e metodi

L'indagine è stata effettuata presso la *School of Life Science, The Robert Gordon University, Aberdeen, Scozia*.

Linea cellulare

Linee cellulari di monociti THP-1, derivanti da leucemia acuta monocitaria umana, sono state coltivate in un terreno RPMI 1640 (Gibco), contenente L-glutamina, 25 mM di tampone HEPES (acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico), supplementato con 50 ml di siero fetale bovino (FCS) e 5 ml di penicillina/streptomina. Le cellule sono state incubate a 37°C in atmosfera controllata (5% di CO₂).

Riattivazione delle cellule

La vial contenente le cellule è stata recuperata dal bidone di azoto liquido e incubata a 37°C per 10 minuti. Un ml di cellule in sospensione è stato addizionato con 10 ml di terreno di coltura in una Falcon, il tutto è stato centrifugato a 400g per 8 minuti, quindi, si è provveduto ad eliminare il supernatante. Il passaggio è stato ripetuto una seconda volta al fine di eliminare l'eccesso di dimetilsolfossido (DMSO), un reagente crioprotettivo che viene aggiunto al momento del congelamento delle

cellule. Infine, le cellule sono state trasferite in una fiasca da 150 cm³ con 10 ml di terreno di coltura e incubate alle condizioni menzionate prima.

Coltivazione cellulare

Al fine di ottenere delle sottocolture, le cellule sono state coltivate in fiasche standard da 150 cm³ con circa 15 ml di terreno, a 37°C in atmosfera controllata (5% di CO₂).

Il terreno di coltura è stato sostituito ogni 2-3 giorni (in base alla velocità di crescita) secondo la seguente procedura: dopo aver trasferito le cellule in sospensione in provette Falcon, le fiasche sono state lavate con 10 ml di tampone salino fosfato (PBS), che veniva successivamente trasferito nella stessa Falcon. Il tutto è stato centrifugato a 1200 rpm per 5 minuti, in modo da far depositare le cellule sul fondo e eliminare tutti i residui di terreno di coltura. Le cellule sono quindi state risospese in 5 ml di terreno fresco e divise in 2 nuove fiasche contenenti 14-15 ml di terreno, al fine di ottenere delle sottocolture.

Una volta raggiunto il numero di cellule necessario per l'esperimento, 2 ml di sospensione cellulare, contenenti 1x10⁶ di cellule, sono stati trasferiti in piastre da 6 pozzetti e incubate per 24 ore con diverse soluzioni di acidi grassi in etanolo alla concentrazione di 25 µM: CLA *cis*-9, *trans*-11, CLA *trans*-10, *cis*-12, mix CLA 50:50, acido linoleico (LA), acido docosaesanoico (DHA), acido eicosapentanoico (EPA), acido nonadienoico coniugato (CNA), acido linolenico (LNA). La supplementazione è stata effettuata in tre repliche, si è provveduto inoltre a creare 6 pozzetti controllo in cui è stato aggiunto etanolo puro. Le cellule sono state, successivamente,

stimolate, attraverso l'aggiunta a tutti i pozzetti (tranne 3 di controllo_C) di 1 µg/ml di lipolisaccaridi (LPS) e lasciate in incubatore per ulteriori 24 ore.

Al termine della prova, il terreno di ogni pozzetto è stato raccolto in provette Falcon, centrifugato per allontanare le cellule e conservato in provette Eppendorf a -20°C. Successivamente, il terreno è stato utilizzato per le seguenti determinazioni: TNF- α , IL-1 e IL-6, mediante ELISA (Quantikine High Sensitivity ELISA, R&D System).

Analisi statistica

Tutti i risultati sono stati elaborati mediante analisi della varianza effettuata con SPSS (2007), secondo il modello:

$$y_{ijk} = \mu + A_i + \varepsilon_{ijk}$$

dove:

y_{ijk} = singola osservazione;

μ = media generale;

A_i = effetto dell'acido grasso ($i = 1, 2 \dots 8$);

ε_{ijk} = errore.

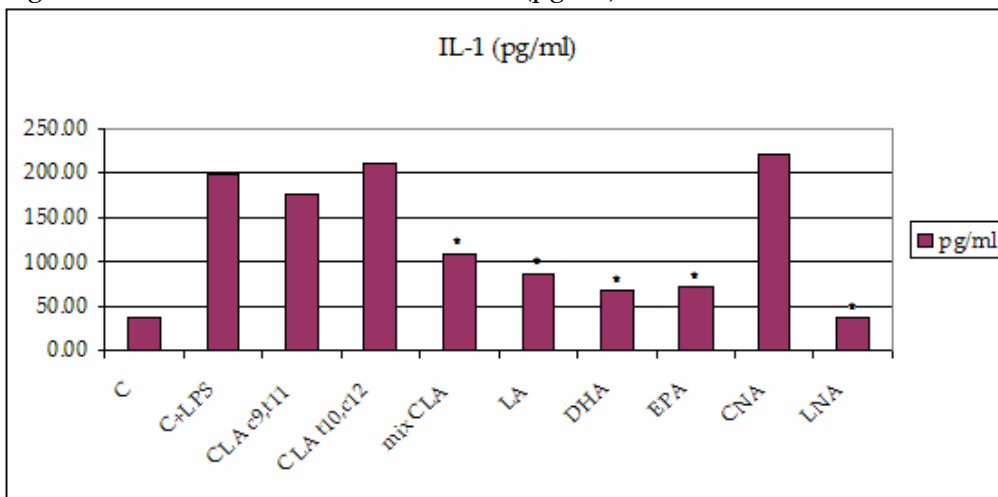
Risultati e discussione

Produzione di IL-1

In figura 4 sono riportate le concentrazioni (pg/ml) relative alla produzione di interleuchina-1 (IL-1) da parte di cellule controllo stimulate o non con LPS (C e C+LPS, rispettivamente) e cellule incubate con acidi grassi (CLA *cis*-9, *trans*-11, CLA *trans*-10, *cis*-12, mix CLA, LA, DHA, EPA, CNA, LNA) e stimulate con LPS.

La stimolazione delle cellule con i lipopolisaccaridi ha determinato una produzione di IL-1 più di 5 volte superiore a quella delle cellule C (35.88 e 198.88 pg/ml, rispettivamente). I singoli isomeri dei CLA (*cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12) non hanno mostrato alcun effetto significativo sulla produzione di IL-1, mentre la supplementazione della miscela di CLA ha provocato un dimezzamento della produzione, facendo raggiungere un valore di 106.25 pg/ml.

Fig. 4 Concentrazione di interleuchina-1 (pg/ml)



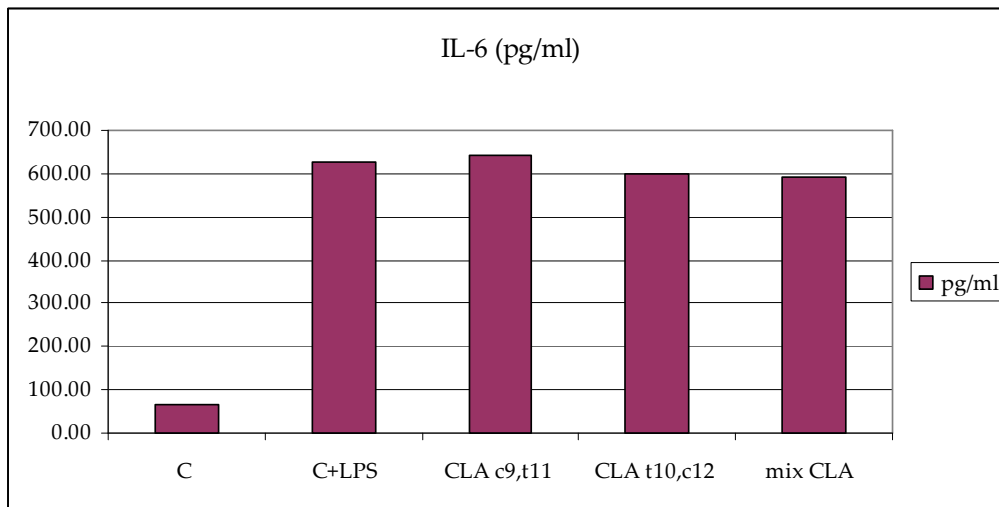
*: P<0.05

Anche l'acido linoleico (LA) e i tre acidi grassi della serie n-3 (DHA, EPA e LNA) hanno provocato una significativa riduzione della produzione di interleuchina-1. Questi risultati sono in accordo con quanto riportato da Zhao *et al.* (2005), dove una supplementazione con LA, DHA e LNA a differenti concentrazioni a cellule THP-1 stimulate con 1µg/ml di LPS aveva provocato una diminuzione significativa della produzione di IL-1

Produzione di IL-6

In figura 5. sono riportate le concentrazioni (pg/ml) relative alla produzione di interleuchina-6 (IL-6) da parte di cellule controllo stimulate o non con LPS (C e C+LPS, rispettivamente) e cellule incubate con acidi grassi (CLA *cis*-9, *trans*-11, CLA *trans*-10, *cis*-12, mix CLA) e stimulate con LPS.

Fig. 5 Concentrazione di interleuchina-6 (pg/ml)

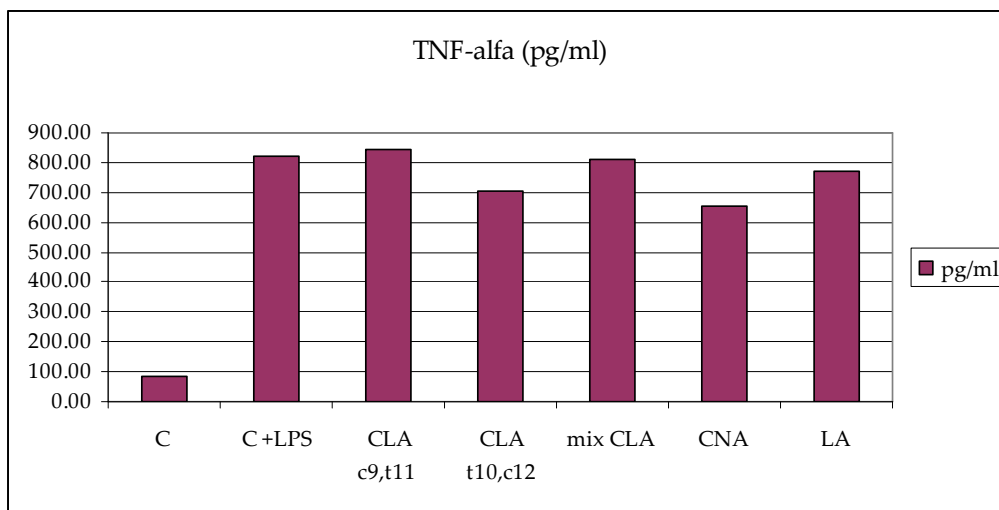


La stimolazione delle cellule con LPS ha determinato un notevole aumento della produzione di IL-6: da valori di 67,25 pg/ml delle cellule C a valori di 627,25 pg/ml delle cellule controllo stimulate con LPS. Nessuno acido grasso testato ha mostrato effetti significativi sulla produzione di interleuchina-6.

Produzione di TNF- α

Le concentrazioni (pg/ml) relative alla produzione di *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) da parte di cellule controllo stimulate o non con LPS (C e C+LPS, rispettivamente) e cellule incubate con acidi grassi (CLA *cis*-9, *trans*-11, CLA *trans*-10, *cis*-12, mix CLA) e stimulate con LPS, sono mostrate nella figura 6.

Fig. 6 Concentrazione di TNF- α (pg/ml)



La produzione di TNF- α è risultata fortemente influenzata dalla stimolazione (85,73 vs 823,23 pg/ml, C e C+LPS, rispettivamente). Le

cellule incubate con CLA *trans*-10, *cis*-12 e CNA hanno mostrato valori di TNF- α più bassi rispetto a quelle C+LPS (703,88 e 651,50 pg/ml, rispettivamente), mentre nessuno degli altri acidi grassi testati ha mostrato effetto significativo sulla produzione di tale fattore.

Questo contrasta con quanto riportato in letteratura in studi effettuati *in vivo* su topi da laboratorio, in cui è stato dimostrato che una miscela di isomeri di CLA è in grado di ridurre di circa il 50% i livelli serici di TNF- α rispetto al siero di topi alimentati con diete contenenti acido linoleico (Akahoshi *et al.*, 2002). Anche Yang e Cook (2003), in uno studio *in vitro* su linee cellulari di macrofagi, riscontrarono che la supplementazione con l'isomero *cis*-9, *trans*-11 CLA, limitava significativamente la produzione di TNF- α in seguito a stimolazione con LPS.

Conclusioni

Pur essendoci risultati contrastanti in bibliografia, non è stato riscontrato un forte effetto dei CLA sulla produzione di citochine infiammatorie da parte di monociti THP-1 stimolati con lipopolisaccaridi, ad eccezione della miscela di CLA che ha ridotto significativamente i livelli di IL-1. C'è anche da considerare che nessuno studio era ancora stato fatto sugli effetti dei CLA su cellule THP-1, per cui tali discordanze possono essere attribuite forse proprio all'utilizzo di cellule differenti nel caso del confronto con studi *in vitro*. Esistono, invece, diverse testimonianze dell'azione dei CLA sull'abbassamento dei livelli di citochine prodotte *in vivo*, e soprattutto di TNF- α , ma in questo caso il confronto risulta difficile a causa della complessità della risposta infiammatoria.

BIBLIOGRAFIA

A.O.A.C. 2000. Official methods of Analysis 17th Edition. *Association of Official Analytical Chemists*, Arlington, Virginia.

Akahoshi, A., Goto, Y., Muto, K., Miyazaki, T., Yamasaki, M., Nonaka, M. (2002) Dietary conjugated linoleic acid reduces body fats and cytokines levels in mice. *Biosci Biotechn Biochem* **66**, 916–20.

Akahoshi, A., Koba, K., Ichinose, F., Kaneko, M., Shimoda, A., Nonaka, K., Yamasaki, M., Iwata, T., Yamauchi, Y., Tsutsumi, K., Sugano, M. (2004) Dietary protein modulates the effect of CLA in lipid metabolism in rats. *Lipids* **39**, 25–30.

Aro, A., Mannisto, S., Salminen, I., Ovaskainen, M.L., Kataja, V., Uusitupa, M. (2000) Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Nutr Cancer* **38**, 151–7.

Azain, M.J., Hausman, D.B., Sisk, M.B., Flatt, W.P., Jewell, D.E., (2000). Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. *J Nutr* **130**, 1548 –54.

Baldwin, A.S. (2001) Series Introduction: The transcription factor NF- κ B and human disease *J Clin Invest* **107**, 3–6.

Balkwill, F., Mantovani, A. (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow. *Lancet* **357**, 539–545.

Bang, H.O., Dyerberg, J. (1973) The composition of food consumed by Greenlandic Eskimo. *Acta Med. Scand* **200**, 69-73.

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.

Banni, S., Angioni, S., Carta, G. (1999) Modificazioni nel metabolismo lipidico indotte dall'apporto alimentare dell'acido linoleico a dieni coniugati (CLA) in relazione alla sua attività anti-cancerogena. *Progress in Nutrition* **1**, 3-4, 38-48.

Banni, S., C.S.D. Heys, Wahle, K.W.J. (2003) Conjugated linoleic acid as anticancer nutrients: Studies in vivo and cellular mechanisms. In J. Sebedio, W.W. Christie and R. Adolf (ed) *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research* **vol. 2**, pp: 267-281. AOCS Press.

Barsuhn, K., Chester, S.T., Leedle, J.A.Z. (1988) In vitro detachment of bacteria from ruminal digesta by buffered sodium oleate solution. *Curr Microbiol* **16**, 337-341.

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.

Bauman, D.E., Griinari, J.M. (2003) Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Ann Rev Nutr* **23**, 203–227.

Belury, M.A. (2002) Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action. *Ann Rev Nutr* **22**, 505-531.

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.

Belury, M.A., Moya-Camarena, S.Y., Shi, L.L., Lu, M., Leesnitzer, L.M., Blanchard, S.M. (2002) Conjugated linoleic acid activates peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma. *Nutrition Res* **22**, 817-824.

Belury, M.A., Vanden Heuvel, J.P. (1997) Protection against cancer and heart disease by the dietary fat, conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action (Invited review) *Nutr Dis Update J* **1**, 58-63.

Belury, M.A., Vanden Heuvel, J.P. (1999) In: 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.

Bergamo, P., Fedele, E., Iannibeli, L., Marzillo, G. (2003) Fat soluble vitamin contents & fatty acid composition in organic and conventional *Italian dairy products*. *Food Chemistry* **82**, 625-631.

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.

Bickerstaffe, R., Annison, E.F. (1970) The desaturase activity of goat and sow mammary tissue. *Comp Biochem Physiol* **35**, 653-665.

Bickerstaffe, R., Johnson, A. R. (1972) The effect of intravenous infusions of sterculic acid on milk fat synthesis. *Br J Nutr* **27**, 561-570.

Bingham, S.A., Luben, R., Welch, A., Wareham, N., Khaw, K.T., Day, N. (2003) Are imprecise methods obscuring a relationship between fat and cancer. *Lancet* **326**, 212-214.

Bittante, G., Andrighetto, I., Ramanzin, M. (1993) *Tecniche di produzione animale*. Liviana Editrice.

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.

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.

Bretoni, G., Travisi, E. (1999) Acidi grassi polinsaturi ω -3 e nutrizione animale. *Progress in Nutrition* **1**, 3-4, 19-29.

Bykerstaffe, R.D., Noakes, D.E., Annison, E.F. (1972) Quantitative aspects of fatty acid biohydrogenation, absorption and transfer into milk fat in the lactating goat, with the special reference to the cis and trans isomers of octadecenoate and linoleate. *Biochemistry Journal* **130**, 607-617.

Cabiddu, A., Decandia, M., Molle, G., Piredda, G., Pirisi, A., Delogu, A., Addis, M. (2001) Effect of diet on conjugated linoleic acid (CLA) content of milk and sheep cheese. *Proc. 14th Natl. Congr. Scientific Association of Animal Production*, Firenze, Italy. 111–113.

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.

Cesano, A., Visonneau, S., Scimeca, J.A., Kritchevsky, D., Santoli, D. (1998) Opposite effects of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice. *Anticancer Res* **18**, 833-8.

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., Lavillonniere, F., Maillard, V., Giraudeau, B., Jourdan, M.L., Sebedio, J.L., Bougnoux, P. (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) Rumen fermentation in vitro as influenced by long chain fatty acids. *Journal of Dairy Science* **67**, 1439-1444.

Chang, J.H.P., Lunt, D.K., Smith S.B. (1992) Fatty acid composition and fatty acid elongase and stearoyl-CoA desaturase activities in tissues of steers fed high oleate sunflower seed. *J Nutr* **122**, 2074-2080.

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.

Cho, H.J., Kim, W.K., Kim, E.J, Jung, K.C., Park, S., Lee, H.S., Tyner, A.L., Park, J.H.Y. (2003) Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation and ErbB3 signaling in HT-29 human colon cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**, 996–1005.

Chouinard P.Y.; Corneau L.; Barbano D.M.; Metzger L.E.; Bauman D.E. 1999. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. *J. Nutr.* **129**,1579-1584.

Chouinard, P.Y., Corneau, L., Bauman, D.E., Butler, W.R., Chilliard, Y., Drackley, J.K. (1998). Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different sources of dietary fat. *J Dairy Sci* **81** (suppl. 1): 223 (Abstr.).

Christie, W.W. 1982. A simple procedure of rapid transmethylolation of glycerolipids and cholesteryl esters. *J. Lipid Res.* **23**,1072-1075.

Cohen, L.A., Zhao, Z., Pittman, B., Scimeca, J. (2003) Effect of soy protein isolate and conjugated linoleic acid on the growth of Dunning R-3327-AT-1 rat prostate tumors. *Prostate* **54**,169–80.

Collomb, M., Schmid, A., Sieber, R., Wechsler, D., Ryhänen, E.-L. (2006). Conjugated linoleic acids in milk fat: variation and physiological effects. *International Dairy Journal* **16**, 1347–1361.

Cook, M.E., Butz, D., Li, G., Pariza, M., Whigham, L., Yang, M. (2003) Conjugated linoleic acid enhances immune responses but protects against the collateral damage of immune events. In: J. Sebedio, W.W. Christie, R. Adolf, eds. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. vol. 2. AOCS Press Champaign, Ill. 283-291.

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 Δ^9 -desaturase and endogenous synthesis of CLA in lactating dairy cows. *J Anim Sci* **77**(Suppl. 1):118 (Abstr.).

Coussens, L.M., Werb, Z. (2002) Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860–867.

Crosby, A.J., Wahle, K.W.J. (1996) Modulation of glutathione peroxidase activity in human vascular endothelial cells by fatty acids and the cytokine interleukin-1 β . *Biochim Biophys Acta* **1303**, 187–92.

Cruz-Hernandez, C., Deng, Z., Zhou, J., Hill, A. R., Yurawecz, M. P., Delmonte, P., Mossoba, M.M, Dugan, M.E.R., 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 silver-ion liquid chromatography. *Journal of AOAC International* **87**, 545–562.

Cutrignelli, M.I., Zicarelli, F., D'Urso, S., Palladino, M., Infascelli, F., Di Palo, R. (2005) Employment of linessed (Omega-line®) in buffalo nutrition. Note II: characteristics of milk an mozzarella fat. 3° *Congresso Nazionale sull'allevamento del bufalo e 1st Buffalo Symposium of Europe and the Americas*, Paestum (Sa), 12-15 ottobre 2005, 175.

Davidson, J., Abul, H.T., Milton, A.S., Rotondo, D. (2001) Cytokines and cytokines inducers stimulate prostaglandin E₂ entry into the brain. *Pflugers Arch* **442**, 526–33.

Dawson, R.M.C., Hemington, N., Hazlewood, G.P. (1977) On the role of higher plant and microbial lipases in the ruminal hydrolysis of grass lipids. *Br J Nutr* **38**, 225-232.

Dawson, R.M.C., Kemp, P. (1970) Biohydrogenation of dietary fats in ruminants. In A. T. Phillipson (Ed.) *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant*. pp 504-518.

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.

Delerive, P., Fruchart, J.C., Staels, B. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol* **169**, 453-459.

Dinarello, C.A. (1999) Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect Dis* **179**, 294-304.

Dhiman, T.R., Anand, G.R., Satter, L.D., Pariza, M.W. (1999) Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *J Dairy Sci* **82**, 2146-2156.

Dhiman, T.R., Anand, G.R., Satter, L.D., Pariza, M. (1996). Conjugated linoleic acid content of milk and cheese from cows fed extruded oilseeds. *J Dairy Sci* **79**, 137.

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.

Durgam, V.R., Fernandes, G. (1997) The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on MCF-7 cells is related to estrogen response system. *Cancer Lett* **116**, 121–30.

Enoch, H.G., Catala, A., Strittmatter, P. (1976) Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. *J. Biol. Chem.* **251**, 5095-5103.

Fidanza, A., Fidanza, F., Chiuchiù, M.P., Verducci, G., Fruttini, D. (1999) Dietary studies on two rural Italian population groups of the Seven Countries Study. Trend of food and nutrient intake from 1960 to 1991. *European Journal of Clinical Nutrition* **53**, 854-860.

Fisher, S.M. (1995) Eicosanoids and tumor promotion. In H. Mukhtar, ed. *Skin Cancer: Mechanisms and Human Relevance*. CRC Press. Boca Raton Florida, USA. 129-143.

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.

Fritsche, J., Fritsche, S., Soloman, M.B., Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P., Morehouse, K., Kim Y. (2000) Quantitative determination of conjugated linoleic acid isomers in beef fat. *Eur. J Lipid Sci Tec* **102**, 667-672.

Fritsche, J., Rickert, R, Steinhart, H. (1999) Formation, contents, and estimation of daily intake of conjugated linoleic acid isomers and trans-fatty acids in foods. In: M.P Yurawecz, M.M. Mossobo, J.K.G. Kramer, M.W. Pariza, G.J. Nelson, eds. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research* **vol. 1**. AOCS Press Champaign, Ill. 378-396.

Fruchart, J-C., Duriez, P., Staels, B. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Current Opinion Lipidol* **10**, 245-7.

Gaullier, J.M., Halse, J., Høy, K, Kristiansen, K., Fagertun, H., Vik, H., Gudmundsen, O., (2005) Supplementation with conjugated linoleic acid for 24 months is well tolerated by and reduces body fat mass in healthy, overweight humans. *J Nutr* **135**, 778-84.

Gaullier, J.M., Halse, J., Høy, K., Kristiansen, K., Fagertun, H., Vik, H., Gudmundsen, O. (2004) Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans. *Am J Clin Nutr* **79**, 1118-25.

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-

octadecadienoic acid affects body weight gain and plasma lipids in hamsters. *J Nutr* **130**, 27–29.

Gibney, M.J. (1993) Fish oils in human health. *Recent advances in animal nutrition in Australia*, Ed. D. J. Farrell. University of New England, Armidale, N. S. W., 2351.

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.).

Goua, M., Sneddon, A.A., Rotondo, D., Wahle, K.W.J. (2003) IkappaB phosphorylation in response to CLA and n-3 PUFA in SMC and HUVEC: a link with adhesion molecule regulation? *Abstr. 44th Internatl. Conf. Biosci. Lipids*, Oxford, England, Sept. 2003.

Goua, M., Wahle, K.W.J. (2007) Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins. *Curr Opin Lipid Res* **18**, 113–116.

Greenberg, A.S., Nordan, R.P., McIntosh J., Calvo J.C., Scow R.O., Jablons, D. (1992) Interleukin 6 Reduces Lipoprotein Lipase Activity in Adipose Tissue of Mice *in Vivo* and in 3T3-L1 Adipocytes: A Possible Role for Interleukin 6 in Cancer Cachexia. *Cancer Res* **52**, 4113-4116.

Griinari, J. M., Dwyer, D.A., McGuire, M.A., Bauman, D.E., Palmquist, D.L., Nurmela, K.V.V. (1998) *Trans*-octadecenoic 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., 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., 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 Δ^9 -desaturase. *J Nutr* **130**, 2285-2291.

Griinari, J.M., Nurmela, K., Dwyer, D.A., Barbano, D.M., Bauman, D.E. (1999) Variation of milk fat concentration of conjugated linoleic acid and milk fat percentage is associated with a change in ruminal biohydrogenation. *J Anim Sci* **77** (Suppl.1):117-118 (Abstr.).

Grimble, R.F. (1996) Interaction between nutrients, pro-inflammatory cytokines and inflammation. *Clin Sci* **91**, 121-130.

Ha, H.H., Ahn, I.S., Byun, J.M., Do, H.K., Young, S.Y., Jeong, J.H., Wahle, K.W.J., Park, K.Y., Do, M.S. (2003) Effects of conjugated linoleic acid on adipocyte secreted proteins in vitro. *J Food Sci Nutr* **8**, 253-259.

Ha, Y.L., Grimm, N.K., Pariza, M.W. (1987). Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* **8**, 1881-1887.

Ha, Y.L., Storkson, J., Pariza, M.W. (1990) Inhibition of benzo(a)pyreneinduced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res* **50**, 1097- 101.

Hara, A.; Radin, N.S. 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* **90**, 420-426.

Harfoot, C.G. (1978) Lipid metabolism in the rumen. *Prog Lipid Res* **17**, 21-54.

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., Noble, R.C., Moore, J.H. (1973) Food particles as a site of biohydrogenation of unsaturated fatty acids in the rumen. *Biochem J* **132**, 829-832.

Hegsted, D.M., McGandy, R.B., Stare, F.J. (1965) Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am J Clin Nutr* **17**, 281-295.

Heys, S.D., McClinton, S., Wahle, K.W.J. (unpublished observations).

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.

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

Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L., Spiegelman, B.M. (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* **95**, 2409-2415.

Howe, G.R., Hirohata, T., Hislop, T.G., Iscovich, J.M., Yuan, J-M., Katsouyanni, K., Lubin, F., Marubini, E., Modan, B., Rohan, T., Toniolo, P., Shunzhang, Y. (1990) Dietary factors and risk of breast-cancer:combined analysis of 12 case control studies. *J natl Cancer Inst* **82**, 561-569.

Hubbard, N.E. Lim, D., Summers, L., Erickson, K.L. (2000) Reduction of murine mammary tumor metastasis by conjugated linoleic acid. *Cancer Lett* **150**, 93-100.

Hughes, P.E., Hunter, W.J., Tove, S.B. (1982) Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. Purification and properties of *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoate reductase. *J Biol Chem* **257**, 3643-3649.

Hunter, D.J., Spiegelman, D., Adami, H.O., Beeson, L., van den Brandt, P.A., Folsom, A.R., Fraser, G.E., Goldbohm, R.A., Graham, S., Howe, G.R., Kushi, L.H., Marshall, J.R., McDermott, A., Miller, A.B., Speizer, F.E., Wolk, A., Yaun, S.S., Willett, W. (1996) Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer - apooled analysis. *N Engl J Med* **334**, 356-361.

Hwang, D.H., Kinsella, J.E. (1979) Effects of *trans*, *trans* methyl linoelaidate on the concentration of prostaglandins and their precursors in rat. *Prostaglandins* **17**, 543-559.

Igarishi, M., Miyazawa, T. (2001) The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on a human hepatoma cell line, HepG2, is induced by a change in fatty acid metabolism, but not the facilitation of lipid peroxidation in the cells. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Biol Lipids* **1530**, 162-171.

INRA (1978) Alimentation des Ruminants. Ed. *INRA Paris*, France.

Ip, C., Ip, M.M., Loftus, T., Shoemaker, S., Shea-Eaton, W. (2000) Induction of apoptosis by conjugated linoleic acid in cultured mammary tumor cells and premalignant lesions of the rat mammary gland. *Cancer Epidem Biomark Prev* **9**, 689-696.

Ip, C., Scimeca, J.A., Thompson, H. (1995) Effect of timing and duration of dietary conjugated linoleic acid on mammary cancer prevention. *Nutr Cancer* **24**, 241-247.

Ip, M.M., Masso-Welch, P.A., Shoemaker, S.F., Shea-Eaton, W.K., Ip, C. (1999) Conjugated linoleic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of normal rat mammary epithelial cells in primary culture. *Exp Cell Res* **250**, 22-34.

Iwakiri, Y., Sampson, D.A., Allen, K.G.D. (2002) Suppression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by

conjugated linoleic acid in murine macrophages. *Prostagl Leukotr Essential Fatty Acids* **67**, 435–43.

Jahreis, G., Fritsche, J., Steinhart, H. (1997) Conjugated linoleic acid in milk fat: high variation depending on production system. *Nutr Res* **17**,1479-1484.

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

Jenkins, T.C. (1993) Lipid metabolism in the rumen. *J Dairy Sci* **76**, 3851-5863.

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

Jiang, J., Bjoerck, L., Fonden, R., Emanuelson, M. (1996) Occurrence of conjugated *cis*-9, *trans*-11 octadecadienoic acid in bovine milk: effects of feed and dietary regimen. *J. Dairy Sci.* **79**, 438-445.

Karmali, R.A., Marsh, J., Fuchs C. (1984) Effect of omega-3 fatty acids on growth of a rat mammary tumor. *J Natl Cancer Inst* **73**, 457-461.

Katan, M.B., Zock, P.L., Mensink, R.P. (1995) Trans fatty acids and their effect on lipoproteins in humans. *Annu Rev Nutr* **15**, 473-493.

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.).

Keeny, M. (1970) Lipid metabolism in the rumen. In Phillipson, A.T. (ed.) *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant*. pp: 489-503. Oriel Press, Newcastle-upon-Tyne.

Keim, N.L. (2003) Conjugated linoleic acid and body composition. In: J-L. Sebedio, W.W. Christie, R. Adlof. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, **vol 2**. AOCS Press, Champaign, Ill. 316-324.

Kellens, M.J., Goderis, H.L., Tobback, P.P. (1986) Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by a mixed culture of rumen microorganisms. *Biotech Bioeng* **28**,1268-1276.

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.

Kemp, P., Lander, D.J., Gunstone, F.D. (1984) The hydrogenation of some *cis*- and *trans*-octadecenoic acids to stearic acid by a rumen *Fusocillus sp.* *Br J Nutr* **52**, 165-170.

Kepler, C.R., Hirons, K.P., McNeill, J.J., Tove, S.B. (1966) Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J Biol Chem* **241**, 1350-1354.

Kepler, C.R., Tove, S.B. (1967) Biohydrogenation of unsaturated fatty acids: III. Purification and properties of a linoleate Δ^{12} -*cis*, Δ^{11} -*trans*-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J Biol Chem* **242**, 5686-5692.

Kepler, C.R., Tucker, W.P., Tove, S.B. (1970) Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. IV. Substrate specificity and inhibition of linoleate Δ^{12} -*cis*, Δ^{11} -*trans* isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J Biol Chem* **245**, 3612-3620.

Keys, A. (1967) Epidemiological studies related to coronary heart disease: Characteristics of men aged 40-59 in Seven Countries. *Acta Medica Scandinavica* **460**- Supplement.

Keys, A., Anderson, J.T., Grande, F. (1965) Serum cholesterol response to changes in the diet IV. Particular saturated fatty acids in the diet. *Metabolism* **14**, 776-87.

Keys, A., Menotti, A., Karvonen, M.J., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Djordjevic, B.S., Dontas, A.S., Fidanza, F., Keys, M.H. (1986). The diet and 15-years death rate in the Seven Countries Study. *Am J Epidemiol* **124**, 903-915.

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.).

Kim, E.J., Holthuizen, P.E., Park, H.S., Ha, Y.L., Jung, K.C., Park, J.H. (2002) Trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid inhibits Caco-2 colon cancer cell growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**, G357-37.

Kim, E.J., Kang, I.J., Cho, H.J., Kim, W.K., Ha, Y.L., Park, J.H. (2003) Conjugated linoleic acid downregulates insulin-like growth factor- I receptor levels in HT-29 human colon cancer cells. *J Nutr* **133**, 2675- 81.

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.

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.

Kliwer, S.A., Sundseth, S.S., Jones, S.A., Brown, P.J., Wisely, G.B., Koble, C.S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T.M., Lenhard, J.M., Lehmann, J.M. (1997) Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interaction with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 4318–23.

Knekt, P., Jarvinnen, R. (1999) Intake of dairy products and breast cancer risk In: 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. 444-468.

Kritchevsky, D. (1999) Conjugated linoleic acid and experimental atherosclerosis in rabbits. In: 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. 397-403.

Kritchevsky, D., Tepper, S.A., Wright, S., Czarnecki, S.K., Wilson, T.A., Nicolosi, R.J. (2004) Conjugated linoleic acid isomer effects in atherosclerosis: growth and regression of lesions. *Lipids* **39**, 611–6.

Kritchevsky, D.T.S., Wright, S., Czarnecki, S.K. (2002) Influence of graded levels of conjugated linoleic acid (CLA) on experimental atherosclerosis in rabbits. *Nutr Res* **22**, 1275–9.

Kuhnt, K., Kraft, J., Moeckel, P. & Jahreis, G. (2006) Trans-11 18:1 is more effectively delta-9 desaturated compared with trans-12-18:1 in humans. *Br J Nutr* **95**, 752–761.

Landa, M.C., Frago, N., Tres, A. (1994). Diet and risk of breast cancer in Spain. *Eur J Cancer Prev* **3**, 313-320.

Larsson, S.C., Bergkvist, L., Wolk, A. (2005) High-fat dairy food and conjugated linoleic acid intakes in relation to colorectal cancer incidence in the Swedish Mammography Cohort. *Am J Clin Nutr* **82**, 894– 900.

Leat, W.M.F., Kemp, P., Lysons, R. J., Alexander, T.J.L. (1977) Fatty acid composition of depot fats from gnotobiotic lambs. *J Agric Sci* **88**, 175-179.

Ledoux, M., Chardigny, J.M., Darbois, M., Soustre, Y., Sebedio, J.L., Laloux, L. (2003) Seasonal and regional variations of the levels of conjugated linoleic acid in French butters. *Sci Aliments* **23**, 443-461.

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 regimen. *J Dairy Sci* **85**, 190-197.

Lee, K.N., Kritchevsky, D., Pariza, M.W. (1994) Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* **108**, 19–25.

Lee, S.H., Yamaguchi, K., Kim, J.S., Eling, T.E., Park, Y., Baek S.J. (2006) Conjugated linoleic acid stimulates an anti-tumorigenic protein NAG-1 in an isomer specific manner. *Carcinogenesis* **27**, 972-981.

Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Wilson, T.M., Kliewer, S.A. (1995) An Antidiabetic Thiazolidinedione Is a High Affinity Ligand for Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR) *J Biol Chem* **270**, 12953–6.

Liew, C., Schut, H.A., Chin, S.F., Pariza, M.W., Dashwood, R.H. (1995) Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3- methylimidazo [4,5-f]quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanism. *Carcinogenesis* **16**, 3037-3043.

Lim, D.Y., Tyner, A.L., Park, J.B., Lee, J.Y., Choi, Y.H., Park, J.H. (2005) Inhibition of colon cancer cell proliferation by the dietary compound conjugated linoleic acid is mediated by the CDK inhibitor p21CIP1/WAF1. *J Cell Physiol* **205**, 107–13.

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.

Lor, J.J., Herbein, J.H., Polan C.E. (2002) *Trans*18:1 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.

Ma, D.W., Field, C.J., Clandinin, T. (2002) Countercurrent approach to the enrichment of Δ 9c, 11t- and Δ 10, 12c-18:2 isomers by urea complexation. *J Am Oil Chem Soc* **79**, 755-8.

Maczulak, A.E., Dehority, B.A., Palmquist, D.L. (1981) Effects of long chain fatty acids on growth of rumen bacteria. *Appl Environ Microbiol* **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.

Majumder, B., Wahle, K.W., Moir, S., Schofield, A.C., Choe, S.N., Farquharson, A., Grant, I., Heys, S.D. (2002) Conjugated linoleic acids (CLAs) regulate the expression of key apoptotic genes in human breast cancer cells. *Faseb J* **16**, 1447–9.

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.

Martin, S.A., Jenkins, T.C. (2002) Factors affecting conjugated linoleic acid and *trans*-C18:1 fatty acid production by mixed ruminal bacteria. *J Anim Sci* 3347-3352.

Masso-Welch, P.A., Zangani, D., Ip, C., Vaughan, M.M., Shoemaker, S., Ramirez, R.A., Ip, M.M. (2002) Inhibition of angiogenesis by the cancer chemopreventative agent conjugated linoleic acid. *Cancer Res* **62**, 4383-4389.

Masso-Welch, P.A., Zangani, D., Ip, C., Vaughan, M.M., Shoemaker, S.F., McGee, S.O., Ip, M.M. (2004) Isomers of conjugated linoleic acid differ in their effects on angiogenesis and survival of mouse mammary adipose vasculature. *J Nutr* **134**, 299–307.

McCarthy-Beckett, D.O. (2002) Dietary supplementation with conjugated linoleic acid does not improve nutritional status of tumor-bearing rats. *Res Nursing Health* **25**, 49-57.

McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D. (1992) *Nutrizione animale. Tecniche nuove*, Milano Italia.

McGuire, M.A., McGuire, M.K., Parodi, P.W., Jensen, R.G. (1999) Conjugated linoleic acids in human milk. In: M.P. Yurawecz, 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. 296–306.

Medina, E. A., Horn, W.F., Keim, N.L., Havel, P.J., Benito, P., Kelley, D.S., Nelson, G.J., Erickson, K.L. (2000) Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on circulating leptin concentrations and appetite. *Lipids* **35**, 783-788.

Miles, E.A., Calder, P.C. (1998). Modulation of immune function by dietary fatty acids. *Proc Nutr Sci* **57**, 277-292.

Miller, A., Stanton, C., Devery, R. (2002) Cis 9, trans 11- and trans 10, cis12-conjugated linoleic acid isomers induce apoptosis in cultured SW480 cells. *Anticancer Res* **22**, 3879-3887.

Moon, E.J., Lee, Y.M., Kim, K.W. (2003) Anti-angiogenic activity of conjugated linoleic acid on basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *Oncol Rep* **10**, 617–21.

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

Morand-Fehr, P., Tran, G. (2001) La fraction lipidique des aliments et les corps gras utilisés en alimentation animale. *INRA Prod. Anim.* **14**, 285-302.

Moseley, E.E., McGuire, H.K., Williams, J.E. & McGuire, M.A. (2006) Cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid is synthesised from vaccenic acid in lactating women. *J Nutr* **136**, 2297–2301.

Mosley, E.R., Powell, G.L., Riley, M.B., Jenkins, T.C. (2002) Microbial biohydrogenation of eleic acid to trans isomers in vitro. *J Lipid Res* **43**, 290-296.

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.

Nakanishi, T., Koutoku, T., Kawahara, S., Murai, A., Furuse, M. (2003) Dietary conjugated linoleic acid reduces cerebral prostaglandin E₂ in mice. *Neurosci Lett* **341**, 135–8.

Nicolosi, R.J., Rogers, E.J., Kritchevsky, D., Scimeca, J.A., Huth, P.J. (1997). Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery* **22**, 266-277.

Noble, R.C., Moore, J.H., Harfoot, C.G. (1974) Observations on the pattern of esterified and unesterified linoleic acid in the rumen. *Br J Nutr* **31**, 99-108.

NRC, (1996). Carcinogens and anticarcinogens in the human diet. *National Academy Press*. Washington D.C.

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

Nudda, A., Mele, M., Battacone, G., Usai, M.G., Macciotta, N.P.P. (2003) Comparison of conjugated linoleic acid (CLA) content in milk of ewes and goats with the same dietary regimen. *Ital J Anim Sci* **2**, 515-517.

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.

Oetken, P. (2001) Transcriptional Regulation of Vascular Development. *Circulation Res* **89**, 380-388.

Ogborn, M.R., Nitschman, E., Bankovic-Calic, M., Weiler, H.A., Fitzpatrick-Wong, S., Aukema, H.M. (2003) Dietary conjugated linoleic acid reduces PGE₂ release and interstitial injury in rat polycystic kidney disease. *Kidney Int* **64**,1214–21.

Ohshima, H., Bartsch, H. (1994) Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat. Res.* **305**, 253–264.

Ohshima, H., Tatemichi, M., Sawa, T. (2003) Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* **417**, 3–11.

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. Effect on feed intake, milk fat and fat production and plasma metabolites. *J Dairy Sci* **61**, 890-901.

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

Parchi, G., Mariotti, S., Menotti, A., Seccareccia, F., Torsello, S., Fidanza, F. (1989) Diet and 20-y mortality in two rural population groups of middle-aged men in Italy. *American Journal of Clinical Nutrition* **50**, 1095-1103.

Pariza, M.W., Ashoor, S.H., Chu, F.S., Lund, D.B. (1979). Effect of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. *Cancer Letters* **7**, 63–69.

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

Park, H.S., Cho, H.Y., Ha, Y.L., Park, J.H. (2004) Dietary conjugated linoleic acid increases the mRNA ratio of Bax/Bcl-2 in the colonic mucosa of rats. *J Nutr Biochem* **15**, 229– 35.

Park, H.S., Ryu, J.H., Ha, Y.L., Park, J.H. (2001) Dietary conjugated linoleic acid (CLA) induces apoptosis of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats: a possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA. *Br J Nutr* **86**, 549– 55.

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.

Parkin, D.M. (2001) Global cancer statistics in the year. *Lancet Oncol* **2**, 533-543.

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. (1997) Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *J Nutr* **127**, 1055- 60.

Parodi, P.W. (2003). Conjugated linoleic acid in food. In: J-L. Sebedio, W.W. Christie, R. Adlof. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research* **vol. 2**. AOCS Press, Champaign, Ill. 101-122.

Parthasarathy, S., Kloo, J.C., Miller, E., Barnett, J., Witztum, J.L., Steinberg D. (1990) Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modification: implications for dietary prevention in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 3894-98.

Petrick, M.B.H., McEntee, M.F., Johnson, B.T., Obukowicz, M.G., Whelan, J. (2000) Highly unsaturated (n-3) fatty acids, but not α -linolenic, conjugated linoleic or γ -linolenic acids, reduce tumorigenesis in APC^{Min/+} mice. *J Nutr* **130**, 2434-2443.

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.

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.

Precht, D., Molkentin, J. (1997) Effect of feeding on conjugated *cis*- Δ 9, *trans*- Δ 11 octadecadienoic acid and other isomers of linoleic acid in bovine milk fats. *Nahrung* **41**, 330-335.

Rajakangas, J., Basu, S., Salminen, I., Mutanen, M. (2003). Adenoma growth stimulation by the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid (CLA) is associated with changes in mucosal NF-kB and cyclin D1 protein levels in the min mouse. *J Nutr* **133**, 1943-1948.

Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J., Glass, C.K. (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* **391**, 79–82.

Riel, R.R. (1963) Physico-chemical characteristics of Canadian milk fat. Unsaturated fatty acids. *J Dairy Sci* **46**, 102-106.

Riserus, U., Berglund, L., Vessby, B. (2001) Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. *Int J Obes Relat Metab Disord* **25**, 1129– 35.

Rotondo, D., Abul, H.T., Milton, A.S., Davidson, J. (1988) Pyrogenic immunomodulators increase the level of prostaglandin E₂ in the blood simultaneously with the onset of fever. *Eur J Pharmacol* **154**,145–52.

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.

Saebo, A. (2003) Commercial synthesis of conjugated linoleate. In: J-L. Sebedio, W.W. Christie, R. Adlof eds. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, vol. 2. AOCS Press, Champaign, Ill. pp 71-81.

SAS. 2000. SAS/STAT® Software: Changes and Enancements through Release 8.1. *SAS Institute Inc., Cary, NC*.

Secchiari, P., Serra, A., Mele M. (2005). Il latte in Alimenti e Salute. A cura di Cocchi M. e Mordenti A. *CLUEB*, Bologna 347-398.

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.

Singh, S., Hawke, J.C. (1979) The *in vitro* lipolysis and biohydrogenation of monogalactosyldiglycerides by whole rumen contents and its fractions. *J Sci Food Agric* **30**, 603-612.

Sneddon, A.A., McLeod, E., Wahle, K.W.J., Arthur, J.R. (2006) Cytokine-induced adhesion to endothelial cells involves platelet-activating factor: suppression by conjugated linoleic acid. *Biochim Biophys Acta* **1761**, 793–801.

Song, H.J, Sneddon, A., Barker, P., Bestwick, C., Choe, S., McClinton, S., Grant, I., Rotondo, D., Heys, S., Wahle, K.W. (2004) Conjugated linoleic acid inhibits proliferation and modulates protein kinase c in human prostate cancer cells. *Nutrition and Cancer* **49**, 100-108.

Song, H.J., Barker, P.A., Faisant, P., McClinton, S., Sneddon, A.A., Bestwick, C.S., Heys, S.D., Wahle, K.W.J. (2001) Conjugated linoleic acid (CLA) modulation of protein kinase C (PKC) in prostate cancer. *Proceedings of 42nd ICBL*, Bergen, Norway, P2-12.

Sporn, M.B., Suh, N., Mangelsdorf, D.J. (2001) Prospects for prevention and treatment of cancer with SPARMs (selective PPAR Modulators). *Trends Mol Med* **7**, 395-400.

SPSS 12.0 (2007) User guide. New York. McGraw-Hill.

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., Jonhson, V.W. (1974) Responses in rumen fermetation and milk fat secretion in cows receiving low-rougagge diets supplemented protected tallow. *J Dairy Res* **41**, 165-182.

Talamini, R., La Vecchia, C., Recarli, A., Franceschi, S., Gattoni, E., Grigoletto, E., Liberati, A., Rognoni, G. (1984) Social factors, diet and breast cancer in a northern Italian population. *Br J Cancer* **49**, 723-729.

Tanaka K. (2005) Occurrence of conjugated linoleic acid in ruminant products and its physiological functions. *Animal Science Journal* **76**, 291–303.

Tanaka, K., Shigeno, K. (1976) The biohydrogenation of linoleic acid by rumen micro-organisms. *Jpn J Zootech Sci* **47**, 50-53.

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.

Torres-Duarte, A.P., Vander Hoek, J.Y. (2003) Conjugated linoleic acid exhibits stimulatory and inhibitory effects on prostanoid production in human endothelial cells and platelets. *Biochim Biophys Acta Molec Cell Res* **1640**, 69–76.

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.

Tricon, S., Burdge, G.C., Kew, S., Banerjee, T., Russell, J.J., Jones, E.L., Grimble, R.F., Williams, C.M., Calder, P.C., Yaqoob, P. (2004) Effects of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on immune cell function in healthy humans. *Am J Clin Nutr* **80**, 1626– 33.

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.

Troegeler-Meynadir, A., Nicot, M.C., Bayourthe, C., Moncoulon, R., Enjalbert, F. (2003). Effects of pH and concentrations of linoleic acids on extent and intermediates of ruminal biohydrogenation *in vitro*. *J Dairy Sci* **86**, 4054-4063.

Tsuboyama-Kasaoka, N., Takahashi, M., Tanemura, K., Kim, H.J., Tange, T., Okuyama, H., Kasai, M., Ikemoto, S., Ezaki, O. (2000) Conjugated

linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* **49**, 1534-1542.

Turpeinen, A.M., Mutanen, M., Aro, A., Salminen, I., Basu, S., Palmquist, D. L., Griinari, J.M. (2002) Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *Am J Clin Nutr* **76**, 504-510.

Ulberth, F., Henninger, M. (1994) Quantitation of *trans* fatty acids in milk fat using spectroscopic and chromatographic methods. *J Dairy Res* **61**, 517-527.

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

Ulbricht, T.L.V., Wheelock, J.V. (1989) Dietary fat and coronary heart disease. *Bradford: Horton*.

Urade, Y., Ujihara, M., Horiguchi, Y., Ikai, K., Hayaishi, O. (1989) The major source of endogenous prostaglandin D₂ production is likely antigen-presenting cells. Localization of glutathione-requiring prostaglandin D synthetase in histiocytes, dendritic, and Kupffer cells in various rat tissues. *J Immunol* **143**, 2982-9.

Van Soest, P.J. (1994) Nutritional Ecology of the Ruminant. (2nd Ed.), Cornell University Press, Ithaca, NY.

Van Soest, P.J.; Robertson, J.B.; Lewis, B.A. (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* **74**, 3583 – 3598.

Verhulst, A., Janssen, G., Parmentier, G., Eyssen, H. (1987) Isomerization of polyunsaturated fatty acids by Propionibacteria. *Syst Appl Microbiol* **9**, 12-15.

Voorrips, L.E., Brants, H.A., Kardinaal, A.F., Hiddink, G.J., van den Brandt, R.A., Goldbohm, R.A. (2002) Intake of conjugated linoleic acid, fat, and other fatty acids in relation to postmenopausal breast cancer: the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *Am J Clin Nutr* **76**, 873–82.

Wahle, K.W.J. (1974) Desaturation of long chain fatty acids by tissue preparations of the sheep, rat and chicken. *Comp Biochem Physiol* **48**, 87-105.

Wahle, K.W.J. (1994) *Royal College Of General Practitioners* (London)-Reference Book. 541-543.

Wahle, K.W.J., Goua, M., D'Urso, S., Heys, S.D. (2007) Conjugated linoleic acids (CLA) effects on body composition and clinical biomarkers of disease in animals and man: metabolic and cell mechanisms. In *Trans Fatty acids*, Blackwell, Oxford Editors, Hamilton, Haman and Dijkstra.

Wahle, K.W.J., Heys, S.D. (2002) Cell signal mechanisms, conjugated linoleic acids (CLAs) and anti-tumorigenesis. *Pros Leuk Ess Fatty Acids* **67**, 183-186.

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.

Wahle, K.W.J., James, W.P.T. (1993) Isomeric fatty acids and human health. *Eur J Clin Nutr* **47**, 828-839.

Wahle, K.W.J., Rotondo, D. (1999) Fatty acids and endothelial cell function in regulation of adhesion molecule and redox enzyme expression. *Current Opinion Clin Nutr Metabolic Care* **2**, 109-115.

Wahle, K.W.J., Rotondo, D., Heys, S.D. (2003) Polyunsaturated fatty acids and gene expression in mammalian system. *Proc Nutr Soc* **62**, 349-60.

Wang, Y.W. & Jones, P.J. (2004) Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. *Int J Obes Rel Metab Disord* **104**, 963-968.

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.D., Cook, E.B., Stahl, J.L., Saban, R., Bjorling, D.E., Pariza, M.W., Cook, M.E. (2001) CLA reduces antigen-induced histamine and PGE₂ release from sensitized guinea pigs tracheae. *Am J Physiol Reg* **280**, 908-12.

Wigmore, S.J., Barber, M.D., Ross, J.A., Tisdale, M.J., Fearon, K.C. (2000) Effect of oral eicosapentaenoic acid on weight loss in patients with pancreatic cancer. *Nutr Cancer* **36**, 177-184.

Wong, M.W, Chew, B.P., Wong, T.S., Hosick, H.L., Boylston, T.D., Shultz T.D. (1997) Effects of dietary conjugated linoleic acid on lymphocyte function and growth of mammary tumors in mice. *Anticancer Res* **17**, 987-993.

Yamasaki, M., Ikeda, A., Oji, M., Tanaka, Y., Hirao, A., Kasai, M., Iwata, T., Tachibana, H., Yamada, K. (2003) Modulation of body fat and serum leptin levels by dietary conjugated linoleic acid in Sprague-Dawley rats fed various fat level diets. *Nutrition* **19**, 30-35.

Yamasaki, M., Ikeda, A., Tanaka, Y., Rikimaru, T., Shimada, M., Sugimachi, K., Tachibana, H., Yamada, K. (2002) Dose-dependent effect of

dietary conjugated linoleic acid on the growth of rat hepatoma dRLh-84 cells in vivo. *J Nutr Sci Vitaminol* **48**, 505-511.

Yang, H., Holcroft, J., Glickman, B.W. & de Boer, J.G. (2003) Conjugated linoleic acid inhibits mutagenesis by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in the prostate of Big Blue(R) rats. *Mutagenesis* **18**, 195–200.

Yang, M., Cook, M.E. (2003) Dietary conjugated linoleic acid decreased cachexia, macrophage tumor necrosis factor- α production and modifies splenocyte cytokine production. *Exptl Biol Med* **228**, 51–8.

Yokoyama, M.T., Davis, C.L. (1971) Hydrogenation of unsaturated fatty acids by *Treponema (Borrelia)* strain B25, a rumen spirochete. *J Bacteriol* **107**, 519-527.

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.

Zhang, X., Young, H.A. (2002) PPAR and immune system--what do we know? *Internat Immunopharmacol* **2**, 1029–44.

Zhao, G., Etherton, T.D., Martin, K.R., Vanden Heuvel, J.P., Gillies, P.J., West, S.G., Kris-Etherton, P.M. (2005) Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **336**, 909–917.

Abbreviazioni:

AA – acido arachidonco

ADF – fibra acido deterosa

ADL – lignina acido deterosa

Apo-B – apolipoproteina B

Bax – oncogene pro-apoptotico

Bcl-2 – oncogene anti-apoptotico

bFGF – basic fibroblast growth factor

CLA – conjugated linoleic acids (coniugati dell'acido linoleico)

CNA – acido nonadienoico coniugato

COX – ciclossigenasi

CVD – disturbi cardiovascolari

DHA – acido docosaesanoico

DHLA – diomo- α -linoleico

DMH – dimetilidrazina

EE – estratto etereo

EFA – essential fatty acids (acidi grassi essenziali)

EI – estrattivi inazotati

EL – energia lorda

ELISA – enzyme linked immunosorbent assay

EMI – emicellulose

EPA – acido eicosapentanoico

FFA – free fatty acids (acidi grassi liberi)

FG – fibra grezza

GC – gas cromatografo

GM – geneticamente modificato

GPx – perossidasi del glutatione

HDL – high density lipoprotein (lipoproteine ad alta densità)

HUVEC – human umbilical vein endothelial cell

IA – indice di aterogenicità

IGF –fattore di crescita insulino-simile

IGM – impaired glucose metabolism

IκB – inhibitory κB

IL – interleuchina

INRA – Institut National de la Recherche Agronomique

IT – indice di trombogenicità

LCFA – long chain fatty acids (acidi grassi a catena lunga)

LCPUFA – long chain polyunsaturated fatty acids (acidi grassi polinsaturi a catena lunga)

LDL – low density lipoprotein (lipoproteine a bassa densità)

LOX – lipossigenasi

LPS – lipopolisaccaridi

MCFA – medium chain fatty acids (acidi grassi a catena media)

mRNA – messenger ribonucleic acid

MUFA – monounsaturated fatty acids (acidi grassi monoinsaturi)

n-3 – omega 3

n-6 – omega 6

NDF – fibra al detergente neutro

NF-κB – nuclear factor κB

NSC – carboidrati non strutturali

P21WAF1/CIP1 – cell cycle regulatory protein
p53 – pro-apoptotic oncogene
PG – proteina grezza
PGE – prostaglandina
PhIP – 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol (4,5-b)pyridine
PKC – protein kinase C
PPAR – peroxisome proliferator activated receptor
PUFA – polyunsaturated fatty acids (acidi grassi polinsaturi)
SCFA –short chain fatty acids (acidi grassi a catena corta)
SCID – severe combined immuno-deficient
SFA – satured fatty acids (acidi grassi saturi)
SS – sostanza secca
TNF – tumor necrosis factor
TVA – acido trans-vaccenico
TXA – trombossano
UFA – unsaturated fatty acids (acidi grassi insaturi)
UFL – unità foraggiere latte
VLDL – very high density lipoprotein

