

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Dottorato di Ricerca

in

Biologia Applicata

XXII ciclo



Stato ossido-riduttivo e risposta fisiologica a modificazioni  
ambientali in *Bubalus bubalis*

TUTOR  
PROF. PAOLO ABRESCIA

DOTTORANDA  
DOTT.SSA CARMELA REGINA PUGLIESE

COORDINATORE  
PROF. EZIO RICCA

Triennio 2006 - 2009

# Sommario

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>4</b>
1.1. La Bufala Mediterranea Italiana	4
1.2. Benessere animale e criteri di valutazione	7
1.3. Allevamento intensivo e benessere animale	13
1.4. Prodotti Bufalini	15
1.4.1. La Carne	15
1.4.2. Il Latte	16
1.4.3. La Mozzarella	19
1.5. Omeostasi ossido-riduttiva	22
1.6. Indicatori di qualità dei prodotti	28
<b>2. SCOPO</b>	<b>31</b>
<b>3. MATERIALI</b>	<b>32</b>
<b>4. METODI</b>	<b>33</b>
4.1. Animali (prima sperimentazione)	33
4.2. Rilevamento della proteina citosolica che lega il Retinolo	34
4.3. Animali (seconda sperimentazione)	36
4.4. Titolazione di estradiolo e progesterone	38
4.5. Preparazione dei campioni di mozzarella	38
4.6. Titolazione dei gruppi Carbonili	39
4.7. Titolazione di dimeri di tirosina	40
4.8. Titolazione di nitrotirosine	40
4.9. Saggio TAC	41
4.10. Valutazione degli aggregati di $\alpha$ lattoalbumina	41
4.11. Titolazione di antiossidanti idrosolubili	42
4.12. Titolazione di antiossidanti liposolubili	43
4.13. Saggio colorimetrico per la determinazione della concentrazione proteica totale.	43
4.14. Analisi statistica	44
<b>5. RISULTATI</b>	<b>45</b>
5.1. Effetto della temperatura sulla stabulazione delle bufale	45
5.1.1. Analisi delle condizioni fisiologiche	45

5.1.2. Titolazione di ascorbato, retinolo e tocoferolo nel plasma e nel latte	46
5.1.3. Effetto di T <sub>3</sub> sul trasporto di Ret e Toc nella ghiandola mammaria	48
5.2. Effetto della densità di stabulazione sul benessere animale	52
5.2.1. Caratterizzazione dello stato ossidoriduttivo in plasma e fluidi follicolari	53
5.2.2. Influenza della densità di stabulazione sulla produzione di latte	54
5.2.3. Influenza della densità di stabulazione sulla riproduzione	55
5.2.4. Influenza della densità di stabulazione in bovine	56
5.3. Analisi qualitativa della Mozzarella di Bufala Campana	57
5.3.1. Valutazione dell'ossidazione proteica	57
5.3.2. Valutazione dell'ossidazione lipidica	60
<b>7. DISCUSSIONE</b>	<b>62</b>
<b>8. CONCLUSIONE</b>	<b>71</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>73</b>

# 1. Introduzione

## 1.1. La Bufala Mediterranea Italiana

Il bufalo appartiene all'ordine degli ungulati, sottordine artiodattili, gruppo ruminanti, famiglia cavicorni, sottofamiglia bovidi, genere *bubalus*. I bufali sono molto diversi dai bovini, ma anche tra gli stessi bufali ci sono alcune differenze, soprattutto anatomiche che ne giustificano la separazione in due generi con caratteristiche proprie specifiche: il bufalo asiatico, *Bubalus bubalus*, e il bufalo africano, *Bubalus syncerus*. *Bubalus bubalis* è a sua volta suddiviso in due gruppi: Swamp (67%) e River (33%). I bufali Swamp sono allevati soprattutto nei paesi del sud-est asiatico, dove sono utilizzati principalmente come animali da lavoro; i bufali del tipo River includono numerose razze, tra cui la "Mediterranea", che è diffusa in Egitto, Medio Oriente, Sud America e in Europa dove il patrimonio bufalino complessivo è di circa 415000 capi, il 59% dei quali è in Italia (FAO, 2001), e rappresentano un elemento essenziale per l'approvvigionamento di latte e di carne per le popolazioni. La razza di bufalo allevata in Italia (*B. bubalis*, tipo River), selezionata per la produzione di latte (De Rosa et al., 2009), ha ricevuto la denominazione di "*Bufala Mediterranea Italiana*" ed è stata riconosciuta con Decreto Ministeriale 201992 del 5 luglio 2000 quale tipo genetico autoctono, grazie al lungo isolamento (almeno 16 secoli) ed alla mancanza di incroci con bufali appartenenti alla stessa razza o a razze diverse allevate in altri Paesi del mondo.

Diverse sono le ipotesi sulla comparsa bufala dei bufali in Italia; una di queste, sostenuta anche da Maymone (1945), è che sia stata introdotta nel VI secolo dall'Ungheria durante le invasioni barbariche. Agli inizi del XIX secolo, in Italia, come conseguenza dell'incremento demografico, ci fu bisogno di nuove terre coltivabili. L'allevamento bufalino, organizzato su un sistema semiselvatico, venne sempre più relegato nelle zone acquitrinose dove gli investimenti zootecnici erano quasi inesistenti, rappresentando, secondo Maymone, "una vera fortuna per le zone

paludose che non avrebbero potuto trovare altra forma di sfruttamento”. Il bufalo divenne l’animale tipico di queste zone, poiché si adattava all’allevamento brado, utilizzando qualsiasi tipo di foraggio, anche scadente, come diverse erbe palustri, richiedeva inoltre poche cure e presentava una notevole resistenza alle malattie. Oltre alla produzione di carne e latte, era impiegato come animale da lavoro (Pugliese, 1998). In Italia, con l’inizio della rivoluzione industriale, fu avviato un processo di bonifica di ampie zone paludose per recuperare terre all’agricoltura, che portò a una drastica riduzione di bufali sul nostro territorio. Questo processo portò alla quasi scomparsa di questa specie dal territorio italiano con un minimo storico di 5500 capi nel 1950. Per rilanciare l’allevamento bufalino, si ritenne di dover allevare questa specie in un ambiente confinato tutto l’anno, applicando le stesse tecniche usate per l’allevamento bovino. Maymone e la sua scuola iniziarono, nel dopoguerra, una serie di studi per verificare la possibilità tecnica e la convenienza economica legata alla conversione dell’allevamento bufalino da semiselvatico a intensivo. I risultati positivi di queste sperimentazioni e la conseguente applicazione sul territorio, sicuramente, contribuirono a frenare la riduzione delle aziende bufaline (Pugliese, 1998). Il patrimonio bufalino italiano andò così incontro a una continua espansione. Attualmente l’Italia è il Paese con la maggiore quantità di capi allevati: dati del 2006 riferiscono la presenza di circa 318158 capi, che rappresentano l’85% dell’intera popolazione europea. Il 73% dei bufali allevati in Italia è attualmente concentrato nella regione Campania (Accomando, 2007), sebbene l’allevamento della bufala si stia diffondendo anche in regioni più vicine ai mercati europei.

Il bufalo è un animale a triplice attitudine, infatti produce latte, rappresenta una fonte di carne e lavoro. In Italia è stato effettuato un intenso lavoro di ricerca e di selezione nell’allevamento bufalino, al fine di incrementare la produzione del latte e migliorarne le caratteristiche qualitative (Amante et al., 2001). Negli ultimi trenta anni la produzione media di latte è aumentata di circa 600 kg/lattazione, con aumento anche del contenuto percentuale di grasso e proteine (Amante et al.,

2001). Il latte di bufala è utilizzato per la fabbricazione della rinomata Mozzarella di Bufala Campana, che ha ricevuto il marchio di tutela DOP a livello comunitario, Reg CE n. 1107/96. Questa denominazione offre garanzie su diversi livelli del processo produttivo: origine, provenienza delle materie prime, localizzazione e tradizione del processo produttivo. I prodotti certificati DOP offrono infatti:

- **Serietà**, in quanto sono regolamentati da leggi italiane e comunitarie.
- **Tracciabilità**, semplificata, in quanto provengono da una zona geografica delimitata.
- **Legame con il territorio**, poiché sono il frutto della combinazione tra le caratteristiche geologiche, agronomiche e climatiche dell'areale di produzione.
- **Tipicità**, ovvero, rispetto del metodo di produzione tradizionale, unico, derivante da una cultura e da metodiche di lavorazione che si sono consolidate nel tempo.

Il settore latte-caseario ha da sempre rivestito un ruolo fondamentale nel nostro paese, raggiungendo nel 2007 un fatturato di 14.2 miliardi di euro su un totale di 110, pari al 13%. Secondo fonti Databank, il fatturato della produzione del comparto “*mozzarelle*” (Mozzarella di Bufala Campana DOP, vaccina e di latte di bufala) in Italia è stato di 1522 milioni di euro nel corso del 2007. Questo implica che l'allevamento del bufalo rappresenta un elemento fondamentale nell'economia delle zone DOP “Mozzarella di Bufala Campana”, producendo un indotto di rilevante impatto socio-economico. Il ritorno economico derivante dalla trasformazione del latte in mozzarella ha favorito il continuo incremento sia della popolazione bufalina sia delle aziende (Addeo et al., 2007; Menghi et al., 2007). Attualmente nel settore del DOP, sono impegnati circa 15 mila addetti (fonte ANSAB) con un valore aggiunto complessivo per l'intera filiera pari a 260 milioni di euro (Castrillo, 2003).

L'allevamento del bufalo, in questi ultimi anni, ha subito notevoli trasformazioni sia di tipo strutturale sia di organizzazione aziendale che hanno portato ad una maggiore razionalizzazione delle tecniche di allevamento e al passaggio da un allevamento di tipo estensivo a uno di tipo intensivo. L'allevamento intensivo o

allevamento industriale utilizza tecniche industriali e scientifiche per ottenere la massima quantità di prodotto al minimo costo e utilizzando il minimo spazio, tipicamente con l'uso di appositi macchinari e farmaci veterinari (Estevez et al. 2007). In particolare, l'esigenza di incrementare la produzione di latte ha indotto ad analizzare accuratamente i fattori alimentari ed ambientali, ad introdurre tecnologie innovative e ad eseguire controlli funzionali, per comprendere meglio il potenziale produttivo dei singoli animali. Ciò ha garantito l'adozione di sistemi di allevamento consoni alle esigenze nutrizionali e ambientali della specie.

## **1.2. Benessere animale e criteri di valutazione**

L'allevamento intensivo ha permesso di soddisfare l'aumentata richiesta di alimenti di origine animale (soprattutto polli, suini e vitelli a carne bianca), di migliorarne le caratteristiche igienico-sanitarie e di ridurre i costi di produzione. La forte spinta verso l'allevamento intensivo, che comporta un maggiore sfruttamento degli animali, ha suscitato, negli ultimi decenni, un crescente interesse nei confronti delle condizioni di allevamento. In particolare, lo sviluppo di una maggiore sensibilità verso la sofferenza animale e le recenti preoccupazioni riguardo alla sicurezza alimentare hanno talmente accresciuto l'interesse del consumatore sugli alimenti di origine animale e sui loro processi produttivi da porre il problema del benessere animale in primo piano nelle politiche *agenda*. Si è diffusa la consapevolezza che, oltre ad occuparsi delle condizioni igieniche e sanitarie degli animali, è necessario rispettarne le esigenze biologiche, le caratteristiche comportamentali e tutelarne il benessere. Al fine di migliorare i sistemi di allevamento, nel rispetto del benessere animale, recentemente sono state iniziate ricerche, nel settore agro-zootecnico, per procedere all'individuazione di indicatori del benessere animale sempre più validi e sostenibili, in modo da sviluppare, applicare e migliorare possibili approcci pratici che siano in grado di

conciliare le esigenze produttive dell'uomo con il benessere degli animali allevati (De Rosa et al., 2009).

Nel 1976, a Strasburgo, gli Stati membri della Comunità Europea, con la Convenzione europea sulla protezione degli animali negli allevamenti, hanno ritenuto auspicabile adottare disposizioni comuni per proteggere gli animali, in particolare nei sistemi moderni di allevamento intensivo. Successivamente, è stata proclamata a Parigi, nel 1978, la dichiarazione universale dei diritti dell'animale, che ha rappresentato il primo passo verso un nuovo modo di intendere i rapporti tra l'uomo e le altre specie. In passato alcuni ricercatori hanno sostenuto che la sofferenza o altre esperienze soggettive non rientrano nell'indagine scientifica e che la scienza può "misurare" il benessere animale. Recentemente, il concetto di benessere animale si è profondamente modificato, mentre in passato era inteso sostanzialmente come "l'assenza di malattia", oggi è stato sostituito dal concetto olistico di "benessere totale" con le correlate componenti biologiche, fisiologiche, psicologiche e sociali (Terranova e Laviola 2004). Comunque, il "benessere animale" rimane un argomento complesso ed è sempre aperto il dibattito sia sulla sua definizione sia sui metodi più idonei per poterlo valutare. Si ritiene che il benessere (sia fisico sia mentale) dell'animale debba essere valutato tenendo conto, da un punto di vista scientifico, anche delle sensazioni degli animali, studiandone il comportamento (Brambell Report, 1965). Infatti, è stato sottolineato che il benessere è uno stato di salute completa, sia fisica che mentale, in cui l'animale è in armonia con il suo ambiente (Hughes, 1976), che è determinato dallo stato in cui si trova, in relazione ai tentativi di adattarsi all'ambiente (Broom, 1986), e che fa riferimento alla qualità della vita dell'animale e coinvolge elementi diversi, come la salute, la felicità e la longevità, a cui diverse persone attribuiscono differenti gradi di importanza (Tannenbaum, 1991; Fraser, 1999).

In generale, il concetto attuale di "stato di benessere" è riconducibile alle cosiddette "cinque libertà" di cui l'animale deve godere (Brambell Report, 1965):

1. Libertà dalla fame, dalla sete e dalla cattiva nutrizione, mediante facile accesso all'acqua fresca e a una dieta in grado di favorire lo stato di salute.

2. Libertà dal disagio termico e fisico: l'ambiente deve essere adatto e disporre di idonei ricoveri e zone per lo stazionamento ed il decubito.

3. Libertà dal dolore e dalle malattie: il sistema di allevamento deve essere tale da minimizzare il rischio di lesioni e di malattie, e si devono approntare sistemi di prevenzione e di rapida diagnosi e cura delle malattie stesse.

4. Libertà dalla paura e dallo stress, assicurando condizioni che evitino sofferenza mentale.

5. Libertà di espressione del proprio comportamento naturale: l'animale deve disporre di spazio sufficiente, di attrezzature appropriate e della compagnia di altri animali della stessa specie.

Il problema del benessere animale è diventato un argomento di attualità, affrontato da allevatori, consumatori e tutti coloro che operano nel settore delle produzioni animali. Gli studi, pertanto, non riguardano solo l'allevatore (tenuto ad adeguarsi a norme e direttive in continuo cambiamento ed aggiornamento) ma anche il consumatore, la cui opinione ed il cui gradimento devono essere soddisfatti con soluzioni valide ed economicamente sostenibili (Napolitano, 2001). Sebbene siano stati condotti numerosi studi sul benessere animale, ancora non esiste una definizione univoca ed universalmente riconosciuta, perché si tratta di un concetto, che non è puramente scientifico (come il fabbisogno nutritivo per una determinata categoria animale o l'ereditabilità di un carattere), ma tiene conto anche di considerazioni etiche su cui si fa sentire il peso dell'opinione pubblica. Le valutazioni scientifiche relative al benessere animale possono essere effettuate in condizioni sperimentali ben controllate in laboratorio o in pieno campo e prendono il nome di *misurazione del benessere*. Tra le variabili più frequentemente prese in considerazione, si ricordano quelle di tipo comportamentale (rilevazione del repertorio comportamentale e di stereotipie, conduzione di *open field test* e *fear test*, ecc.), fisiologiche (parametri metabolici, profilo ormonale, funzionalità del

sistema immunitario, caratterizzazione dello stato ossido-riduttivo), patologiche (presenza di malattie latenti o manifeste) (Dawkins, 1980; Mench and Van Tienhoven, 1986), produttive (velocità di accrescimento, tasso di mortalità, caratteristiche riproduttive). Tuttavia, quando la finalità è quella di effettuare un *monitoraggio del benessere a livello aziendale*, non tutti gli indicatori applicabili a condizioni rigorosamente sperimentali possono essere utilizzati, sia per il loro costo, in termini economici e di tempo necessario per condurre le indagini, sia per la necessità di disporre di personale e di equipaggiamenti specializzati. Pertanto, si rendono necessari alcuni aggiustamenti o semplificazioni dei suddetti indicatori, e indici di altra natura, poco adatti all'applicazione in esperimenti su piccola scala, possono risultare più appropriati per il monitoraggio a livello aziendale. La valutazione del benessere a livello aziendale può essere eseguita seguendo due diversi approcci. Il primo si avvale dei *design criteria* ed è basato sulla valutazione di elementi tecnici e strutturali, quali, ad esempio, la disponibilità di spazio, la facilità di assunzione dell'alimento e dell'acqua di abbeverata, il tipo di pavimentazione, la rumorosità ambientale, la presenza di opportuni sistemi di ventilazione e le condizioni igieniche dell'allevamento. Alcuni studi hanno evidenziato una stretta relazione tra i criteri tecnici, lo stato di salute e il comportamento animale; ad esempio, lo spazio per l'alimentazione svolge un ruolo importante in relazione al comportamento agonistico ed anche ai rischi di eventuali ferite e lesioni cutanee. Lo spazio alla mangiatoia, infatti, è importante, sia per il giusto apporto di alimento e acqua, sia per consentire un buon comportamento sociale all'interno dell'allevamento (Sundrum, 1997). Tuttavia, esiste un secondo approccio basato sui *performance criteria*, che ricorre all'osservazione diretta degli animali per giungere alla formulazione di un giudizio mediante indici affidabili, tra i quali: mortalità, longevità, morbilità, distanza di fuga, pulizia corporea, stato di ingrassamento, lesioni cutanee, zoppie, stereotipie, aggressività, ecc.. Per la valutazione del benessere a livello aziendale, Bertoni (2001) propone il *Sistema Diagnostico Integrato* (SDI) che fa riferimento:

- all'alimentazione, vista in termini di alimenti e di razioni in grado di coprire i fabbisogni delle diverse categorie di animali senza comprometterne lo stato di salute;
- all'animale stesso e al suo aspetto (pelo, stato di ingrassamento, presenza di ferite, ecc.), alla diffusione di malattie o anomalie metaboliche, alla fertilità, alla quantità e qualità del latte, al comportamento generale, nonché ad alcuni esami delle feci, delle urine e del sangue;
- all'allevamento nel suo complesso: microclima, edifici, attrezzature, *management*, in rapporto al migliore soddisfacimento delle esigenze animali.

Da quanto detto, si evince che la valutazione effettiva del benessere dell'animale è basata sia sulla valutazione clinica di indici fisiologici e biochimici, sia sull'analisi etologica del repertorio comportamentale. L'aspetto importante da considerare è che la valutazione del benessere animale è effettuata sia con metodi diretti (rilevando le risposte adattative dell'animale all'ambiente in cui vive) sia con metodi indiretti (analizzando la qualità dell'ambiente secondo parametri oggettivi). Nella selezione dei parametri da analizzare è importante utilizzare parametri e criteri di analisi che riflettano lo stato dell'animale, siano riproducibili e ripetibili nel tempo ed abbiano potere esplicativo.

Il profilo metabolico è un elemento importantissimo del sistema integrato di indicatori oggettivi di benessere, in quanto consente di caratterizzare lo stato metabolico-nutrizionale dell'animale, di esaminare la funzionalità di organi specifici, e di rilevare eventuali dismetabolie alimentari, permettendo di stabilire se la dieta adottata è corretta per la categoria produttiva cui appartiene l'animale. Gli indici ematici del metabolismo energetico e proteico, utilizzabili anche come marcatori della funzionalità cellulare, includono colesterolo, acidi grassi non esterificati (NEFA), trigliceridi, glucosio e urea. Nella valutazione del benessere animale assume rilevanza anche la titolazione dei livelli circolanti delle transaminasi, quali marcatori della funzionalità epatica, e dei livelli di creatinina, come marcatore della funzionalità renale. L'analisi del profilo ormonale è

indispensabile per “fotografare” lo stato fisiologico dell’animale, verificare se l’organismo è esposto a uno stress, stabilire se lo stress è acuto o cronico e attuare, eventualmente, interventi correttivi per tutelare il benessere. Solitamente è misurata la concentrazione plasmatica di cortisolo, insulina, progesterone e catecolamine, le cui produzioni aumentano in risposta ad una perturbazione dell’equilibrio interno e, pertanto, sono considerati “ormoni di stress”.

La caratterizzazione dello stato ossido-riduttivo, mediante la valutazione dei livelli di antiossidanti enzimatici e non-enzimatici e di marcatori dei danni ossidativi a proteine e lipidi, e l’analisi della risposta immunitaria, umorale e cellulare, mediante lo screening periodico di citochine e proteine infiammatorie e l’analisi del profilo di immunoglobuline (IgG e IgM), rappresentano, infine, uno strumento ottimale per integrare il profilo biochimico-clinico e ormonale. L’analisi dello stato ossido-riduttivo (redox) nei fluidi biologici (plasma, latte, fluido follicolare ovarico) fornisce indicazioni sullo stato fisiologico degli animali ed è utilizzata come strumento di valutazione del benessere. L’omeostasi redox del plasma riflette le alterazioni della risposta adattativa a varie condizioni di stress cui l’organismo può essere sottoposto; basti pensare al fatto che l’infiammazione, un’alimentazione non corretta o una consistente spesa energetica (per processi di notevole importanza fisiologica, come l’accrescimento o la lattazione) possono provocare l’alterazione delle difese antiossidanti in circolo ed, eventualmente, l’insorgenza di danni ossidativi con possibili manifestazioni patologiche. Il quadro completo dei metaboliti del sangue può essere utilizzato per comprendere le risposte dell’organismo all’ambiente e al tipo di alimentazione, per scegliere il modo di allevamento o di alimentazione più adeguata alle esigenze del bufalo (Bertoni et al., 1994; Montemurro et al., 1997; Campanile et al., 1998). L’omeostasi redox del fluido follicolare ovarico risente di quella plasmatica ed influenza la capacità riproduttiva dell’animale. Infatti, è noto che un efficiente sistema di difesa dai danni ossidativi contribuisce a prevenire o limitare i danni cellulari, preservando la sopravvivenza e la funzione steroidogenica delle cellule follicolari (da cui dipende

anche la qualità dell'ovocita) fino al momento dell'ovulazione; l'omeostasi redox è, inoltre, critica all'approssimarsi dell'ovulazione, per il completamento della maturazione ovocitaria (Dharmarajan et al., 1999). Il latte e le sue caratteristiche possono essere considerati uno dei parametri per la valutazione del benessere animale. Il suo contenuto di nutrienti riflette, in gran parte, quello della dieta dell'animale. La presenza di sostanze nocive escrete in esse danno, invece, un'idea dell'inquinamento dell'ambiente in cui l'animale si trova. Il numero di cellule somatiche (e la qualità e quantità di batteri) presenti in esso, rappresentano un quadro dello stato di salute o di malattia dell'animale in osservazione. La quantità di latte prodotto è influenzata sia da fattori esterni sia da quelli interni, quindi può essere un parametro che tiene conto del benessere generale dell'animale (Bettini, 1974).

### **1.3 Allevamento intensivo e benessere animale**

Nell'allevamento intensivo in generale, gli animali sono esposti a un ambiente “artificiale” dove, in caso di gestione non corretta, diversi fattori ambientali possono diventare nocivi ed intaccare le “libertà” degli animali stessi. In particolare, le restrizioni dello spazio possono ridurre drasticamente lo stato di benessere negli animali, in quanto sono associate a inibizione dei movimenti, impossibilità di scegliere il giusto microambiente sociale e fisico (Napolitano et al., 2000), riduzione del tempo di riposo (Haley et al., 2000) e aumento delle lesioni e infortuni (Sandøe et al., 1997). Il sovraffollamento può causare anche stress cronico, alterazione del comportamento e della risposta endocrina e immunitaria, minore velocità di crescita e maggiore incidenza delle malattie (Maton and Daelemans, 1989; Fisher et al., 1997). Gli allevamenti intensivi, ma ancor di più quelli di tipo tradizionali, risentono degli sbalzi di temperatura ambientali, che possono inficiare lo stato di benessere degli animali, se le strutture non sono adeguatamente attrezzate. I ruminanti selvatici presentano svariati

adattamenti ai cambiamenti climatici dipendenti dall'alternarsi delle stagioni (Chilliard et al., 2000). In particolare, i bufali possono acclimatarsi meglio agli ambienti caldi rispetto a quelli freddi (Zicarelli et al., 2005). Attraverso la selezione naturale, i bufali hanno acquisito diverse caratteristiche morfologiche e comportamentali che hanno favorito il loro adattamento negli ambienti caldi (De Rosa et al. 2009), come per esempio l'elevata pigmentazione della pelle che le protegge dai raggi UV, oppure la predilezione, quando sono libere di esprimersi nel loro ambiente naturale, di bagnarsi nelle pozzanghere ed immergersi nel fango (de Franciscis, 1992). Inoltre, l'evaporazione respiratoria è meno efficace nei bufali rispetto ai bovini per l'alcalinità indotta come conseguenza di un rapido aumento del pH del sangue (Koga, 1991). Per quanto riguarda l'esposizione al freddo, negli animali in generale, causa una repentina risposta ormonale con l'aumento della sintesi di ormoni tiroidei, i quali, a loro volta, aumentano la produzione di calore nei mitocondri che è associata alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Ramsey et al., 2000). Queste specie reattive alterano la struttura e la funzione delle principali macromolecole con conseguente instaurarsi di alterazioni della cellula (Halliwell et al., 2000).

Altre condizioni di stress e, quindi, riduzione dello stato di benessere, potrebbero scaturire dall'elevata produttività richiesta agli animali di allevamento. In particolare, gli animali da latte sono costretti a lunghi periodi di lattazione, parti frequenti, riduzione del periodo di interparto ed, in particolare per le bufale, alla modulazione del calendario dei parti, che si attua tramite la destagionalizzazione. La bufala, infatti, ha una spiccata stagionalità riproduttiva (Zicarelli, 1997) e, a causa della sua origine tropicale, tende a concentrare i parti nei periodi dell'anno a giorno breve (*fotoperiodo negativo*; Zicarelli et al., 1984). Questa caratteristica si scontra, in Italia, con la maggiore richiesta di latte sul mercato, che si osserva nel periodo primaverile-estivo, che è quello di maggior consumo del principale prodotto della filiera bufalina: la mozzarella. L'applicazione della destagionalizzazione dei parti consente di ottenere il picco di lattazione in

primavera-estate, in modo da coincidere soddisfare le specifiche richieste del mercato.

Sebbene sia noto che i bufali hanno un'elevata capacità adattiva, le attuali tecniche di allevamento che puntano a massimizzare la prestazione animale, impongono marcati stressori ambientali su di loro. Pertanto, la reazione dei bufali agli stimoli ambientali dovrebbe essere valutata in modo da identificare le condizioni di allevamento più idonee, tecnicamente ed economicamente compatibili con il benessere animale.

#### **1.4 Prodotti Bufalini**

Dal benessere animale dipendono la resa e qualità dei prodotti bufalini. Com'è stato già detto il bufalo è un animale a triplice attitudine, latte, carne e lavoro, ma nel nostro Paese è allevato quasi esclusivamente per la produzione del latte utilizzato per la produzione della mozzarella.

##### **1.4.1. La Carne**

In Campania esiste un patrimonio bufalino di oltre duecentomila capi e ogni anno nascono circa 50mila vitelli maschi, di cui solo poche centinaia sono allevate per essere utilizzati come tori da monta e poche altre centinaia sono allevate per la produzione di carne, mentre tutti gli altri sono soppressi. La soppressione dei maschi è stata ampiamente praticata fino a qualche anno fa, perché gli allevatori non ritenevano che la produzione della carne avrebbe dato loro un reddito adeguato. La possibilità di produrre carne bufalina in Italia è stata inizialmente studiata da Maymone (Maymone, 1945). A oggi è stimata una produzione di carne di bufalo, per la sola Campania, di circa 300 mila kg l'anno, con un fatturato di circa 1,5 milioni di euro. A luglio 2009 è stata accordata alla denominazione "Carne di bufalo campana IGP" la protezione transitoria nazionale. La presenza di tale marchio potrebbe rappresentare nei prossimi anni una novità assoluta per lo sviluppo economico di ampie aree rurali della Campania e potrebbe anche creare le

condizioni per un'adeguata tutela del produttore e per la garanzia verso i consumatori dei livelli qualitativi del prodotto da immettere sul mercato ([http://www.sito.regione.campania.it/agricoltura/comunicati/comunicato\\_20\\_07\\_09.html](http://www.sito.regione.campania.it/agricoltura/comunicati/comunicato_20_07_09.html)).

Le caratteristiche nutrizionali e organolettiche della carne bufalina sono state ampiamente studiate. La carne bufalina, rispetto a quella vaccina, contiene meno grasso d'infiltrazione. Infatti, il bufalo, rispetto ad altre specie, deposita il grasso al di fuori del tessuto muscolare e ciò limita la presenza di grasso nella carne. La carne di bufalo è più succosa, grazie alla maggiore capacità di ritenzione idrica ed è più tenera, per la minore presenza di idrossiprolina. Inoltre, rispetto a quella di manzo e di vitello, la carne ottenuta da bufali correttamente allevati e alimentati ha un minore contenuto di colesterolo, è più ricca di acido stearico e di acido oleico, neutri nei riguardi della colesterolemia umana, nonché di acido linoleico che, in quanto polinsaturo, può agire efficacemente nella riduzione della colesterolemia stessa. Ulteriore caratteristica è il più basso contenuto di lipidi e di residuo secco ed il maggior contenuto di ferro e proteine (Infascelli et al., 2003). La carne di bufalo è in assoluto tra le carni più magre e leggere e, dal punto di vista nutrizionale, può essere considerata di notevole interesse.

#### **1.4.2 Il Latte**

Il latte è il prodotto della secrezione delle ghiandole mammarie delle femmine dei mammiferi. Delle circa 3000 specie di Mammiferi, solo alcune degli Artiodattili (bovidi, yak, bufali, caprini, ovini, cammelli e renne) e dei Perissodattili (cavalli, asini) producono latte utilizzato per l'alimentazione o la trasformazione.

La ghiandola mammaria è simile, nella sua struttura generale, in tutti i mammiferi e consiste in un capezzolo, un dotto e alveoli costituiti da cellule secretorie epiteliali. La mammella della vacca, per esempio, è divisa in due metà separate dal legamento mediano che insieme ai legamenti laterali sostiene la mammella attaccandola al ventre. Gli alveoli sono l'unità strutturale secernente; la loro parete è rivestita da un solo strato di cellule epiteliali, che costituiscono l'unità produttiva, perché prelevano gli elementi nutritivi da un capillare sanguigno posto alla loro

base, li trasformano in componenti del latte e li riversano nell'alveolo per azione contraente di cellule mio-epiteliali.

Il latte è una miscela complessa composta da:

- soluzione vera (zuccheri, sali, vitamine idrosolubili, sostanze azotate non proteiche);
- stato colloidale (proteine, parte dei fosfati e citrati di calcio);
- emulsione (lipidi, vitamine liposolubili).

Dall'epitelio ghiandolare della ghiandola mammaria derivano i grassi, le proteine e gli zuccheri, e dal circolo sanguigno derivano le sieralbumine, gli enzimi, le immunoglobuline e le vitamine.

La composizione del latte dipende da fattori endogeni (di razza, individuali, stato di salute, stato di lattazione) e da fattori esogeni (alimentazione, clima, sistema di allevamento, stabulazione, tecnica e tempi di mungitura, modalità di conservazione). Per esempio, il contenuto in grasso aumenta nel corso della mungitura, quindi con mungiture incomplete si ottiene un latte più povero di grassi. Minore è l'intervallo tra le mungiture, maggiore è la quantità di latte prodotta ma minore la quantità di grasso e di residuo secco (Jensen et al., 1999). Lo stress potrebbe abbassare la qualità del latte in quanto fa aumentare il rilascio delle componenti del plasma al latte, perché causa l'aumento della permeabilità delle giunzioni strette delle cellule dell'epitelio alveolare della ghiandola mammaria (Stelwagen et al., 2000). Dallo stadio della lattazione dipende la concentrazione di diversi antiossidanti nel latte, tra cui retinolo,  $\alpha$ -tocoferolo e  $\beta$ -carotene (Jensen et al., 1999). L'avanzamento dell'età è un importante fattore che influenza notevolmente la quantità di latte prodotto, ma meno la composizione (Catillo et al., 2002).

Il latte di bufala possiede caratteristiche generali molto simili a quelle del latte vaccino, ma se ne discosta per il più alto livello di grasso e proteine, che determinano la più elevata resa del latte: 25 kg di mozzarella, contro i 13 kg ottenuti mediamente dalla stessa quantità di latte vaccino con un incremento di

circa 1,8 (Zicarelli, 2001). Altro aspetto della tipicità del latte bufalino risiede nella sua qualità microbiologica. In condizioni normali nel latte di bufala sono presenti alcuni ceppi di “lattobacilli” in concentrazioni superiori a quelle contenute nel latte vaccino. L’attività metabolica di questi batteri sarebbe responsabile della produzione di particolari composti, da cui dipendono il sapore e l’aroma tipici della mozzarella, e che influenzano il fenomeno di acidificazione della cagliata durante la trasformazione. Nel latte di bufala il grasso costituisce, dopo l’acqua, il componente più importante, oscillando in media tra il 7 ed il 10%. La matrice lipidica del latte di bufala è presente sotto forma di globuli, in dispersione instabile. I globuli di grasso si presentano eterogenei ed essenzialmente costituiti da una microgoccia di trigliceridi (core), circondati da un involucro complesso (la membrana), costituito da diverse sostanze tra cui fosfolipidi, colesterolo, proteine, enzimi e micronutrienti. La membrana esterna del globulo contiene lo 0.5-1% dei lipidi totali, il core contiene il 95-98% dei lipidi totali del latte (King, 1955). I lipidi presenti nelle membrane dei globuli sono più esposti ai processi di ossidazione rispetto a quelli che si trovano nel core, perciò è importante la concentrazione di antiossidanti nelle membrane. L’antiossidante più abbondante che si trova nelle membrane dei globuli di latte è l’ $\alpha$ -tocoferolo (Toc), invece il  $\gamma$ -tocoferolo, il  $\beta$ -carotene e il retinolo (vitamina A) si trovano nel core dei globuli (Jensen et al., 1996). Altri studi indicano la presenza di piccole quantità di retinolo (Ret) anche nella membrana (Zahar et al., 1995). Il Ret è presente in maggiori quantità nel latte di Bufala rispetto al latte vaccino a differenza del suo precursore, il  $\beta$ -carotene, presente in quantità minore (Correale, 1987). Lo scarso contenuto di carotenoidi conferisce al latte di bufala e ai suoi derivati, come il burro e la mozzarella, un colore bianco opaco, mentre il latte vaccino è caratterizzato da una tipica sfumatura giallastra.

Il grasso contenuto nel latte di bufala è di fondamentale importanza per l’industria casearia, in quanto oltre ad essere insieme alle proteine uno dei principali

componenti che concorre alla resa, può anche essere utilizzato come marker di genuinità della mozzarella.

La produzione di latte, come il ciclo riproduttivo della bufala, è generalmente stagionale, infatti, la maggioranza dei parti si concentra nel periodo da luglio a dicembre poiché l'autunno è la stagione naturale di accoppiamento. In queste condizioni, durante un periodo di lattazione standard (270 giorni) una bufala italiana produce in media 2100 kg di latte con un contenuto percentuale di grassi e di proteine dell'8.37% e del 4.80%, rispettivamente (AIA, 1999). In seguito all'aumento della rilevanza economica dell'industria casearia bufalina, si sono sviluppati diversi studi per far aumentare i livelli di produzione e per far slittare la stagione riproduttiva verso primavera-estate quando la richiesta di mozzarella da parte del mercato è molto alta (Barile et al., 1999).

### **1.4.3 La Mozzarella**

Le prime testimonianze sulla mozzarella di bufala risalgono al 1400, quando era chiamata semplicemente "Mozza", perché la fase finale del processo di lavorazione terminava con la mozzatura. La mozzarella, a causa della deperibilità, era prodotta in scarsa quantità e consumata localmente. Essa si configurava inizialmente, come una varietà meno nobile della provola ed era sicuramente la scarsa conservabilità a giustificare l'assenza, al contrario delle provole, dalle tavole napoletane (Correale, 1987). In seguito, la diffusione della mozzarella sul territorio nazionale è andata di pari passo con lo sviluppo delle vie di comunicazione.

La Mozzarella di Bufala Campana è un formaggio fresco a pasta filata, con un elevato contenuto di acqua (da 55 a 62%) e di grasso (>45%) (Laurienzo et al., 2006). Diversi autori hanno riportato in letteratura la modalità di produzione (Coppola et al., 1988; Coppola et al 1990; Ercolini et al., 2004). Per ottenere un prodotto con una qualità organolettica costante è essenziale standardizzare il rapporto grasso/proteine nel latte di lavorazione. Nei diversi periodi della lattazione, si osservano nel latte di bufala ampie oscillazioni nel contenuto di grasso mentre il contenuto di proteine resta relativamente costante; ciò determina

una grossa variazione nel tempo del rapporto grasso/proteine, e gli effetti di tale fenomeno possono risentirsi in fase di trasformazione. Se il livello del grasso nel latte di bufala è elevato e non è bilanciato da proporzionali quantità di proteina caseificabile si hanno sensibili perdite di grasso sia nel siero (in fase di rottura della cagliata) sia nell'acqua di filatura. Poiché il livello medio di proteine nel latte di bufala è intorno a 4,3-4,7%, il contenuto di grasso nel latte, che assicura una buona riuscita del prodotto, dovrebbe essere intorno al 7% circa. Il formaggio è prodotto da latte crudo intero di bufala al quale viene addizionato sieroinnesto naturale, ottenuto dal siero della lavorazione del giorno precedente. La fase successiva del processo di produzione della mozzarella è definita coagulazione ed è effettuata mediante aggiunta di caglio di vitello. La fase seguente è lo spurgo che consiste nella separazione del siero dalla cagliata. La rottura della cagliata, favorisce lo spurgo, che sarà tanto maggiore quanto più energica è l'azione meccanica. La rottura è effettuata di solito manualmente.

Dopo aver lasciato la cagliata a maturare nel siero caldo (per 4h a 35-37°C) ed acido (pH 4.9-5.1), si ottiene la solubilizzazione dei sali di calcio e quindi la demineralizzazione della pasta di mozzarella che, come risultato, acquista plasticità. Successivamente la pasta di mozzarella viene manipolata in acqua calda (90-95°C) e ridotta a filamenti dai quali si ottiene il formato desiderato, mediante la cosiddetta “mozzatura”. Infine, la mozzarella è immersa nella salamoia, per la salatura e poi nel liquido di governo che è costituito in genere da acqua di filatura cui è aggiunto sale e siero acido diluito. La conservabilità del prodotto è strettamente legata al tipo di materia utilizzata (latte crudo o pastorizzato) e alla tecnologia di trasformazione. Il prodotto ottenuto da latte crudo e sieroinnesto naturale si conserva, immerso nel liquido di governo, per 3-4 giorni a temperatura di 4-10°C senza perdere le sue caratteristiche: superficie esterna lucida, colore bianco, pasta morbida ed elastica, sapore particolare di latte fresco con punte di selvatico (Paonessa et al., 2004).

La carta vincente delle aziende bufaline attuali è stata la creazione, o per meglio dire, l'eredità di un formaggio, che per le sue caratteristiche peculiari è stato ed è molto gradito dai consumatori sia a livello nazionale sia internazionale. In origine la mozzarella era prodotta esclusivamente con latte di bufala ma, con il forte sviluppo del settore, si è diffusa la pratica di produrre latticini contenenti anche latte di vacca, attribuendogli la dicitura di "Mozzarella di Bufala". Nel maggio del 1993 è stato riconosciuto il marchio nazionale D.O.P. ossia la Denominazione di Origine Protetta, che limita l'adozione impropria del nome Mozzarella di Bufala Campana per prodotti che non si attengono al disciplinare studiato e proposto (sulla scorta delle notizie storiche del prodotto) dal consorzio fondato per la tutela di questo prodotto. Nel 1996 con il Regolamento n°1107 si giunge all'attribuzione della certificazione Europea del DOP per il prodotto "Mozzarella di Bufala Campana". I produttori di mozzarelle per ricevere, e mantenere, il marchio "Mozzarella di Bufala Campana" devono impiegare solo latte di bufala allevate nella zona di riferimento e trasformato in loco secondo le regole dettate dal disciplinare. Sono state quindi definite le caratteristiche della materia prima (latte) e del prodotto finito, nonché le aree di produzione DOP che in un primo momento, fino al 2003, comprendevano le province di Caserta, Salerno, Latina e Frosinone ed alcuni comuni della provincia di Napoli, Roma e Benevento. Nel 2003, con il Reg CE n. 1107/96 è stata ampliata la zona DOP, inglobando anche la provincia di Foggia e di Isernia. Solo le mozzarelle prodotte seguendo quanto specificato dal disciplinare, sono effigiate con il simbolo del consorzio. Il marchio del consorzio di tutela, con l'indicazione degli estremi di legge e del numero di autorizzazione rilasciato dallo stesso e apposto sull'incarto, è garanzia di autenticità, sia rispetto alla tipicità del prodotto che alla provenienza geografica.

## 1.5 Omeostasi ossido-riduttiva

I radicali liberi sono specie chimiche con elettroni spaiati, instabili ed altamente reattive, che vengono prodotte nel corso di reazioni enzimatiche basate sul trasferimento di elettroni (Machlin and Bendich, 1987). Gli intermedi parzialmente ridotti dell'ossigeno, definiti anche specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono mediatori di reazioni ossidative, e rappresentano i radicali o le fonti di radicali più diffusi. Sono prodotti dagli enzimi associati alla membrana mitocondriale, dal metabolismo delle cellule endoteliali, da monociti, macrofagi e neutrofili attivati, dagli ioni di metalli di transizione, nonché da molecole introdotte per scopi clinici o per contaminazione ambientale. Esempi tipici sono l'anione superossido ( $O_2^{\cdot -}$ ), il radicale ossidrilico ( $OH^{\cdot}$ ), ed il perossinitrito ( $ONOO^-$ ) (Halliwell, 1994). I radicali liberi attaccano siti specifici di lipidi, proteine e acidi nucleici, formando addotti o rompendo legami: i danni ossidativi alle macromolecole biologiche provocano alterazione o perdita della loro funzione e possono portare alla morte cellulare (Rice Evans et al., 1993; Buttker, 1994). Per esempio, l'attacco radicalico dei lipidi, che sono costituenti delle membrane cellulari e delle lipoproteine circolanti, causa la perossidazione, un processo autocatalitico di degradazione; tale evento è associato alla comparsa di alterazioni delle proprietà fisiologiche delle membrane stesse e, di conseguenza, di tutta la cellula. Le proteine, in seguito all'attacco dei ROS, subiscono alterazioni strutturali, che consistono, di solito, nella trasformazione delle catene laterali degli aminoacidi in addotti che modificano la conformazione e, di conseguenza, la funzione delle proteine stesse. Infine, le alterazioni ossidative del DNA provocano danni strutturali che, se non riparati velocemente e adeguatamente, comportano la perdita della funzione genica e l'avvio di programmi di morte cellulare. Dunque, l'esposizione ai radicali liberi induce una serie di modificazioni ossidative (anche a carico di componenti extra-cellulari), che possono provocare patologie, se non intervengono sistemi di difesa fisiologici.

I sistemi biologici sono protetti contro gli attacchi ossidativi dei radicali liberi da vari tipi di sostanze antiossidanti, che, contribuendo alla cattura dei radicali o all'inattivazione delle reazioni ossidative, costituiscono un efficace sistema di difesa. In condizioni normali, sia le cellule sia i tessuti hanno adeguate difese antiossidanti, intracellulari ed extracellulari, a cui corrispondono categorie sia enzimatiche che non enzimatiche. Gli antiossidanti enzimatici includono la superossido dismutasi, la catalasi e la glutatione perossidasi. Gli antiossidanti non enzimatici, definiti “*scavenger*” (spazzini), reagiscono con i radicali liberi per formare prodotti chimicamente stabili e prevengono i danni ossidativi. Essi rappresentano una linea di difesa primaria contro i processi ossidativi e, spesso, intervengono laddove l'antiossidante enzimatico sia stato inefficace o insufficiente. Gli antiossidanti “*scavenger*” differiscono tra loro in base alle differenti proprietà chimico-fisiche che possiedono; alcuni sono idrofilici (ad esempio l'acido ascorbico), mentre altri sono lipofilici (come il tocoferolo ed il retinolo). Un'eccessiva produzione di ROS e/o una diminuita capacità antiossidante creano uno spostamento dell'equilibrio proossidanti/antiossidanti a favore dei primi. Questa condizione, definita di stress ossidativo può determinare notevoli danni a DNA, lipidi, proteine, enzimi e carboidrati con conseguente instaurarsi di alterazioni funzionali e strutturali della cellula (Halliwell, 1994).

L'omeostasi redox del plasma riflette le alterazioni della risposta adattativa a varie condizioni di stress cui l'organismo può essere sottoposto; basti pensare al fatto che l'infiammazione, un'alimentazione non corretta o una consistente spesa energetica (per processi fisiologici, come la lattazione, l'accrescimento, la gravidanza o il mantenimento della temperatura corporea nella stagione fredda) possono provocare l'alterazione delle difese antiossidanti in circolo ed, eventualmente, l'insorgenza di danni ossidativi con possibili manifestazioni patologiche. La lattazione, essendo una fase d'intenso sforzo produttivo, è associata ad un intensificarsi dei processi metabolici e ad un'aumentata produzione di ROS. Molto spesso, per animali in lattazione, si ricorre alla

supplementazione delle diete con antiossidanti, per evitare l'instaurarsi di condizioni di stress ossidativo. Inoltre, l'esposizione degli organismi al freddo causa un repentino aumento della sintesi di ormoni tiroidei, i quali aumentano la produzione di calore nei mitocondri. Questa risposta, aiuta a mantenere costante la temperatura corporea negli omeotermi. Il consumo di energia e di ossigeno, necessari per la produzione di calore, è associato con la dissipazione di protoni continua da parte dei mitocondri, la quale è correlata positivamente con la produzione di ROS (Ramsey et al., 2000).

Nell'ovario, gli ovociti e le cellule della granulosa possono essere esposti, come tutte le altre cellule, all'azione dannosa dei metaboliti dell'ossigeno. L'omeostasi redox del fluido follicolare ovarico risente di quella plasmatica ed influenza la capacità riproduttiva dell'animale. La parete del follicolo nel momento dell'ovulazione rappresenta un sito attivo di generazione di radicali liberi per la presenza di un'intensa attività metabolica delle cellule della granulosa e un elevato numero di macrofagi, neutrofilo e granulociti. Il fluido follicolare sembra essere ben protetto, anche più del plasma, dagli antiossidanti "scavenger" (Jozwik et al., 1999). È noto che un efficiente sistema di difesa dai danni ossidativi contribuisce a prevenire o limitare i danni cellulari, preservando la sopravvivenza e la funzione steroidogenica delle cellule follicolari (da cui dipende anche la qualità dell'ovocita) fino al momento dell'ovulazione (Thomas et al., 2001); l'omeostasi redox è, inoltre, critica, all'approssimarsi dell'ovulazione, per il completamento della maturazione ovocitaria (Ikeda et al., 2005).

Gli animali appena nati sono particolarmente esposti alle infezioni e il latte, ricco di antiossidanti liposolubili, rappresenta per essi l'unica fonte di Toc e di Ret. In questo modo, la bufala durante l'allattamento fornisce al vitello non solo lipidi, ma anche una sufficiente quantità di antiossidanti utili a salvaguardare la qualità del latte stesso e a prevenire l'ossidazione nei tessuti in accrescimento. L'analisi dello stato ossido-riduttivo del latte è importante per determinare le caratteristiche

qualitative del prodotto, in quanto gli antiossidanti contribuiscono a preservare il latte stesso dai danni ossidativi a lipidi e proteine.

### **Gli antiossidanti non enzimatici**

In questa sezione descriveremo essenzialmente tre antiossidanti: acido ascorbico,  $\alpha$ -tocoferolo e retinolo.

L'acido L-ascorbico (Asc), o **vitamina C**, è un composto idrofilico che, oltre a “ridurre” i ROS direttamente, ricicla la vitamina E ossidata (cioè diventa radicale in seguito alla cessione di un atomo di idrogeno) riportandola allo stato “ridotto”; a sua volta, l'Asc ossidato può essere rigenerato da antiossidanti tiolici (come il glutatione o la cisteina) o rimpiazzato da fonti endogene (cellule specializzate, presenti in alcuni animali) o esogene (alimentazione); se non riciclato, l'Asc ossidato (acido deidroascorbico) è eliminato per via renale.

L'Asc è tra le prime difese antiossidanti ad agire nei sistemi biologici, perché il suo potenziale di ossidazione, cioè la sua tendenza a cedere elettroni, trasformandosi nel radicale dell'ascorbato, è molto alto. Tale radicale è il più stabile tra tutte le specie reattive che si formano nei sistemi biologici, avendo una bassissima affinità per gli elettroni, quindi è un ossidante “terminatore”, cioè l'ultimo composto ad accettare gli elettroni in una catena di reazioni redox (Sharma, 1993). Oltre ad essere presente nel plasma, la vitamina C è concentrata anche in altri fluidi corporei, quali il latte e il fluido follicolare, all'interno dei quali svolge funzioni antiossidanti. L'Asc, che è di fondamentale importanza per la protezione dai danni ossidativi, in alcune specie è sintetizzato endogenamente (Chatterjee, 1970), in altre è assunto esclusivamente attraverso la dieta. La capacità di sintetizzare Asc dipende dalla presenza e dall'attività dell'enzima L-gulonolo- $\gamma$ -lattone ossidasi (GLO, EC 1.1.3.8). I ruminanti dipendono quasi esclusivamente dall'Asc endogeno, perché quello introdotto con la dieta è subito distrutto dai microrganismi del rumine (Nockels, 1988). Per le vacche da latte, la sintesi di Asc, che avviene nel fegato o nei reni, può essere compromessa in condizioni che portano alla diminuzione dei precursori disponibili di Asc, cioè

glucosio e galattosio. Per esempio, durante la lattazione c'è una maggior richiesta di glucosio nella ghiandola mammaria per produrre lattosio (Lindsay, 1959), quindi, in questo periodo questi animali producono meno Asc (Macleod et al., 1999).

La **vitamina E** è l'antiossidante più ampiamente distribuito in natura. Il termine generico vitamina E si riferisce ad almeno otto isomeri strutturali, a seconda della presenza di una catena satura o insatura. Questi composti vengono divisi in due gruppi: i tocoferoli ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) ed i tocotrienoli ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ). La disposizione dei gruppi metilici sull'anello fenolico permette di distinguere i singoli composti delle due classi. Fra questi, l' $\alpha$ -Tocoferolo (Toc) è l'isomero che possiede attività antiossidante più potente (Burton, 1989). Il Toc è una vitamina liposolubile che si concentra nei siti idrofobici delle membrane. Agisce come antiossidante in quanto è in grado di donare un suo atomo di idrogeno (da un gruppo ossidrilico di un anello fenolico della struttura) ai radicali liberi, prevenendo l'insorgere della reazione a catena di trasformazione della struttura ciclica dei lipidi. Questo implica che la vitamina E rimanga con un elettrone spaiato e, pertanto, si comporti essa stessa come un radicale. Il radicale della vitamina E è scarsamente reattivo, si degrada con lentezza ed è, d'altra parte, riconvertibile a vitamina E mediante l'intervento dell'acido ascorbico. Il tocoferolo è essenziale per alcune funzioni corporee quali accrescimento, attività riproduttiva e mantenimento dell'integrità dei tessuti. Inoltre, il tocoferolo stimola la funzione immunitaria (in particolare agisce sui neutrofili), conferisce protezione dall'insorgenza della mastite, ha un'azione protettiva sui lipidi e contribuisce alla stabilizzazione del colore della carne. La vitamina E è veicolata nel plasma dalle lipoproteine a bassa densità (LDL); queste lipoproteine assorbono la vitamina E a livello intestinale e la cedono alle cellule dei vari tessuti tramite l'azione di lipasi che, scindendo i trigliceridi, permettono anche la liberazione del tocoferolo. Nel fegato viene attuata una selezione preferenziale del Toc che viene incorporato nelle lipoproteine epatiche. Questo processo avviene grazie ad una specifica proteina che lega il Toc, la

proteina epatica  $\alpha$ -TTP (proteina che trasporta l' $\alpha$ -Tocoferolo) che è fondamentale per la secrezione di  $\alpha$ -Toc dal fegato al plasma e per il mantenimento della concentrazione normale di  $\alpha$ -Toc nel plasma e nei tessuti extraepatici (Maret et al., 2004).

Con il termine di **vitamina A** sono indicati sia il retinolo che i suoi analoghi, detti retinoidi, di cui sono noti almeno 1500 tipi diversi, tra naturali e sintetici. Anche i carotenoidi posseggono l'attività biologica della vitamina A in quanto possono fungere da provitamine. Gli alimenti di origine animale contengono soprattutto retinolo e suoi esteri, mentre nei vegetali si trovano soprattutto carotenoidi. I retinoidi svolgono importanti ruoli in diverse funzioni fisiologiche, come nella vista, nella proliferazione e differenziamento cellulare, nella risposta immunitaria cellulo-mediata e nella riproduzione, in quanto favoriscono la maturazione dell'ovocita (nel bovino; Ikeda et al., 2005) e lo sviluppo del feto (Gudas et al., 1994 e Jialal et al., 2001). Queste funzioni sono mediate da sei fattori di trascrizione ligando dipendente: tre recettori dell'acido retinoico ( $RAR\alpha$ ,  $RAR\beta$ , and  $RAR\gamma$ ) e tre recettori x dei retinoidi ( $RXR\alpha$ ,  $RXR\beta$ , and  $RXR\gamma$ ), (Mangelsdorf et al., 1994).

La funzione "antiossidante" dei carotenoidi nei sistemi biologici consiste nel comportarsi da "*quencher*" (lett.: "spegnitore") dell'ossigeno singoletto, uno dei più reattivi tra i radicali liberi dell'ossigeno. In pratica, essi assorbono l'energia che si libera dal passaggio di una molecola di ossigeno singoletto dallo stato eccitato a quello fondamentale.

Gli esteri del retinolo e i carotenoidi provenienti dalla dieta vengono incorporati nei chilomicroni e da essi vengono trasportati nel fegato. A questo punto gli esteri del retinolo sono idrolizzati mentre i carotenoidi possono essere trasformati in retinolo o essere secreti dalla cellula all'interno delle VLDL. Il retinolo intracellulare viene portato nel reticolo endoplasmatico dove si lega ad una proteina legante il Ret (retinol binding protein, RBP). Il complesso Ret-proteina è trasportato nelle cisterne del complesso di Golgi e da lì viene espulso dall'epatocita

e trasferito alle cellule deputate all'immagazzinamento dei lipidi, le quali trattengono il Ret, dopo averlo esterificato, nel citoplasma. In caso di necessità, il Ret è rilasciato dagli epatociti legato alla RBP e dalle cellule di immagazzinamento, dopo idrolisi del legame esterico. Nel plasma retinolo-PRB forma un complesso più grande legandosi alla transtiretina, deputata anche al trasporto degli ormoni tiroidei, mentre il Ret viaggia coniugato a varie proteine plasmatiche. I carotenoidi sono trasportati tramite lipoproteine. L'ingresso del Ret nelle cellule è un fenomeno ancora poco chiaro. Una volta entrato nella cellula, il Ret si lega alla proteina legante il Ret cellulare (CRBP) e parte di esso viene esterificato, al fine d'immagazzinarlo, o convertirlo nelle due forme attive: acido retinoico e retinaldeide. La maggior parte del Ret penetrato non subisce modifiche e ritorna nel plasma (O'Byrne et al., 2005). Nell'uomo si conoscono tre CRBP, due delle quali sono tessuto-specifiche; anche se il meccanismo non è ben conosciuto, si sa che CRBP favorisce l'esterificazione del Ret, la conversione di Ret ad acido retinoico, e se nel plasma c'è una carenza di Ret, l'apo-CRBP contribuisce alla mobilitazione di esteri del Ret (Jero´nimo et al., 2004).

## **1.6 Indicatori di qualità dei prodotti**

L'analisi dello stato ossido-riduttivo nei fluidi biologici fornisce indicazioni sullo stato fisiologico degli animali ed è utilizzata come strumento di valutazione del *benessere*.

L'analisi dello stato ossido-riduttivo del latte è importante per determinare le caratteristiche *qualitative* del prodotto.

La qualità dei prodotti animali dipende dalle loro proprietà organolettiche (gusto, odore, aspetto), dal valore nutrizionale e dalla sicurezza sanitaria. Questi fattori sono influenzati negativamente dai processi ossidativi. Ad esempio, l'attacco radicalico dei lipidi, che sono costituenti delle membrane cellulari e delle lipoproteine circolanti, causa la perossidazione, un processo autocatalitico di

degradazione, che influenza la qualità del latte e dei suoi derivati, soprattutto durante lunghi periodi di conservazione. L'ossidazione lipidica comporta la produzione di idroperossidi, i quali, a loro volta, determinano la formazione di composti carbonilici altamente reattivi e volatili, responsabili del cattivo odore dei prodotti conservati. La formazione dei lipoperossidi è anche responsabile dell'irrancidimento della carne fresca e del deterioramento del colore, della consistenza e dell'aroma della carne sia fresca, che congelata o cotta. Inoltre, per quanto riguarda il colore della carne, è probabile che i lipoperossidi promuovano direttamente l'ossidazione dei pigmenti e/o agiscano indirettamente, danneggiando i sistemi deputati alla riduzione di tali pigmenti. È importante sottolineare che le proprietà sensoriali, in base alle quali viene definita la qualità della carne, sono aspetto, consistenza e odore. L'aspetto visivo e, quindi, la stabilità del colore, rappresentano i fattori più importanti, dal punto di vista commerciale, perché influenzano la scelta del consumatore; il colore della carne deve essere brillante, rosso e dimostrare che il prodotto è fresco. Gli antiossidanti presenti negli alimenti hanno un ruolo cruciale nel prevenire le degradazioni ossidative dei lipidi. In particolare, il Toc, che è il principale antiossidante lipofilico presente nella carne e nel latte, protegge dalla perossidazione lipidica: i danni ossidativi ai lipidi sono associati all'ossidazione del Toc e alla produzione di  $\alpha$ -tocoferilchinone. È possibile stabilire il consumo di Toc, indotto dai fenomeni ossidativi e determinare il rapporto tra concentrazione di Toc e concentrazione di tocoferilchinone: il suddetto rapporto può essere usato come indice dell'entità dei danni ossidativi ai lipidi (Fustman et al., 1999).

Un altro bersaglio dei danni ossidativi, nei prodotti animali, è rappresentato dalla matrice proteica. Durante la perossidazione lipidica vengono prodotti intermedi reattivi, quali malondialdeide e 4-idrossinonenale, che possono reagire con i gruppi tiolici o i gruppi amminici delle proteine, determinando la formazione di legami crociati interproteici. In aggiunta, sia nel prodotto fresco sia durante i processi di trasformazione e conservazione può aver luogo la reazione di Maillard, che causa

alterazioni ossidative delle proteine. Gli intermedi dicarbonilici, prodotti dall'ossidazione degli zuccheri nelle fasi iniziali della reazione di Maillard, comportano la formazione di legami crociati tra proteine. Altre modificazioni ossidative possono essere indotte da reazioni catalizzate da metalli, che possono portare alla formazione di dimeri di tirosina e, quindi di ponti inter- o intramolecolari. Infine, il perossinitrito, un potente ossidante prodotto dalla reazione tra superossido e ossido nitrico, può causare la nitratura dei residui di tirosina delle proteine (Halliwell, 1997).

Le modificazioni ossidative delle proteine possono provocare la diminuzione della digeribilità delle proteine stesse e, di conseguenza, una riduzione della disponibilità di aminoacidi assorbibili a livello intestinale (Umetsu e Chuyen, 1998). Infatti, non sono state descritte fino ad ora proteasi, plasmatiche o dei succhi gastrici, in grado di degradare i polipeptidi contenenti aminoacidi ossidati; inoltre, non sono noti sistemi di trasporto associati alla membrana plasmatica deputati al trasferimento di aminoacidi modificati ossidativamente all'interno degli enterociti. Quindi gli aminoacidi delle proteine ossidate vengono presumibilmente inviati al fegato ed eliminati, anziché essere assorbiti, con riduzione del valore nutrizionale del prodotto. Gli aminoacidi ossidati o, in generale, i prodotti della degradazione ossidativa delle proteine, potrebbero risultare tossici per l'organismo, riducendo la sicurezza dei prodotti alimentari. Infine, la formazione di aggregati proteici potrebbe comportare l'alterazione della consistenza e delle proprietà organolettiche dei prodotti alimentari. L'analisi delle degradazioni molecolari può, quindi, essere utilizzata oltre che per la caratterizzazione qualitativa del prodotto, anche per stabilire l'effetto dei processi di trasformazione e conservazione, nonché l'influenza delle condizioni fisiologiche dell'animale sulle proprietà del prodotto.

## 2. Scopo

Questo progetto di dottorato ha puntato a valorizzare e caratterizzare prodotti tipici della regione Campania sviluppando tre tipi di indagini:

1. un'analisi è stata condotta su proteine che legano antiossidanti nell'epitelio alveolare della ghiandola mammaria della bufala. Questo tipo di indagine ha mirato all'individuazione e caratterizzazione di una proteina citosolica che lega il retinolo e permette il suo trasporto dal plasma al latte;
2. un'analisi del benessere animale in differenti condizioni di allevamento, per identificare condizioni economicamente in grado di garantire contemporaneamente il benessere animale. A tal fine sono stati valutati alcuni parametri dello stato ossido-riduttivo nei fluidi biologici, la produzione di latte e la *performance* riproduttiva delle bufale stabulate a diverse densità o a diversa temperatura ambientale;
3. un'analisi qualitativa del latte di bufale e del suo principale prodotto di trasformazione, la Mozzarella di Bufala Campana, per identificare marcatori di "tipicità" utili alla caratterizzazione e alla valutazione della qualità della mozzarella di bufala. L'uso di tali marcatori potrebbe consentire di distinguere la Mozzarella di Bufala Campana da quella prodotta con il latte bovino, suo principale concorrente sul mercato. A tal fine è stata valutata l'entità dei danni ossidativi sia a carico della componente lipidica sia della componente proteica.

### 3. Materiali

Per i saggi ELISA, sono state utilizzate micropiastre da 96 pozzetti (del tipo easy wash) della Nunc. Sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich i seguenti prodotti: albumina di siero bovino (BSA); dicloruro di o-fenilendiammina (OPD); perossido di idrogeno; anticorpi contro la regione Fc degli anticorpi di coniglio, coniugati con perossidasi di rafano (IgG policlonali di capra, da ora indicati come Ab GAR-HRP); anti-dinitrophenylhydrazine (anti-DNP) sviluppato in coniglio. Gli anticorpi anti-nitrotirosine sviluppati in coniglio sono stati acquistati presso la Calbiochem. Le resine Sephacryl S-200 e Superdex 75 sono state acquistate dalla Pharmacia. I reattivi per i dosaggi colorimetrici delle proteine sono stati acquistati dalla BioRad. L'albumina nitrata (Nitrotirosina-BSA) è stata acquistata dalla Cayman (Ann Arbor, MI, USA). I solventi organici della massima purezza per i dosaggi cromatografici (HPLC) sono stati forniti dalla Delchimica (agenzia di Napoli). Tutti gli standard per l'analisi mediante HPLC sono stati acquistati dalla Sigma. Sono state usate colonne Nucleosil 100-NH<sub>2</sub> (5 µm, 250 x 4.6 mm) della Macherey-Nagel (Duren, Germany). La colonna Nova-Pack C18 (4 µm, 150 x 3,9 mm) è stata acquistata dalla Waters [Milford, MA, USA]. EN<sup>3</sup>H-ANCE Spray e [11,12-<sup>3</sup>H]-all trans Retinolo (45µCi/mmol) sono stati acquistati dalla NEN Life Science (Boston, USA). Materiale monouso, sali ed altre sostanze chimiche per la preparazione e la manipolazione di reattivi e soluzioni, sono stati acquistati da rivenditori di Napoli.

## 4. Metodi

### 4.1. Animali (prima sperimentazione)

Per la sperimentazione della stabulazione a diversa temperatura sono state usate bufale pluripare (età media:  $7.1 \pm 2.7$ ) allevate in un'azienda del salernitano. Le bufale sono state divise in quattro gruppi: due gruppi in asciutta (non in lattazione, gravide), uno stabulato in estate ( $n = 9$ ; temperatura ambientale minima:  $+24^{\circ}\text{C}$ ) e uno in inverno ( $n = 9$ ; temperatura minima esterna:  $-2^{\circ}\text{C}$ ), e due gruppi in lattazione (40-170 g *postpartum*) uno stabulato in estate ( $n = 13$ ) e uno in inverno ( $n = 17$ ). Le bufale sono state nutrite *ad libitum*; le bufale in asciutta hanno ricevuto una dieta contenete 53.3 g di protidi grezzi, 565.8 g di frazione fibrosa neutro detersa (NFU) e 0.59 Unità Foraggiere Latte (FU = 1.700 Kcal o 7.11 MJ) (INRA, 1988) per kg di materia secca. Gli animali in lattazione hanno ricevuto una dieta contenete 155.4 di protidi grezzi, 402.3 g di NFU, e 0.84 FU Latte per Kg di materiale secco. La dieta degli animali in lattazione, ma non degli animali in asciutta, era supplementata con Vitasol complex, contenete una miscela di sali minerali e vitamine A, D, E. La concentrazione di Ret e di Toc nella razione era di 12 e 13.5 mg/Kg di cibo, rispettivamente. Il consumo di cibo era 18-20 Kg al giorno, per cui la quantità di Ret e di Toc assunta quotidianamente era di circa 450 e 520 mg, rispettivamente, per gli animali in lattazione, e di circa di 200 e di 240 mg rispettivamente per le bufale in asciutta. Il sangue degli animali è stato prelevato di mattina presto (dopo la prima mungitura) dalla vena giugulare ed il plasma è stato ottenuto per centrifugazione (500 g; 15 min;  $4^{\circ}\text{C}$ ). I livelli di creatinina, urea, acidi grassi non esterificati (NEFA), acido  $\beta$ -idrossibutirrico (BHB) bilirubina, transaminasi glutammato-ossalacetato (GOT),  $\gamma$ -glutamyl transferasi (GGT), colesterolo, trigliceridi, glucosio Insulina e  $T_3$  sono stati misurati mediante saggi spettrofotometrici, utilizzando specifici kit.

**Somministrazione di  $T_3$ :** A due bufale in lattazione in estate (temperatura esterna:  $+24^{\circ}\text{C}$ ), di 650 kg di peso corporeo, è stato iniettato, nel muscolo dell'anca, l'ormone tiroideo  $T_3$  (2.6 mg) in 10 mL di NaCl 0.9%. Il sangue e il latte, necessari

per la titolazione degli antiossidanti, sono stati raccolti prima dell'iniezione e 6 ore dopo. Gli esperimenti sono stati eseguiti in accordo con le direttive nazionali. Gli animali non hanno sofferto in nessuno stadio degli esperimenti.

#### **4.2. Rilevamento della proteina citosolica che lega il Retinolo**

Sono stati macellati tre bufali in lattazione in estate e tre in inverno. Campioni di sangue e di latte sono stati raccolti da ciascun animale prima della macellazione, uguali aliquote di campioni omologhi sono stati raggruppati per titolare T<sub>3</sub>, Toc e Ret. Le ghiandole mammarie dei tre animali sono state sezionate e processate separatamente. Le cellule dell'epitelio alveolare sono state accuratamente raschiate e omogeneizzate a 4°C in 20mM Tris-HCl, pH 7.3, contenete 0.32 M saccarosio e 1mM fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF). I tre omogenati sono stati centrifugati (11000 g; 15 min; 4°C) e i pellet sono stati scartati. Uguali aliquote di surnatanti sono state unite e poi centrifugate (105000 g; 50 min; 4 °C). Il surnatante finale, rappresentante l'estratto citosolico, è stato analizzato per misurare la concentrazione proteica. Alle proteine citoplasmatiche (4 mg) è stato aggiunto 0.25 nmol di Toc e 45 µCi/nmol di <sup>3</sup>H-Ret in 1 mL di TBS (20 mM Tris-HCl, 130 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoetanol, pH 7.3) contenente 0.5 mM di PMSF, 10 µg/mL leupeptina, 10 µg/mL di aprotinina, 5 mM EDTA. Dopo 4 ore di incubazione a 4°C in agitazione al buio, un'aliquota di questa miscela (0.3mL) è stata caricata su una colonna Superdex 75 (1 x 85 cm) equilibrata con TBS. La proteina è stata eluita con lo stesso tampone a un flusso di 7 mL/ora. Sono state raccolte frazioni da 0.5 mL ed è stata misurata la radioattività e l'assorbanza allo spettrofotometro a 280 nm. Le frazioni sono state, infine, analizzate mediante HPLC per titolare Ret e Toc, secondo la procedura descritta di seguito. La resa degli antiossidanti raccolti dai campioni preparati per l'analisi all'HPLC è stata determinata misurando la radioattività prima e dopo la deproteizzazione e la centrifugazione delle frazioni eluite.

L'eluizione delle forme micellari delle vitamine o delle forme libere è stata analizzata in esperimenti di controllo, mediante incubazione di 0.25 nmol di Toc e 45  $\mu\text{Ci/nmol}$  di  $^3\text{H}$ -Ret in TBS, in assenza di proteine citoplasmatiche, e successiva cromatografia (come sopra). In ulteriori esperimenti di controllo, ciascuna vitamina è stata incubata ad una concentrazione tre volte superiore rispetto all'altro antiossidante in presenza delle proteine citoplasmatiche, per controllare se si verificavano variazioni nella concentrazione di forme di Ret e Toc legati alle proteine.

**Elettroforesi:** La frazione proteica con il più alto contenuto di radioattività, ottenuta dalla cromatografia descritta sopra, è stata analizzata per elettroforesi su un gel discontinuo di poliacrilammide. Con la procedura non denaturante è stata usata una fase superiore di 5% di poliacrilammide in 125 mM Tris-HCl pH 6.8, una fase inferiore di 12.5% di poliacrilammide in 375 mM Tris-HCl pH 8.8, e un tampone di corsa di 25 mM Tris-192 mM glicina a pH 8.4. Un'aliquota di 30  $\mu\text{L}$  di frazione proteica è stata miscelata con 15  $\mu\text{L}$  di *sample buffer* (188 mM Tris-HCl pH 6.8, 30% glicerolo, e 0.1% di blu di bromofenolo), e sottoposta ad elettroforesi. Dopo l'elettroforesi (50 V; 4 h) il gel è stato fissato e colorato, oppure processato direttamente per autoradiografia. La soluzione per fissare è costituita da isopropanolo:acido acetico:acqua (25:10:65 rispettivamente, v/v/v). Per la colorazione è stato usato Coomassie brilliant blue R-250 (0.02% in fissativo). La decolorazione è stata eseguita in agitazione per 12-24 ore in 10% acido acetico. L'autoradiografia dei gel non fissati è stata eseguita, previo trattamento con EN $^3\text{H}$ -ANCE solution, mediante esposizione ad una lastra per raggi X (Fuji, Tokio, Japan) per 48 ore a  $-80^\circ\text{C}$ .

L'elettroforesi in condizioni denaturanti e riducenti è stata eseguita su gel discontinuo, sostanzialmente in accordo al metodo di Laemmli (1970). Per preparare il gel, è stata utilizzata una soluzione madre di acrilammide e bis-acrilammide (N,N'-metilene-bisacrilammide), rispettivamente al 30% ed allo 0,8%. Il gel di separazione era costituito da una soluzione di poliacrilammide al

15%, contenente 300 mM Tris-HCl a pH 8.8 e 0,1% SDS; lo strato superiore di gel (stacking) era costituito da una soluzione di poliacrilammide al 6%, contenente 137 mM Tris-HCl a pH 6.8 e 0.1% SDS. I campioni sono stati incubati a 100°C per 5 min in un tampone riducente e denaturante (62,3 mM Tris-HCl a pH 8.6, 10% di glicerolo, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.3% blu di bromofenolo, 5% SDS) (O'Farrell, 1975), e, poi sottoposti ad elettroforesi. La corsa elettroforetica è avvenuta a 30 mA per 90 min con un tampone di corsa di 25 mM Tris, 192 mM glicina, 1% SDS a pH 8.4. Le proteine frazionate sono state fissate e colorate come sopra, oppure processate per il legame al  $^3\text{H}$ -Ret. Nell'ultimo caso il gel è stato abbondantemente lavato con il tampone di trasferimento (25 mM Tris; 192 mM glicina, 15% metanolo) per rimuovere l'SDS e poi le proteine sono state trasferite sotto campo elettrico su una membrana di nitrocellulosa (Schleicher-Schuell, Dassel, Germania). Le membrane sono state incubate con 0.3  $\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Ret in TBS (16 ore, 10°C), lavate abbondantemente con lo stesso tampone, asciugate a temperatura ambiente, trattate con EN $^3\text{H}$ -ANCE Spray e, infine, esposte alle lastre per raggi X (-80°C, 192 ore).

#### **4.3. Animali (seconda sperimentazione)**

La sperimentazione sulla stabulazione a diversa densità è stata condotta tra gennaio ed aprile. Sono stati analizzati gruppi di animali omogenei per la data del parto, per il peso, per l'alimentazione e per le condizioni climatiche, ma che differiscono per le condizioni di stabulazione. Gli animali sono stati sottoposti a visita veterinaria per mezzo della palpazione trans-rettale, e a verifica di eventuali patologie del puerperio. Al fine di valutare l'effetto della stabulazione sui livelli plasmatici di Ret e Toc, sono stati analizzati solo animali che non manifestavano fenomeni infiammatori transienti, in modo da essere certi che i valori di questi antiossidanti non fossero influenzati da fenomeni ossidativi associati all'infiammazione.

Le bufale sono state suddivise in due gruppi, in base alla densità di stabulazione: gruppo S (stressate, n = 50, densità = 13.3 m<sup>2</sup>/capo) e gruppo NS (non stressate, n = 50, densità = 27.0 m<sup>2</sup>/capo).

Le bovine, primipare di razza Frisona, sono state suddivise nei gruppi S<sub>B</sub> (n = 6; densità = 13.3 m<sup>2</sup>/capo) e NS<sub>B</sub> (n = 6; densità = 27.0 m<sup>2</sup>/capo).

Dopo 60 giorni di stabulazione nelle condizioni descritte, l'ovulazione delle bufale è stata sincronizzata con il programma Ovsynch-TAI, che prevede il trattamento con un agonista del GnRH. Successivamente, 40 bufale di ogni gruppo sono state fecondate con l'inseminazione artificiale (AI). In ciascun gruppo, le dieci bufale non fecondate, sono state sottoposte a prelievi di sangue e ad aspirazione transvaginale del fluido follicolare al momento dell'ovulazione. Al ventiseiesimo giorno dopo AI, la presenza della gravidanza è stata accertata monitorando le bufale con gli ultrasuoni. Lo stadio del ciclo ovarico e la funzione luteale sono stati valutati misurando, tramite RIA, la concentrazione di estradiolo (E<sub>2</sub>) e progesterone (P<sub>4</sub>) in campioni di sangue prelevati dopo 10, 20 e 25 giorni dall'AI. Valori plasmatici di P<sub>4</sub> >1.5 ng/mL sono stati considerati come indicativi della presenza di un corpo luteo. La diagnosi della gravidanza è stata confermata dopo 45 giorni dall'AI con l'ultrasonografia.

Campioni di sangue sono stati prelevati dalle bufale sottoposte ad AI (45 giorni dopo il trattamento); campioni di sangue e fluido follicolare sono stati prelevati dalle bufale non fecondate (al momento dell'ovulazione). In tali campioni sono stati titolati gli antiossidanti liposolubili (Ret e Toc), gli antiossidanti idrofilici (Asc), e alcuni marcatori di ossidazione proteica (nitrotirosine, N-Tyr e carbonili legati a proteine, PC).

Anche nel caso della sperimentazione sulle bovine nei campioni di plasma sono stati titolati gli antiossidanti liposolubili (Ret e Toc), gli antiossidanti idrofilici (Asc), e i marcatori di ossidazione proteica (N-Tyr e PC).

Il latte raccolto dalle bufale e dalle bovine in lattazione è stato analizzato per il contenuto di grasso, di lattosio, di proteine, di cellule somatiche; nel latte bovino sono stati titolati anche il Ret e il Toc.

#### **4.4. Titolazione di estradiolo e progesterone**

Le concentrazioni di progesterone ( $P_4$ ) ed estradiolo ( $E_2$ ) sono state determinate nel plasma mediante l'uso di specifici kit, in accordo con le metodiche suggerite dalla ditta produttrice (Linco, Millipore).

#### **4.5. Preparazione dei campioni di mozzarella**

La Mozzarella di Bufala Campana, DOP, è stata acquistata presso dodici caseifici della provincia di Salerno, e la mozzarella prodotta con il latte bovino, da dieci differenti industrie italiane, è stata acquistata presso supermercati locali.

Campioni di 2gr sono stati prelevati da ogni mozzarella (a 2 cm o a 0.3 cm dalla superficie) e frammentati attraverso siringa (senza ago). Una parte dei campioni è stata sottoposta a omogeneizzazione e un'altra parte a saponificazione. L'omogeneizzazione è stata eseguita in tampone citrato (0.2 M, pH 8, 1/1 peso/volume) a temperatura ambiente; il materiale è stato poi centrifugato (a 10000 g per 10 min., 4°C) per separare il sedimento corpuscolato dalle due fasi liquide: una densa e gialla, solubile solo in solventi organici, ed un surnatante opalescente, liberamente miscibile con soluzioni acquose. Quest'ultima fase è stata sottoposta ad analisi (titolazione di Asc, di PC, di DT, di aggregati proteici e TAC). L'estrazione delle vitamine liposolubili necessaria per la titolazione con HPLC è stata eseguita incubando il campione con pirogallolo + KOH + etanolo + NaCl 1%, a 70°C per 1 ora. Alla miscela è stato aggiunto poi NaCl 1% e dopo vigorosa agitazione (su vortex per 2 min) sono state eseguite tre estrazioni successive con 2 mL di etere:etilacetato 9:1. Il surnatante così recuperato è stato essiccato sotto

flusso di N<sub>2</sub> e poi risospeso in 200 µL di metanolo, per la successiva analisi all'HPLC.

#### 4.6. Titolazione dei gruppi Carbonili

La titolazione dei carbonili, tramite ELISA, è stata effettuata sfruttando la reazione di questi gruppi con il 2,4-Dinitrophenylhydrazina (DNP), formando il 2,4-Dinitrophenylhydrazone, che è stato rilevato tramite anticorpo IgG anti-DNP, in accordo con la metodica pubblicata (Buss et al., 1997). Il campione (plasma, fluido follicolare o omogeneizzato di mozzarella) è stato, preliminarmente, diluito (1:1) in tampone PBS (12.5 mM Sodio-Fosfato a pH 7.4, 140 mM NaCl). Un'aliquota di campione (15 µl) è stata incubata con 45 µl di DNP (10 mM in 6 M Guanidina-HCl, 0.5 M Potassio-Fosfato a pH 2.5) per 45 minuti a temperatura ambiente. La miscela è stata poi diluita (1:500, 1:1.000, 1:2.000, 1:5.000 e 1:10.000) con tampone di *coating* (10 mM Sodio-Fosfato a pH 7.0, 140 mM NaCl). Aliquote di ciascuna diluizione (200 µl) sono state depositate nei pozzetti della micro piastra ELISA ed incubate per tutta la notte a 4°C. Dopo l'incubazione, le piastre sono state lavate 5 volte con tampone PBS. Successivamente, è stata saturata la capacità legante della plastica (fase di *blocking*) con un tampone contenente 0.1% BSA ridotta (con NaBH<sub>4</sub> in 2% BSA), in PBS, incubando per 1.5 h a temperatura ambiente; dopo il *blocking*, le piastre sono state lavate come precedentemente descritto. A questo punto, si è proceduto all'incubazione con l'anticorpo primario (IgG di coniglio anti-DNP) diluito 1:3000, in 200 µl con il tampone DB modificato (0.1% BSA ridotta, 20 mM Tris-HCl a pH 7.3, 130 mM NaCl, 0.1% Tween-20). L'incubazione è stata effettuata a 37° C per 1 ora. È stato, quindi, ripetuto il lavaggio delle piastre e, poi, si è proceduto con l'incubazione di 200 µl di anticorpo secondario (GAR IgG), diluito 1:2000 nel tampone DB. Anche in questo caso l'incubazione è stata di 1 h a 37°C. Dopo il lavaggio delle piastre, sono stati aggiunti 200 µl di substrato per la perossidasi (20 mg di OPD e 120 µl di 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

in 50 ml di una soluzione costituita da 30 mM acido citrico e 75 mM NaHPO<sub>4</sub> a pH 5). Dopo 60 minuti di incubazione a 37°C, sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 100 µl di 2,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, per bloccare la reazione. In seguito all'incubazione con il substrato, si è sviluppato colore in misura proporzionale alla concentrazione di enzima (legato all'anticorpo secondario), rispecchiando la concentrazione degli immunocomplessi formati tra anticorpo primario e antigene: la misura spettrofotometrica dell'assorbanza a 492 nm ha permesso, quindi, di determinare indirettamente la quantità di antigene presente nel pozzetto, che è stata espressa in nmol di carbonili/mg di proteina.

#### **4.7. Titolazione di dimeri di tirosina**

I DT sono stati saggiati allo spettrofluorimetro, registrando lo spettro di emissione a 410 nm dopo l'eccitazione a 325 nm (Huggins et al., 1993)

#### **4.8. Titolazione di nitrotirosine**

La concentrazione delle proteine ntrate è stata determinata mediante un saggio ELISA di tipo competitivo (Khan et al., 1998). La concentrazione delle nitrotirosine (N-Tyr), in soluzioni standard di BSA ntrata (nitro-BSA), è stata determinata misurando l'assorbanza a 430 nm, usando il coefficiente di estinzione molare 4500 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a pH 9.6 (Ye et al., 1996). I campioni (plasma, fluido follicolare) sono stati diluiti con tampone di *coating* (7,3 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 17 mM NaHCO<sub>3</sub> e 1,5 mM NaN<sub>3</sub>, pH 9,6). Per ciascun campione sono state utilizzate le seguenti diluizioni: 1:500, 1:2.000, 1:4.000, 1:6.000, 1:8.000, 1:20.000. Aliquote (50 µl) di ciascuna diluizione sono state depositate, in duplicato, nei pozzetti della micropiastra, che è stata successivamente incubata per tutta la notte a 4°C. Dopo l'incubazione, le piastre sono state lavate (due lavaggi con T-TBS tampone: 130 mM NaCl, 0.05 % Tween 20, 20 mM Tris-HCl, pH 7.3, e due con TBS: 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.3) ed incubate con un tampone di *blocking*,

contenente BSA (0.5% BSA, 20 mM Tris-HCl a pH 7.3 130 mM NaCl,) per 1 ora a 37°C. Al termine della fase di *blocking*, le piastre sono state lavate e si è proceduto all'incubazione con anticorpi di coniglio anti-N-Tyr, diluiti 1:4000 (in DB: T-TBS supplementato con 0.25% BSA). L'incubazione è stata effettuata a 37°C per 1 ora. È stato, quindi, ripetuto il lavaggio delle piastre e si è proceduto all'incubazione con GAR-HRP IgG (anticorpi di capra, contro la regione Fc degli anticorpi di coniglio, legati a perossidasi), diluiti 1:5000 come sopra. Anche in questo caso, l'incubazione è stata di 1 ora a 37°C. Dopo il lavaggio delle piastre, sono stati aggiunti 100 µl della soluzione di substrato per la perossidasi. Dopo 50 minuti di incubazione a 37°C, sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 50 µl di 2,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, per bloccare la reazione. La misura spettrofotometrica (A<sub>492</sub>) ha permesso, quindi, di determinare indirettamente la quantità di antigene presente nel pozzetto.

#### **4.9. Saggio TAC**

La misura della Capacità Antiossidante Totale (TAC) è basata sull'aggiunta di un sistema di produzione di specie reattive dell'ossigeno (Metamioglobina e perossido di idrogeno) in un campione contenente un bersaglio (ABTS) che, una volta ossidato, può essere rivelato spettrofotometricamente a 734 nm. In campioni di controllo, la formazione del bersaglio ossidato viene prevenuta dalla presenza di un antiossidante scavenger standard (Trolox): la capacità antiossidante del campione viene, così, espressa in termini di *unità Trolox* (Rice-Evans et al., 1994).

#### **4.10. Valutazione degli aggregati di αlattoalbumina**

Le proteine delle mozzarelle sono state separate per cromatografia in condizioni denaturanti e riducenti. I campioni di proteine solubilizzate (100 µL cui sono stati aggiunti 0.1% di β-mercaptoetanolo) sono stati caricati su una colonna Sephacryl S-200 (1.5 x 12 cm), equilibrata in 15 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 0.02% SDS, pH 7.3 a 0.9 mL/min. Le proteine di ciascun omogenato sono state separate in due

picchi le cui eluizioni sono state seguite misurando l'assorbanza a 280nm delle frazioni raccolte. La quantità di  $\alpha$ lattoalbumina in ogni frazione è stata misurata mediante ELISA. In dettaglio: alle frazioni è stato aggiunto 1/9 di volume di tampone di *coating* 10X e aliquote (50  $\mu$ l) di ciascuna frazione diluita sono state incubate, in triplicato, nei pozzetti della micropiastre, per tutta la notte a 4°C. Dopo l'incubazione, le piastre sono state lavate (due lavaggi con T-TBS e due con TBS) ed incubate con il tampone di *blocking* per 1 ora a 37°C. Al termine della fase di *blocking*, le piastre sono state lavate e si è proceduto all'incubazione con anticorpi anti- $\alpha$ lattoalbumina, diluiti 1:3000 (in DB). L'incubazione è stata effettuata a 37°C per 1 ora. È stato, quindi, ripetuto il lavaggio delle piastre e si è proceduto all'incubazione con GAR-HRP IgG (anticorpi di capra, contro la regione Fc degli anticorpi di coniglio, legati a perossidasi), diluiti 1:4000 come sopra. Anche in questo caso, l'incubazione è stata di 1 ora a 37°C. Dopo il lavaggio delle piastre, sono stati aggiunti 100  $\mu$ l della soluzione di substrato per la perossidasi. Dopo 60 minuti di incubazione a 37°C, sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 50  $\mu$ l di 2,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, per bloccare la reazione. La misura spettrofotometrica (A<sub>492</sub>) ha permesso, quindi, di determinare indirettamente la quantità di antigene presente nel pozzetto.

#### **4.11. Titolazione di antiossidanti idrosolubili**

I campioni usati per la titolazione di Asc sono stati preparati aggiungendo 120  $\mu$ L di etanolo freddo a 30  $\mu$ L di latte o di plasma. La soluzione etanolica è stata agitata su vortex per 5 min, centrifugata (12000 g; 1 min; 4°C) ed è stato scartato il pellet proteico. Il surnatante (20  $\mu$ L) è stato iniettato in una colonna per scambio ionico (Nucleosil 100-NH<sub>2</sub>, 250 x 4.6 mm, particelle di 5  $\mu$ m) per HPLC. La cromatografia è stata eseguita a 0.7 mL/min con 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:CH<sub>3</sub>CN (35:65, v/v) come fase mobile. La rivelazione dell'eluato è stata ottenuta mediante spettrofotometria con *diode array* (intervallo di scansione 200-300 nm; lunghezza d'onda selezionata per il rilevamento quantitativo: 275 nm). Per le analisi

quantitative è stata costruita una retta di taratura ( $r^2 \geq 0.9997$ ) ottenuta iniettando diverse (12) quantità di standard.

#### **4.12. Titolazione di antiossidanti liposolubili**

Per la titolazione di Ret, di Toc e di TQ, i campioni (15  $\mu\text{L}$ ) sono stati miscelati con 100  $\mu\text{L}$  di isopropanolo:metanolo freddo (1:1, v/v). La miscela è stata agitata vigorosamente su vortex per 5 min, centrifugata (12000g; 1min; 4°C) e 20  $\mu\text{L}$  di surnatante è stato analizzato mediante HPLC. Gli antiossidanti liposolubili sono stati frazionati su colonna di octadecilsilano, Nova-Pack C18 (150 x 3.9 mm, 4 $\mu\text{m}$ ) usando come fase mobile isopropanolo:metanolo:acqua (46.25:46.25:7.5; v/v/v). La cromatografia è stata eseguita a 0.8 mL/min a 30°C. Ret è stato analizzato impostando  $\lambda_{\text{EX}} = 325$  nm e  $\lambda_{\text{EM}} = 465$  nm da 0 a 5 min, invece per il Toc  $\lambda_{\text{EX}} = 295$  nm e  $\lambda_{\text{EM}} = 335$  nm da 5 a 8 min. Il TQ è stato rivelato spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 265 nm. I dati sono stati ottenuti mediante integrazione dei picchi di eluato a tempi di ritenzione cromatografica corrispondenti a quelli degli *scavenger* analizzati; i tempi di ritenzione sono stati previamente determinati con accuratezza mediante l'uso di marcatori puri. Soluzioni stock di Ret, di Toc e di TQ sono state preparate in etanolo e il titolo è stato analizzato mediante spettrofotometria. La curva di calibrazione ( $r^2 \geq 0.9998$ ), ottenuta mediante l'iniezione di diverse (12) quantità di standard, è stata usata per le analisi quantitative.

#### **4.13. Saggio colorimetrico per la determinazione della concentrazione proteica totale.**

La concentrazione proteica di campioni o standard di proteine sciolte in soluzioni fisiologiche è stata determinata mediante microsaggi colorimetrici, secondo una metodica pubblicata (Bradford, 1976). È stata preparata una retta di taratura, in base a soluzioni con concentrazione nota di BSA in TBS: sono state utilizzate otto

soluzioni standard a concentrazione crescente. I campioni da titolare sono stati diluiti 1:100 con TBS e da queste diluizioni sono state prelevate un'aliquota di 10  $\mu\text{L}$  ed una di 5  $\mu\text{L}$  cui sono stati aggiunti, rispettivamente, 390  $\mu\text{L}$  e 395  $\mu\text{L}$  di TBS ( $V_f = 400 \mu\text{L}$ ). Ogni aliquota è stata analizzata in triplicato. Infine, sia alle soluzioni standard, sia ai campioni, sono stati aggiunti 100  $\mu\text{L}$  di soluzione colorante a base di Coomassie (Bio-rad). Il colore di tale reattivo passa dal rosso al blu in maniera proporzionale alla concentrazione proteica di ogni campione: l'intensità del cambiamento di colore è stata rilevata misurando spettrofotometricamente l'assorbanza a 595 nm. Dai valori di assorbanza ottenuti, grazie alla retta di taratura (costruita esprimendo l'assorbanza degli standard in funzione della concentrazione) e tenendo conto delle diluizioni, è stata calcolata la concentrazione proteica dei campioni, espressa in mg/mL.

#### **4.14. Analisi statistica**

Ciascun campione è stato analizzato in triplicato. I dati sono espressi come media  $\pm$  errore standard. Per l'analisi statistica è stato usato il programma "Graph Pad Prism 3" (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

## 5. Risultati

### 5.1. Effetto della temperatura sulla stabulazione delle bufale

Uno degli obiettivi del mio progetto è stato lo studio dell'effetto della temperatura sul metabolismo animale, sullo stato redox plasmatico e sulle caratteristiche qualitative del latte. Va, infatti, ricordato che le variazioni della temperatura influenzano lo stato fisiologico degli animali e che l'esposizione al freddo causa un repentino aumento della sintesi di ormoni tiroidei. Questi, a loro volta, aumentano la produzione di calore nei mitocondri (in modo da mantenere costante la temperatura corporea) che è, a sua volta, associata alla produzione di ROS (Ramsey, 2000).

#### 5.1.1. Analisi delle condizioni fisiologiche

Sono stati esaminati quattro gruppi di bufale pluripare (età media:  $7.1 \pm 2.7$ ):

- 1) in asciutta (non in lattazione, gravide;  $N = 9$ ) in inverno
- 2) in lattazione (40-170 gg *postpartum*;  $N = 17$ ) in inverno (temperatura esterna  $-2^\circ\text{C}$ )
- 3) e in asciutta ( $N = 9$ ) in estate
- 4) in lattazione ( $N = 13$ ) in estate (temperatura esterna  $+ 24^\circ\text{C}$ ).

Da ciascun animale è stato prelevato un campione di sangue, dopo la mungitura del mattino, ed il plasma è stato utilizzato per le analisi. Per verificare che gli animali fossero in buone condizioni fisiologiche sono stati misurati i livelli di creatinina, urea, acidi grassi non esterificati (NEFA), acido  $\beta$ -idrossibutirrico (BHB), bilirubina, transaminasi glutammato-ossalacetato (GOT),  $\gamma$ -glutamyl transferasi (GGT), colesterolo, trigliceridi, glucosio, insulina e  $T_3$ . Come si evince dalla Tabella 1, sono state rilevate variazioni stagionali dei livelli plasmatici di  $T_3$ , creatinina, urea, NEFA, BHB e glucosio, sia nelle bufale in lattazione che in quelle in asciutta.

Inoltre, sia in inverno sia in estate, i livelli plasmatici di urea, colesterolo, glucosio, GOT e BHB sono stati più alti nelle bufale in lattazione rispetto a quelle in asciutta, mentre i livelli di creatinina, bilirubina e trigliceridi sono risultati più elevati nelle bufale in asciutta. I livelli di NEFA delle bufale in lattazione sono risultati più alti in inverno che in estate. La concentrazione di insulina, nelle bufale in lattazione in estate, è risultata significativamente più alta rispetto a quella delle bufale in asciutta nella stessa stagione.

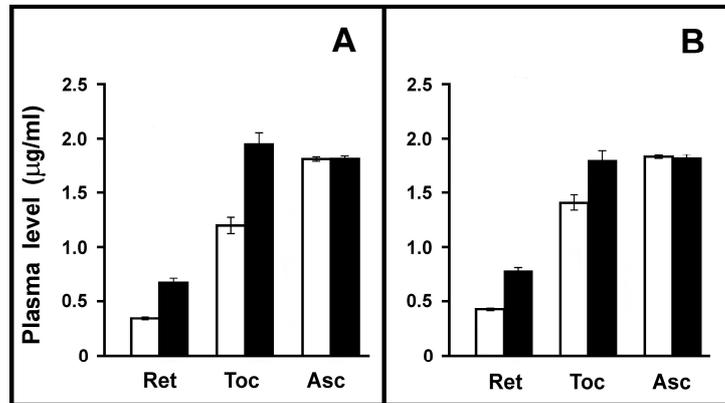
	Bufale in asciutta		Bufale in lattazione	
	Estate	Inverno	Estate	Inverno
<b>Albumina</b> (g/L)	31.03 ± 1.54	30.76 ± 1.12	33.97 ± 1.59 <sup>b</sup>	32.46 ± 1.51 <sup>a, c</sup>
<b>Bilirubina</b> (µM)	10.71 ± 2.56	9.58 ± 3.87	6.81 ± 1.41 <sup>a</sup>	5.49 ± 1.20 <sup>f, c</sup>
<b>GOT</b> (U/L)	118.61 ± 9.38	119.43 ± 9.7	140 ± 26.4 <sup>a</sup>	143.3 ± 26.5 <sup>a</sup>
<b>GGT</b> (U/L)	26.11 ± 5.84	21.74 ± 6.31	30 ± 10.1	24.99 ± 5.35
<b>Creatinina</b> (µM)	196 ± 18.8	149.4 ± 13.7 <sup>d</sup>	51.6 ± 17.4 <sup>b</sup>	127.6 ± 13.4 <sup>a, d</sup>
<b>Urea</b> (mM)	1.04 ± 0.25	3.4 ± 1.04 <sup>d</sup>	5.48 ± 1.59 <sup>b</sup>	6.9 ± 0.95 <sup>b, c</sup>
<b>NEFA</b> (mM)	0.35 ± 0.09	0.13 ± 0.05 <sup>d</sup>	0.13 ± 0.06	0.21 ± 0.09 <sup>a, c</sup>
<b>BHB</b> (mM)	0.22 ± 0.04	0.15 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.41 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.21 ± 0.04 <sup>a, d</sup>
<b>Glucosio</b> (mM)	3.36 ± 0.31	3.91 ± 0.21 <sup>c</sup>	3.56 ± 0.32	4.44 ± 0.20 <sup>b, d</sup>
<b>Colesterolo</b> (mM)	1.85 ± 0.28	1.6 ± 0.14 <sup>e</sup>	3.3 ± 0.9 <sup>b</sup>	3.0 ± 0.58 <sup>b</sup>
<b>Trigliceridi</b> (mM)	0.29 ± 0.14	0.2 ± 0.04	0.12 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.04 <sup>a</sup>
<b>Insulina</b> (µU/mL)	7.42 ± 1.17	10.57 ± 2.34 <sup>c</sup>	12.54 ± 4.83 <sup>a</sup>	10.25 ± 3.81
<b>T3</b> (ng/mL)	1.00 ± 0.18	1.47 ± 0.21 <sup>d</sup>	1.17 ± 0.12 <sup>f</sup>	1.52 ± 0.26 <sup>d</sup>

**Tabella 1:** livelli stagionali di analiti plasmatici  
a = P<0.01 vs in asciutta nella stessa stagione  
b = P <0.001 vs in asciutta nella stessa stagione  
f = P<0.05 vs in asciutta nella stessa stagione  
c = P<0.01 vs in estate nello stesso stato fisiologico  
d = P<0.001 vs in estate nello stesso stato fisiologico  
e = P<0.05 vs in estate nello stesso stato fisiologico

### 5.1.2. Titolazione di ascorbato, retinolo e tocoferolo nel plasma e nel latte

I livelli plasmatici di Ret, Toc ed Asc, in inverno ed in estate, sono risultati paragonabili nelle bufale in lattazione; confrontando le bufale in lattazione con quelle in asciutta, invece, si è notato che i livelli di antiossidanti sono più alti nel

plasma delle bufale in lattazione, sia in estate che in inverno (Figura 1). Questi risultati erano prevedibili poiché solo le bufale in lattazione sono state nutrite con una dieta arricchita in vitamine liposolubili.



**Figura 1: Livelli plasmatici stagionali di Ret, Toc e di Asc in bufale in lattazione o in asciutta.** I livelli di Ret, Toc e Asc sono stati determinati tramite HPLC in campioni di plasma provenienti da bufale in asciutta (barra bianca) o in lattazione (barra nera). Pannello A: bufale in estate (temperatura esterna +24°C). Pannello B: bufale in inverno (temperatura esterna -2°C).

Come si nota nella Tabella 2, i livelli dei due antiossidanti liposolubili nel latte sono più elevati in inverno che in estate, mentre i livelli di ascorbato non differiscono tra estate ed inverno. La produzione di latte invernale ( $9.77 \pm 2.52$  Kg/d) non è risultata significativamente differente da quella estiva ( $7.87 \pm 4.28$  Kg/d) e non sono stati riscontrati cambiamenti stagionali dei grassi nel latte ( $8.59 \pm 1.71\%$  in inverno contro  $8.96 \pm 0.72\%$  in estate). Questi risultati, complessivamente, suggeriscono che le differenze di concentrazione di Toc e Ret nel latte tra estate e inverno non dipendono dalla produzione di latte, né dal suo contenuto in grassi. Una correlazione positiva è stata trovata fra i livelli di Toc e quelli di Ret nel latte nelle due stagioni (in inverno  $r = 0.839$ ,  $P < 0.01$  e in estate  $r = 0.897$ ,  $P < 0.01$ ). Per contro, i livelli di questi antiossidanti nel plasma non erano correlati. Questi dati suggeriscono che potrebbero esistere meccanismi di trasporto, dal sangue al latte, diversi per i due antiossidanti.

		Estate	Inverno	
				<b>p</b>
<b>Retinolo in plasma</b>	( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0.67 $\pm$ 0.04	0.76 $\pm$ 0.03	N.S.
<b><math>\alpha</math>-tocoferol in plasma</b>	( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	1.95 $\pm$ 0.01	1.77 $\pm$ 0.10	N.S.
<b>Ascorbato in plasma</b>	( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	1.81 $\pm$ 0.02	1.80 $\pm$ 0.03	N.S.
<b>Retinolo in latte</b>	( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0.76 $\pm$ 0.07	1.60 $\pm$ 0.10	<0.0001
<b><math>\alpha</math>-tocoferolo in latte</b>	( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0.71 $\pm$ 0.07	1.20 $\pm$ 0.06	<0.0001
<b>Ascorbato in latte</b>	( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	10.37 $\pm$ 0.37	10.27 $\pm$ 0.40	N.S.
<b>Retinolo (latte/plasma)</b>		1.29 $\pm$ 0.22	2.10 $\pm$ 0.14	0.001
<b><math>\alpha</math>-tocoferolo (latte/plasma)</b>		0.38 $\pm$ 0.05	0.70 $\pm$ 0.06	0.0006

**Tabella 2: Concentrazione di antiossidanti nel plasma o nel latte delle bufale in lattazione.**

### **5.1.3. Effetto di $T_3$ sul trasporto di Ret e Toc nella ghiandola mammaria**

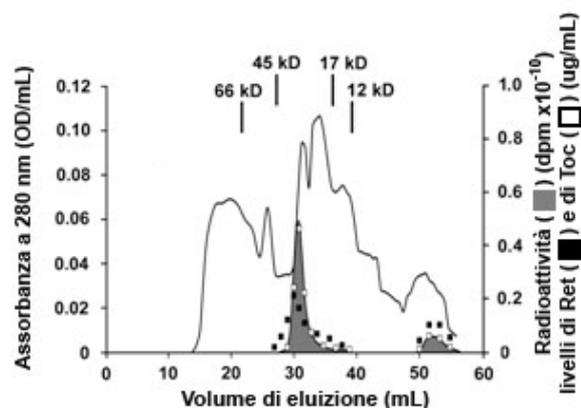
Gli effetti di  $T_3$  sul trasporto di Ret e di Toc nella ghiandola mammaria sono stati studiati nelle bufale in lattazione considerando come gruppo unico quelle in estate e quelle in inverno ( $N = 30$ ). Sono stati analizzati i livelli plasmatici di Toc, Ret e  $T_3$ , e le concentrazioni, nel latte, dei due antiossidanti liposolubili. I livelli plasmatici di  $T_3$  sono stati trovati correlati positivamente con quelli di Ret e di Toc misurati nel latte ( $r = 0.385$  e  $r = 0.406$ , rispettivamente,  $P < 0.05$ ), ma non nel plasma. Questi dati suggeriscono che  $T_3$  potrebbe stimolare l'accumulo di entrambi gli antiossidanti nel latte. Questa possibile stimolazione è stata verificata inducendo sperimentalmente un aumento della concentrazione di  $T_3$  nel plasma di due bufale in lattazione durante l'estate ( $+24^\circ\text{C}$ ). A ciascun animale è stato somministrato  $T_3$  ( $4.0 \mu\text{g}/\text{Kg}$ ), ed è stata misurata la concentrazione di Ret e Toc nel latte e nel plasma, prima e dopo il trattamento. Il rapporto tra i livelli di Ret e di Toc nel latte e quelli nel plasma è stato utilizzato come indice del trasporto di antiossidanti dal plasma al latte. Il trattamento ormonale non ha causato

cambiamenti significativi nella quantità di Ret e di Toc nel plasma, ma ha indotto un aumento significativo del trasporto di entrambi gli antiossidanti nel latte (77% per Ret e 57% per Toc; Tabella 3).

Trasporto verso il latte	Animale 1		Animale 2	
	Ret	Toc	Ret	Toc
Prima del trattamento	1.42 ± 0.10	0.42 ± 0.2	1.36 ± 0.11	0.40 ± 0.03
Dopo il trattamento	2.48 ± 0.11	0.69 ± 0.04	2.44 ± 0.16	0.59 ± 0.04
Aumento%	74.60	64.3	79.4	47.5

**Tabella 3: Effetto della somministrazione dell'ormone T<sub>3</sub> sul trasporto di Ret e Toc al latte.** Aumento percentuale = (trasporto dopo il trattamento – trasporto prima del trattamento) / trasporto prima del trattamento \* 100.

Successivamente, per cercare di caratterizzare la proteina citosolica che trasporta il Ret attraverso l'epitelio alveolare della ghiandola mammaria, sono state macellate tre bufale in lattazione in estate (T = +24°C) e tre in inverno (T = -2°C). Le ghiandole mammarie sono state sezionate e le cellule dell'epitelio alveolare sono state raschiate accuratamente e omogeneizzate. La frazione citoplasmatica è stata incubata con Toc e <sup>3</sup>H-Ret e poi sottoposte a gel filtrazione, utilizzando la resina Superdex 75, per separare la frazione di vitamine legate a proteine dalla frazione di vitamine *free*, non legate a materiale proteico. Il materiale eluito è stato raccolto in frazioni, che sono state poi analizzate mediante HPLC per misurare il contenuto di Ret e di Toc. Il frazionamento cromatografico ha rivelato che entrambi gli antiossidanti migrano, per la maggior parte, insieme a proteine di circa 33 kD (Figura 2). È stato individuato anche un picco più piccolo e più lento, probabilmente costituito da forme micellari degli antiossidanti, che si sovrappone al materiale citosolico di basso peso molecolare. La resa di antiossidante recuperato dal picco maggiore, dopo la rimozione di proteine per l'analisi mediante HPLC, è del 95% per <sup>3</sup>H-Ret.



**Figura 2: Cromatografia per gel-filtrazione delle proteine citosoliche dell'epitelio alveolare della ghiandola mammaria.** Alle proteine citoplasmatiche (4 mg) è stato aggiunto 0.25 nmol di Toc e 45  $\mu$ Ci/nmol di <sup>3</sup>H-Ret in 1 mL di TBS (20 mM Tris-HCl, 130 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanolo, pH 7.3). Dopo incubazione, un'aliquota di questa miscela (0.3mL) è stata caricata su una colonna Superdex 75 (1 x 85 cm) equilibrata con TBS. La proteina è stata eluita con lo stesso tampone ad un flusso di 7 mL/ora. Sono state raccolte frazioni da 0.5 mL e misurata la radioattività (area grigia) e l'assorbanza allo spettrofotometro a 280 nm (linea continua), e infine passate all'HPLC per titolare Ret (quadrati neri) e Toc (quadrati bianchi). Per calibrare la cromatografia sono stati usati albumina bovina (PM = 66 kD), albumina di uovo (PM = 45 kD), mioglobina (PM = 17 kD) e citocromo C (PM = 12 kD).

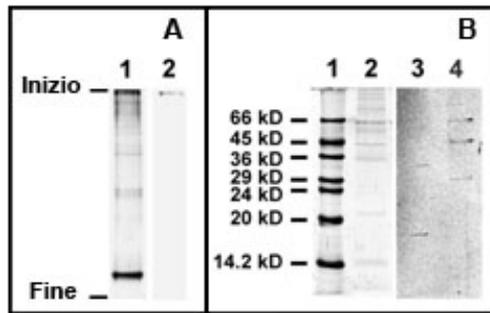
La quantità delle forme di Ret e di Toc legate a proteine è stata trovata più elevata nel citoplasma delle cellule mammarie di animali con livelli plasmatici di T<sub>3</sub> più elevati (Tabella 4). In particolare, negli animali tenuti a -2°C, l'accumulo di Ret nel latte (determinato dal trasporto di antiossidante dal plasma al latte) è risultato circa 2.2 volte più elevato rispetto a quello degli animali analizzati in estate; allo stesso modo, la quantità di <sup>3</sup>H-Ret legato a proteine era circa 2.3 volte più alta negli animali macellati in inverno, rispetto a quelli macellati in estate.

		estate	inverno
<b>T3 nel plasma</b>	(ng/mL)	0.84 ± 0.01	1.53 ± 0.01
<b>Trasporto di Toc</b>	(livelli nel latte / livelli nel plasma)	0.69 ± 0.11	0.95 ± 0.12
<b>Toc legato a proteine</b>	(mg/mg di proteine)	0.56 ± 0.01	0.86 ± 0.01
<b>Trasporto di Ret</b>	(livelli nel latte / livelli nel plasma)	2.75 ± 0.02	5.99 ± 0.15
<b><sup>3</sup>H-Ret legato a proteine</b>	(mg/mg di proteine)	0.26 ± 0.00	0.59 ± 0.01
<b><sup>3</sup>H-Ret legato a proteine</b>	(dpm/mg di proteine)	848300 ± 5900	1918400 ± 45100

**Tabella 4: Cambiamenti stagionali dei livelli di T<sub>3</sub>, Toc, Ret e di proteine che legano il Ret e il Toc.**

Le frazioni cromatografiche contenenti livelli di Ret radioattivo più elevati sono state analizzate tramite elettroforesi anodica su un gel al 12.5% di poliacrilammide a pH 8.4, e le bande sono state rivelate mediante colorazione con Coomassie (Figura 3, pannello A, tracciato 1). Dopo aver trattato il gel per l' autoradiografia, è stata rivelata una banda radioattiva appena penetrata nel gel (Figura 3, Pannello A linea 2) che rappresenta il complesso proteina-<sup>3</sup>H-Ret. In un ulteriore esperimento, le frazioni proteiche sono state analizzate per elettroforesi su gel di poliacrilammide al 15% in condizioni denaturanti e riducenti. Dopo l'elettroforesi, le proteine sono state colorate con Coomassie (Figura 3, Pannello B, linea 2) oppure trasferite su una membrana di nitrocellulosa. Le membrane sono state incubate con <sup>3</sup>H-Ret e trattate per rivelare la radioattività associata a esse. Sono state trovate due bande proteiche radioattive che mostrano un peso molecolare di 33 e di 16 kD (Figura 3, Pannello B, linea 3). Questo lascia supporre che gli estratti citosolici delle cellule epiteliali della ghiandola mammaria contengano due proteine in grado di legare il Ret. Ulteriori esperimenti sono in corso per identificare inequivocabilmente le suddette proteine trasportatrici.

I risultati ottenuti, complessivamente, suggeriscono che l'aumento dei livelli di T<sub>3</sub> nel plasma delle bufale in lattazione (che si verifica in inverno come risposta all'abbassamento della temperatura esterna) è associato ad un aumento dei livelli nelle proteine che legano Ret e Toc nel citoplasma delle cellule epiteliali mammarie. Queste proteine hanno un peso molecolare apparente di 33 kD, e la proteina che lega il Ret potrebbe essere costituita da due polipeptidi con MW di 16 kD.



**Figura 3: Elettroforesi delle proteine che legano Ret.** In pannello **A**: Le proteine delle frazioni cromatografiche sono state separate per elettroforesi anodica (gel da 12.5% di poliacrilamide, pH 8.4) e rivelate o con colorazione con Coomassie (linea 1) o per autoradiografia (linea 2). **Pannello B**: Le frazioni proteiche sono state analizzate per elettroforesi su gel di poliacrilamide al 15% in condizioni denaturanti e riducenti. Dopo l'elettroforesi, le proteine sono state colorate con Coomassie (linea 2) oppure trasferite su una membrana di nitrocellulosa, poi incubate con  $^3\text{H}$ -Ret e trattate per la rivelazione con autoradiografia (linea 3). In linea 1 e 4 marcatori di peso molecolare. In linea 4: albumina bovina, albumina di uovo e anidrasi carbonica bovina marcati con  $^{14}\text{C}$ .

## 5.2. Effetto della densità di stabulazione sul benessere animale

Un ulteriore obiettivo della mia ricerca è stato quello di valutare se la variazione della densità di stabulazione influenza lo stato di benessere delle bufale. A tale scopo è stata studiata l'influenza delle condizioni di stabulazione sull'omeostasi redox, plasmatica e follicolare, sulla *performance* riproduttiva delle bufale e sulla produzione di latte. Lo stato redox nei fluidi biologici è stato caratterizzato mediante la misurazione della concentrazione di antiossidanti esogeni (Ret, Toc e Asc), come indicatori del sistema di difesa antiossidante, e mediante la titolazione dei residui di Nitro-tirosina (N-Tyr), indice dello stress ossidativo indotto dal perossinitrito (Halliwell B. 1997), e dei gruppi carbonilici legati alle proteine (*protein-bound carbonyls*, PC), come marcatori del danno ossidativo alle proteine.

### 5.2.1. Caratterizzazione dello stato ossidoriduttivo in plasma e fluidi follicolari

La sperimentazione è stata condotta su due gruppi di bufale: gruppo S (stressate,  $n = 50$ , densità =  $13.3 \text{ m}^2/\text{capo}$ ) e gruppo NS (non stressate,  $n = 50$ , densità =  $27.0 \text{ m}^2/\text{capo}$ ). In ciascun gruppo, quaranta bufale sono state fecondate con inseminazione artificiale (AI). Nei campioni plasmatici prelevati da ciascuna bufala sono stati titolati Asc, Ret, Toc, N-Tyr e PC. Dal confronto tra i due gruppi di bufale è emerso che non ci sono differenze significative per quanto riguarda i livelli plasmatici di Ret e Toc, i due antiossidanti liposolubili introdotti con la dieta (tabella 5); parimenti, la concentrazione plasmatica di Asc, il principale antiossidante idrofilico endogeno, non differisce significativamente tra i gruppi esaminati. Un altro modo per caratterizzare lo stato redox è la stima dell'entità dei danni ossidativi alle proteine, che è stata effettuata titolando la concentrazione di N-Tyr e di PC. Dalla tabella 5 si deduce che non ci sono differenze tra i due gruppi di bufale per quanto riguarda la concentrazione di N-Tyr e di PC. Questo risultato suggerisce che la densità di stabulazione non influenza i parametri ematici usati come indicatori dello stato redox plasmatico.

	NS ( $n = 50$ )	S ( $n = 50$ )
<b>Retinolo</b> ( $\mu\text{g/ml}$ )	$0.509 \pm 0.013$	$0.492 \pm 0.015$
<b><math>\alpha</math>-Tocoferolo</b> ( $\mu\text{g/ml}$ )	$1.627 \pm 0.088$	$1.819 \pm 0.119$
<b>Ascorbato</b> ( $\mu\text{M}$ )	$5.643 \pm 0.286$	$5.623 \pm 0.304$
<b>PC</b> ( $\text{nmol/mgP}$ )	$7.594 \pm 0.671$	$8.125 \pm 0.718$
<b>N-Tyr</b> ( $\text{nmol/mgP}$ )	$1.269 \pm 0.097$	$1.322 \pm 0.089$

**Tabella 5: Livelli di antiossidanti e marcatori di danno ossidativo alle proteine, in plasma di bufale stabulate a  $13.3 \text{ m}^2/\text{capo}$  (S) e a  $27.0 \text{ m}^2/\text{capo}$  (NS).**

Come descritto in Metodi, 10 bufale di ciascun gruppo non sono state fecondate, ma trattate per indurre la superovulazione. Al momento dell'ovulazione sono stati prelevati plasma e fluido follicolare da ogni animale. Tuttavia, solo da alcune delle 10 bufale non fecondate di ogni gruppo è stato possibile ottenere un campione di fluido follicolare ovarico. Anche in questi campioni, non è stata rilevata nessuna

differenza significativa tra i due gruppi stabulati a diverse densità per quanto riguarda i parametri considerati (Tabella 6).

	<b>S</b> (n = 7)	<b>NS</b> (n = 4)
<b>Retinolo</b> (µg/ml)	0.105 ± 0.026	0.156 ± 0.050
<b>α-Tocoferolo</b> (µg/ml)	0.337 ± 0.088	0.302 ± 0.105
<b>Ascorbato</b> (µM)	4.774 ± 0.200	4.303 ± 0.048
<b>PC</b> (nmol/mgP)	20.02 ± 5.977	7.591 ± 3.905
<b>N-Tyr</b> (nmol/mgP)	16.11 ± 6.176	6.035 ± 2.173

**Tabella 6: Livelli di antiossidanti e marcatori di danno ossidativo alle proteine, in fluidi follicolari ovarici di bufale stabulate a 13.3 m<sup>2</sup>/capo (S) e a 27.0 m<sup>2</sup>/capo (NS).**

### **5.2.2. Influenza della densità di stabulazione sulla produzione di latte**

Dalle bufale in lattazione, nelle due condizioni di stabulazione, è stato raccolto e analizzato il latte giornaliero. Dalla tabella 7 si denota che non ci sono differenze tra i due gruppi per quanto riguarda la quantità di latte prodotto. I parametri comunemente utilizzati come indici della qualità del latte (contenuto di grasso, di lattosio, di proteine e di cellule somatiche) sono anch'essi paragonabili tra i due gruppi di bufale in lattazione. Questi dati suggeriscono che la densità di stabulazione non influenza la produzione e la qualità del latte.

<b>LATTE</b>	<b>S</b> (n = 40)	<b>NS</b> (n = 40)
<b>Kg latte</b>	9.689 ± 0.502	10.36 ± 0.408
<b>% grasso</b>	8.302 ± 0.274	8.376 ± 0.195
<b>Proteine</b> (mg/mL)	46.78 ± 0.829	46.74 ± 0.817
<b>% Lattosio</b>	5.03 ± 0.90	4.92 ± 0.05
<b>Urea</b> (mg/dL)	46.87 ± 2.012	50.36 ± 1.594
<b>Cell somatiche</b> (* 1000)	65.13 ± 10.051	60.95 ± 12.565

**Tabella 7: Analiti in latte di bufale stabulate a 13.3 m<sup>2</sup>/capo (S) e a 27.0 m<sup>2</sup>/capo (NS).**

### 5.2.3. Influenza della densità di stabulazione sulla riproduzione

Poiché i dati raccolti dai due gruppi di bufale stabulate a diversa densità non mostrano differenze, le bufale del gruppo S e NS fecondate con AI sono state considerate come gruppo unico e suddivise in tre gruppi: bufale gravide (P), non gravide (NP) e con mortalità embrionale (EM), vale a dire le bufale gravide al 26° giorno, ma non al 45°. I livelli plasmatici dei tre antiossidanti considerati Ret, Toc e Asc, come quelli dei marcatori di ossidazione proteica (N-Tyr and PC), non differiscono tra le bufale del gruppo P e NP, e nemmeno tra i gruppi P e EM (dati non rappresentati). I livelli plasmatici di progesterone ( $P_4$ ), l'ormone steroideo le cui concentrazioni aumentano durante la gravidanza, sono risultati significativamente più alti nelle bufale P rispetto alle NP e EM (20 e 25 giorni dopo AI). Invece non è stata trovata nessuna differenza significativa nei valori plasmatici di  $P_4$  tra i gruppi NP e EM. L'estradiolo ( $E_2$ ), ormone estrogeno prodotto dalle cellule della granulosa delle ovaie, è stato titolato per verificare la funzionalità dell'ovario e dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi. La concentrazione plasmatica di  $E_2$ , non mostra differenza significativa tra i tre gruppi esaminati, alle quattro distanze dall'AI analizzate (Tabella 8).

	<b>P</b> ( <i>n</i> = 50)	<b>NP</b> ( <i>n</i> = 22)	<b>EM</b> ( <i>n</i> = 8)
<b>E<sub>2</sub> 0</b>	21.9 ± 0.9	20.6 ± 0.9	18.9 ± 1.2
<b>E<sub>2</sub> 10</b>	18.9 ± 0.7	18.1 ± 0.9	17.0 ± 1.5
<b>E<sub>2</sub> 20</b>	16.6 ± 0.5	16.4 ± 0.706	17.1 ± 1.4
<b>E<sub>2</sub> 25</b>	15.5 ± 0.1	15.8 ± 0.1	16.0 ± 0.2
<b>P<sub>4</sub> 10</b>	3.0 ± 0.1	2.4 ± 0.3	2.0 ± 0.7
<b>P<sub>4</sub> 20</b>	3.7 ± 0.1 Aa	1.8 ± 0.4 B	2.0 ± 0.7 b
<b>P<sub>4</sub> 25</b>	4.0 ± 0.1 A	1.0 ± 0.3 B	2.2 ± 0.7 B
A vs. B = P<0.01; a vs. b = P <0.05			

**Tabella 8: Livelli di estradiolo ( $E_2$ ) e di progesterone ( $P_4$ ) dopo 0, 10, 20 e 25 giorni dall'AI in bufale gravide (P), non gravide (NP) e con mortalità embrionale (EM).**

#### 5.2.4. Influenza della densità di stabulazione in bovine

L'influenza della densità di stabulazione è stata valutata anche sulle bovine. Sono stati analizzati due gruppi di bovine di razza frisona che differiscono solo per la densità di stabulazione: gruppo  $S_B$  (stressate,  $n = 6$ , densità =  $13.3 \text{ m}^2/\text{capo}$ ) e gruppo  $NS_B$  (non stressate,  $n = 6$ , densità =  $27.0 \text{ m}^2/\text{capo}$ ). Nella sperimentazione condotta sulle bovine è stato riscontrato che i livelli plasmatici di Ret e Toc sono significativamente più alti nel gruppo a più bassa densità di stabulazione ( $NS_B$ ) e che, nello stesso gruppo, i livelli plasmatici di N-tyr sono significativamente più bassi (tabella 9). Le analisi sul latte prodotto dalle bovine dei due gruppi hanno dimostrato (tabella 10) che non ci sono differenze per quanto riguarda la quantità prodotta, il contenuto di grasso, di lattosio, di proteine e di urea. Al contrario, il contenuto di tocoferolo (espresso come  $\mu\text{g/g}$  di grasso) e il numero di cellule somatiche, nel latte, è significativamente più alto nel gruppo  $NS_B$ .

Questi dati preliminari suggeriscono che la densità di stabulazione nei bovini, a differenza delle bufale, influenza lo stato redox del plasma e del latte. Questo conferma la grande versatilità dei bufali rispetto ai bovini, data la loro capacità di mantenere costanti alcuni parametri nonostante siano stati sottoposti a condizioni di stabulazione più restrittive.

	$S_B (n = 6)$	$NS_B (n = 6)$	
<b>Ret plasma</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )	$0.360 \pm 0.022$	$0.453 \pm 0.032$	$P = 0.03$
<b>Toc plasma</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )	$2.377 \pm 0.139$	$2.885 \pm 0.330$	$P = 0.04$
<b>N-tyr plasma</b> ( $\mu\text{M}$ )	$13.250 \pm 3.005$	$4.742 \pm 1.066$	$P = 0.04$
<b>Ret latte</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )	$1.950 \pm 0.298$	$1.551 \pm 0.137$	
<b>Toc latte</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )	$1.884 \pm 0.182$	$2.699 \pm 0.391$	$P < 0.05$

**Tabella 9: Livelli di antiossidanti e marcatori di danno ossidativo alle proteine, in plasma di bovini stabulate a  $13.3 \text{ m}^2/\text{capo}$  ( $S_B$ ) e a  $27.0 \text{ m}^2/\text{capo}$  ( $NS_B$ ).**

	<b>S<sub>B</sub> (n = 6)</b>	<b>NS<sub>B</sub> (n = 6)</b>
<b>kg latte</b>	29.400 ± 1.321	30.400 ± 1.691
<b>% Grasso</b>	3.374 ± 0.103	3.242 ± 0.112
<b>Proteine (g/L)</b>	31.030 ± 1.022	30.920 ± 0.525
<b>% Lattosio</b>	4.921 ± 0.038	4.815 ± 0.057
<b>Ret (µg/g grasso)</b>	51.980 ± 8.964	47.880 ± 3.908
<b>Toc (µg/g grasso)</b>	52.170 ± 6.334	82.630 ± 11.160 P = 0.02
<b>Urea (mg/dL)</b>	28.430 ± 0.989	28.750 ± 2.436
<b>Cell somatiche (*1000)</b>	60.800 ± 17.870	316.600 ± 160.200 P = 0.02

**Tabella 10: Analiti in latte di bovine stabulate a 13.3 m<sup>2</sup>/capo (S<sub>B</sub>) e a 27.0 m<sup>2</sup>/capo (NS<sub>B</sub>).**

### **5.3. Analisi qualitativa della Mozzarella di Bufala Campana**

La mozzarella prodotta con latte bovino è il principale concorrente della mozzarella di bufala sul mercato. Dopo aver valutato, mediante le precedenti indagini, il benessere degli animali e la qualità del latte, alcuni esperimenti sono stati effettuati per valutare la qualità del prodotto della lavorazione del latte, e cioè la mozzarella. In particolare uno degli obiettivi della mia ricerca è stato comparare le proprietà organolettiche e nutrizionali della mozzarella di bufala campana e della mozzarella prodotta con latte bovino. A tal fine è stata valutata l'entità dei danni ossidativi a carico della componente lipidica e proteica dei due prodotti.

#### **5.3.1. Valutazione dell'ossidazione proteica**

Le Mozzarelle di Bufala Campana (N = 12) sono state acquistate presso differenti caseifici della provincia di Salerno; le mozzarelle di latte bovino (N = 10) sono state acquistate presso supermercati locali. Le analisi sono state condotte su campioni di 2g prelevati da ciascuna mozzarella.

L'ossidazione a carico delle proteine è stata valutata titolando i dimeri di tirosine (DT) e i gruppi carbonilici legati alle proteine (PC) e valutando la presenza di

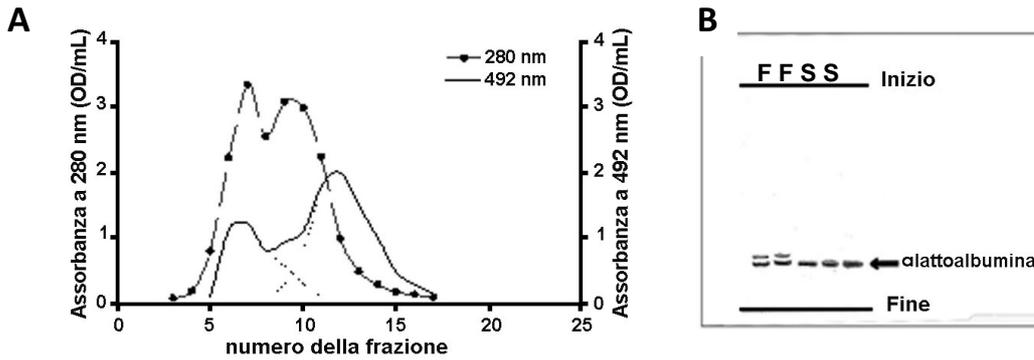
aggregati proteici in campioni di mozzarella omogeneizzati in tampone citrato (pH 8).

Non è stata trovata nessuna differenza significativa nella quantità dei DT tra i due tipi di mozzarelle. I livelli di PC nella mozzarella bovina oscillano in un ampio intervallo, ma il valore medio è risultato significativamente più alto ( $P < 0.05$ ) di quello della mozzarella di bufala (tabella 11).

	<b>Mozzarella di Bufala Campana</b>	<b>Mozzarella di latte bovino</b>
<b>DT</b> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ di proteine)	$0.123 \pm 0.056$	$0.126 \pm 0.015$
<b>PC</b> ( $\text{nmol}/\text{mg}$ di proteine)	$1.953 \pm 0.334$	$5.563 \pm 4.624^*$

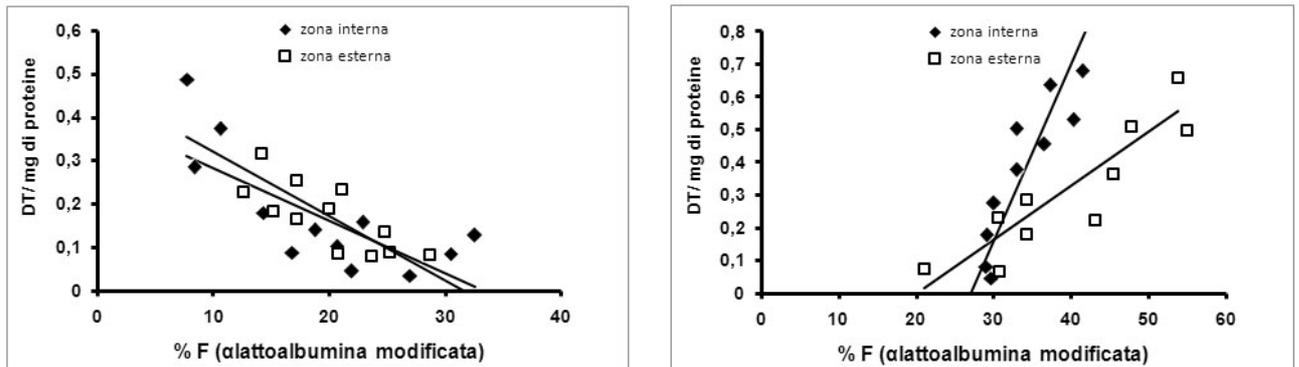
**Tabella 11: Livelli di marcatori di ossidazione proteica in estratti di mozzarella.** \*  $P < 0.05$

La presenza di aggregati proteici è stata valutata in campioni prelevati da due diverse zone di ogni mozzarella, cioè dalla zona interna (2 cm dalla superficie) e dalla zona esterna (0.3 cm dalla superficie). Il livello di  $\alpha$ lattoalbumina e di possibili aggregati di  $\alpha$ lattoalbumina (aggregati che potrebbero essersi formati in condizioni di stress ossidativi) è stato determinato mediante una cromatografia per gel filtrazione con Sephacryl S-200. Le proteine di ciascun omogenato sono state separate in due picchi la cui eluizione è stata monitorata misurando l'assorbanza a 280nm nelle frazioni raccolte. Ogni frazione è stata analizzata mediante ELISA con anticorpi anti- $\alpha$ lattoalbumina per rivelare la presenza di  $\alpha$ lattoalbumina o di antigeni a più elevato peso molecolare contenenti  $\alpha$ lattoalbumina. Nella figura 4 è mostrato un tipico profilo di separazione delle proteine estratte e la rivelazione degli antigeni eluiti, comuni a entrambe le zone di estrazione e a entrambi i tipi di mozzarella.



**Figura 4: Cromatografia delle proteine solubilizzate dalle mozzarelle.** Le proteine sono state separate mediante gel filtrazione su una colonna di Sephacryl S-200 in condizioni denaturanti e riducenti. **Pannello A:** L'assorbanza delle frazioni eluite è stata misurata a 280nm (linea punteggiata). Gli epitopi di  $\alpha$ lattoalbumina contenuti nelle frazioni sono stati rivelati con ELISA a 492nm (linea continua). La figura mostra un tipico cromatogramma in cui le proteine sono eluite in due picchi: uno veloce (frazioni 5-8, picco F) e uno lento (frazioni 10-15, picco S). **Pannello B:** Le proteine delle frazioni cromatografiche, con assorbanza maggiore, sono state separate per elettroforesi e poi trasferite su membrana di PVDF, incubata con anticorpi anti  $\alpha$ lattoalbumina

Dall'analisi di *Western blotting* si vede che gli epitopi di  $\alpha$ lattoalbumina sono presenti nelle frazioni cromatografiche eluite sia nel picco più veloce (F, *fast*) che in quello più lento (S, *slow*) (Figura 4, pannello B). È stata calcolata la quantità di F, in termini di resa percentuale di modificazione putativa di S, cioè come  $[area\ F / (area\ F + area\ S)] \times 100$ . Le proteine eluite nel picco F, contenente materiale aggregato a più alto peso molecolare, sono più abbondanti nei campioni di mozzarella bovina che in quelli di mozzarella di bufala, ( $P < 0.02$ ). Inoltre è stata trovata una correlazione tra la quantità di F e di DT, sia nella mozzarella di bufala (zona interna  $r = -0.701$ ;  $P < 0.05$ ; zona esterna  $r = -0.743$ ;  $P < 0.05$ ), che in quella bovina (zona interna  $r = 0.903$ ;  $P < 0.05$ ; zona esterna  $r = 0.869$ ;  $P < 0.05$ ), sia per gli estratti preparati dalla zona centrale che per quella marginale (figura 5).



**Figura 5:** Correlazione tra la concentrazione di DT e la quantità di proteine nel picco F (esprese come per cento sul totale), in estratti di Mozzarella di Bufala Campana (**pannello A**) e di mozzarella prodotta da latte bovino (**pannello B**).

Una correlazione tra PC e la quantità di F è stata riscontrata solo all'interno degli estratti di mozzarella di bufala. Questi dati fanno ipotizzare che gli aggregati proteici sono probabilmente dovuti alla presenza di PC, per quanto riguarda la mozzarella prodotta con il latte bufalino, e alla presenza di DT per la mozzarella prodotta con il latte bovino.

### 5.3.2. Valutazione dell'ossidazione lipidica

L'ossidazione lipidica è stata valutata misurando la capacità antiossidante totale (TAC), e la quantità di Toc e di TQ in estratti di mozzarella saponificati. Dalla tabella 12, si può riscontrare che la TAC negli estratti di mozzarella di bufala è più alta che negli estratti di mozzarella bovina ( $P < 0.04$ ); invece non ci sono differenze significative nei valori di Ret, Toc e TQ tra i due gruppi di mozzarelle. D'altro canto il rapporto TQ/Toc, che può essere assunto come un indice dell'ossidazione lipidica (e perciò usato per valutare il consumo di Toc nelle mozzarelle stesse), è risultato significativamente più alto negli estratti di mozzarella di bufala che in quelli di mozzarella bovina ( $P < 0.001$ ).

	<b>Mozzarella di Bufala Campana</b>	<b>Mozzarella di latte bovino</b>
<b>TAC</b> (nmol/mg di proteine)	0.80 ± 0.15	0.59 ± 0.16*
<b>Ret</b> (µg/100g di campione)	210 ± 34.7	253 ± 59.7
<b>Toc</b> (µg/100g di campione)	163 ± 71.9	245 ± 97.8
<b>TQ/Toc</b>	6.32 ± 2.53	1.34 ± 0.80**

**Tabella 12: Titolazione di antiossidanti liposolubli in estratti di mozzarella.**

\*P <0.04; \*\* P <0.001.

## 7. Discussione

Durante la lattazione avvengono degli adattamenti fisiologici che coinvolgono numerosi tessuti e riguardano il metabolismo di tutte le classi di nutrienti (Bauman e Elliot, 1983; McNamara, 1995). L'analisi del profilo metabolico di bufale in asciutta e in lattazione, in estate ed in inverno, ha dimostrato che nelle bufale in lattazione i livelli plasmatici di creatinina sono più bassi, mentre quelli di urea sono più alti rispetto alle bufale in asciutta, in quanto c'è una mobilizzazione di proteine per la gluconeogenesi. La gluconeogenesi è sostenuta anche dall'ossidazione degli acidi grassi, il che spiega il fatto che le concentrazioni di BHB sono più alte nel plasma delle bufale in lattazione, sia in estate sia in inverno. In accordo con questi risultati, sono stati trovati livelli di trigliceridi più bassi, rispetto a quelli delle bufale in asciutta, che riflettono un ridotto rilascio da parte del fegato. Il più alto livello di colesterolo plasmatico, infine, dipende dal fatto che esso è sintetizzato dai residui acetilici, che derivano dall'aumentato catabolismo degli acidi grassi. In questo contesto è utile notare che il recupero epatico di colesterolo e il rilascio di trigliceridi potrebbero diminuire, durante la lattazione, anche come conseguenza della risposta attenuata del fegato all'insulina (Bell, 1997; Vernon, 1998; Williamson, 1994). I ruminanti selvatici presentano svariati adattamenti ai cambiamenti ambientali dipendenti dall'alternarsi delle stagioni (Chilliard et al., 2000). L'estate e l'inverno differiscono essenzialmente nel fotoperiodo e nella temperatura. Il fotoperiodo non sembra avere influenza, nei ruminanti, sui livelli di creatinina, urea e BHB (Bocquier et al., 1998); al contrario è stato osservato un aumento indotto dalla luce del giorno sull'attività degli enzimi lipogenici (Chilliard et al., 2000). Di conseguenza è concepibile che, nei bufali, le differenze stagionali da noi osservate nei livelli di creatinina, di urea, BHB, NEFA e glucosio possano dipendere da differenti esigenze di gluconeogenesi per la termogenesi.

Lo studio effettuato ha dimostrato che i livelli plasmatici di Ret e di Toc sono più alti nelle bufale in lattazione che in quelle in asciutta ( $P < 0.001$ ), mentre il livello di Asc è simile nei due gruppi. Questi risultati possono essere spiegati dalle differenze di alimentazione tra bufale in lattazione ed in asciutta, in quanto la dieta delle bufale in lattazione è supplementata con maggiori quantità di vitamine liposolubili rispetto a quella delle bufale in asciutta. Negli animali in lattazione non sono stati trovati cambiamenti stagionali nei livelli di Asc, Ret e di Toc. Questo suggerisce che le condizioni redox del sangue non sono influenzate da cambiamenti della temperatura ambientale. Poiché la produzione di ROS associata alla termogenesi comporta un consumo di antiossidanti, il rilascio in circolo di Ret, Toc e Asc assunti con la dieta, come pure la sintesi endogena di Asc, potrebbe aumentare in inverno, come risposta all'abbassamento della temperatura esterna, garantendo che i livelli plasmatici rimangano costanti.

Le nostre indagini hanno inoltre mostrato che i livelli di ciascun antiossidante liposolubile nel latte sono più alti in inverno che in estate. Questa differenza potrebbe dipendere da tre eventi: 1) in estate è prodotto meno latte che in inverno; 2) nel corso della stagione estiva entrambe le vitamine sono ossidate più facilmente; 3) le due vitamine sono trasportate più efficientemente attraverso la barriera emato-mammaria in inverno. La prima possibilità deve essere esclusa in quanto, nel periodo di lattazione preso in esame, non sono state rilevate variazioni stagionali nella produzione di latte e nel suo contenuto in grasso. Inoltre, poiché la concentrazione nel latte di Asc, che è l'antiossidante responsabile del riciclo di Toc dalla forma ossidata a quella ridotta (Halliwell, 1999), non mostra variazioni stagionali, anche la seconda ipotesi può essere esclusa. I nostri dati, quindi, sembrano suggerire che il trasporto dal sangue al latte di Ret e di Toc aumenta durante l'inverno. L'aumento delle concentrazioni di Ret e di Toc nel latte, ma non nel plasma, suggerisce che entrambi gli antiossidanti sono trasportati nella ghiandola mammaria attraverso un meccanismo di trasporto facilitato, come è stato precedentemente riportato (Jensen et al., 1999). I livelli di Toc sono correlati a

quelli di Ret nel latte; ma non nel plasma. Questo risultato permette di ipotizzare che entrambi gli antiossidanti non diffondono liberamente attraverso la barriera emato-mammaria e che differenti meccanismi di trasporto facilitato attraverso le cellule epiteliali della mammella sono responsabili del loro passaggio dal plasma al latte.

Durante l'inverno, le richieste dell'organismo per la termogenesi inducono l'aumento dei livelli di  $T_3$  nel plasma. Quest'aumento è stato trovato correlato con i livelli di Ret e di Toc nel latte ma non nel plasma; questo suggerisce che l'ormone  $T_3$  possa regolare il trasporto delle due vitamine liposolubili attraverso le cellule mammarie. Livelli aumentati di  $T_3$  potrebbero anche far aumentare la quantità di Ret circolante, poiché quest'ormone limita l'immagazzinamento di Ret nel fegato (Ross et al., 1997). Durante la lattazione una ridotta internalizzazione di Ret nel fegato potrebbe avere il ruolo fisiologico di incrementare l'ingresso di Ret nella ghiandola mammaria. Uno degli esperimenti riportati ha mostrato che la somministrazione di  $T_3$  alle bufale in lattazione, effettivamente, è associata all'aumento dei livelli sia di Ret sia di Toc nel latte. Questi dati sembrano suggerire l'esistenza di una relazione tra i livelli di  $T_3$  ed il trasporto di questi antiossidanti dal plasma nel latte.

La risposta delle cellule a  $T_3$  consiste in uno specifico cambiamento dell'espressione genica. Infatti, nel citoplasma delle cellule mammarie degli animali cui è stato somministrato  $T_3$ , abbiamo trovato maggiori quantità di proteine che legano Ret e Toc. I due antiossidanti non competano per le stesse proteine, in accordo con dati precedentemente pubblicati riguardanti specifici carrier citoplasmatici per ciascuna di essi (Sundaram et al., 1998; Dutta-Roy, 1999). L'mRNA per una proteina che lega Toc è stato trovato nelle cellule della ghiandola mammaria nell'uomo (Zimmer et al., 2000), ma fino ad ora non è stata descritta nessuna proteina solubile che agisca da carrier per Toc. Allo stesso modo non ci sono informazioni riguardanti proteine che legano Ret nell'epitelio della ghiandola mammaria (Napoli, 1999). Nell'ambito di questo progetto di dottorato abbiamo

riportato, per la prima volta, che sia Toc sia Ret possono essere legati da proteine presenti nel citoplasma di cellule mammarie di bufale. Questi carrier hanno apparentemente lo stesso peso molecolare (33 kD), che è compatibile con quello di proteine citoplasmatiche, già conosciute, che legano Toc (Dutta-Roy et al., 1999) o Ret (Napoli et al., 1999) in altri tessuti. Le variazioni nei livelli di questi carrier solubili sono associate a variazioni del trasporto dei due antiossidanti attraverso le cellule mammarie, il che ci permette di ipotizzare che almeno una parte di questi carrier sia coinvolta nella traslocazione del ligando (Ret o Toc) dal dominio basale della cellula ai siti di escrezione nel lume della ghiandola mammaria.

Sebbene sia noto che i bufali abbiano un'elevata capacità adattiva, le attuali tecniche di allevamento, che puntano a massimizzare la prestazione animale possono causare i "stress" dell'animale. Per far fronte alla crescente richiesta del mercato di prodotti di origine animale, gli allevatori tendono a ridurre gli spazi destinati alla stabulazione, il che può influire su diversi aspetti del benessere dell'animale (De Rosa et al. 2009). Pertanto, la reazione dei bufali agli stimoli ambientali dovrebbe essere valutata in modo da identificare condizioni di allevamento idonee tecnicamente ed economicamente compatibili con il benessere animale.

La nostra sperimentazione è stata effettuata su due gruppi di bufale e su due gruppi di bovine. Tra i due gruppi di bufale, stabulate a diverse densità, non è stata trovata nessuna differenza significativa nei livelli plasmatici di Ret, Toc e Asc, il che suggerisce che la maggiore densità di stabulazione non danneggi il sistema di difesa antiossidante nel sangue. Per avere un indice del danno ossidativo alle proteine, sono stati misurati i livelli plasmatici di N-Tyr e PC. È utile menzionare che la concentrazione dei residui di N-Tyr è ampiamente usata come marcatore di stress ossidativo indotto dal perossinitrito (Halliwell, 1997), una specie reattiva dell'azoto che viene prodotta dalla reazione dell'anione superossido con radicali nitrosilici (Halliwell, 1997). La presenza di gruppi carbonilici nelle proteine è a sua

volta usata come marcatore dell'ossidazione proteica mediata dai ROS (Berlett e Stadtman, 1997). I gruppi carbonilici possono essere introdotti nelle proteine in seguito alla reazione delle stesse con aldeidi, prodotte durante la perossidazione lipidica (Esterbauer et al., 1991; Uchida e Stadtman, 1993), o con derivati reattivi carbonilici generati derivanti dagli zuccheri (Monnier et al., 1995; Kristal e Yu, 1992). Abbiamo osservato che l'entità dei danni ossidativi alle proteine plasmatiche è simile nei due gruppi di bufale, il che suggerisce che le condizioni sperimentali usate non influenzano significativamente l'ossidazione proteica nel plasma.

Uno studio sulle pecore ha dimostrato che piccole riduzioni dello spazio di stabulazione comportano una riduzione della quantità e della qualità del latte prodotto, nonché una maggiore incidenza di animali affetti da mastite (Sevi et al. 1999). Studi precedenti condotti sulle bufale in lattazione hanno dimostrato una correlazione positiva tra disponibilità di spazio e produzione di latte (Zicarelli et al., 2005). Le analisi effettuate sul latte prodotto dalle bufale, nelle nostre condizioni sperimentali, hanno dimostrato che non ci sono differenze, in termini di produzione e marcatori della "qualità" tra i due gruppi. Questo risultato è di notevole interesse per gli allevatori perché significa che la riduzione dello spazio di stabulazione non influenza la produzione e la qualità di latte. Anche il numero delle cellule somatiche nel latte è risultato paragonabile tra i due gruppi, suggerendo che l'aumento della densità di stabulazione non fa aumentare il rischio di infiammazione alla ghiandola mammaria (Cero´n-Mun˜oz et al., 2002).

Un risultato interessante è stato ottenuto anche dallo studio sui fluidi follicolari ovarici dei due gruppi di bufale stabulate a differente densità. Infatti, anche in questo caso gli indici dello stato redox analizzati sono risultati simili tra i due gruppi, suggerendo che la riduzione dello spazio di stabulazione non dovrebbe alterare l'omeostasi redox follicolare. Ricordiamo che il sistema di difesa antiossidante, nell'ovario, svolge un ruolo fondamentale nella prevenzione

dell'apoptosi e atresia preservando così le funzioni steroidogeniche delle cellule della granulosa (Cassano et al., 1999).

I dati ottenuti dallo studio sulle bufale fecondate sono stati analizzati anche tenendo conto del fatto che alcune bufale erano gravide (P), altre non gravide (NP) e in altre si era verificato riassorbimento embrionale (EM) dopo l'inseminazione artificiale, per verificare se il diverso stato fisiologico fosse associato a differenze nei livelli dei marcatori plasmatici da noi selezionati come indicatori dello stato redox. L'elaborazione statistica dei dati ha dimostrato che non ci sono differenze significative, per quanto riguarda i livelli di Toc, Ret, Asc, e di N-Tyr e PC. Questo suggerisce che i vari processi metabolici e i cambiamenti endocrini associati con la gravidanza non influenzano i parametri dello stato redox qui analizzati, e inoltre, il risultato della fecondazione potrebbe non dipendere solo dai valori ematici valutati da noi in questo lavoro.

È noto che la mortalità embrionale, nelle bufale, è dovuta principalmente ad una ridotta secrezione di progesterone da parte del corpo luteo insieme ad una ridotta capacità dell'embrione di secernere l'interferone IFN $\alpha$  a valori soglia per prevenire la luteolisi (Campanile, 2005). In accordo con i dati della letteratura, abbiamo riscontrato che i valori plasmatici di progesterone (P $_4$ ) aumentano nel tempo solo nelle bufale gravide e che sono significativamente più alti delle bufale NP e EM. Da questi dati, sembra che la mortalità embrionale dipenda dai livelli plasmatici del progesterone e non dallo stress ossidativo.

Le nostre indagini hanno mostrato che le due condizioni di stabulazione non influenzano lo stato redox del plasma né quello del liquido follicolare, suggerendo così che la stabulazione delle bufale a 13.3 m<sup>2</sup>/capo possa essere utilizzata senza compromettere il benessere dell'animale e lo sviluppo del follicolo ovarico.

Recenti studi hanno esaminato l'effetto delle dimensioni delle stalle sullo stato di salute delle bovine da latte. È stato dimostrato che laddove le dimensioni delle stalle sono più piccole di quelle raccomandate, si verificano numerose carenze igieniche ed è maggiore la percentuale di animali con ferite (Zurbrigg et al., 2005).

La sperimentazione da noi condotta con le bovine ha dimostrato che la quota di Toc nel latte del gruppo NS<sub>B</sub> (a più bassa densità di stabulazione) è più alta rispetto al gruppo S<sub>B</sub>, in accordo col fatto che anche i livelli plasmatici di Toc sono più alti. Il più basso numero di cellule somatiche nel latte del gruppo S<sub>B</sub> potrebbe dipendere dal fatto che la stalla di questo gruppo ha condizioni igieniche ottimizzate, invece nel gruppo NS<sub>B</sub> sono state trovate condizioni igieniche standard. I più alti livelli plasmatici di N-tyr e i più bassi livelli di Ret e Toc, nel gruppo a maggiore densità di stabulazione (S<sub>B</sub>), potrebbero dipendere da fattori di stress ossidativo associati al tipo di stabulazione.

Dai dati complessivi ottenuti si può dedurre che mentre nelle bovine la riduzione dello spazio di stabulazione è associata ad alterazione dello stato redox, nelle bufale, la riduzione dello spazio di stabulazione non influenza lo stato redox plasmatico né quello del fluido follicolare, a conferma dell'elevata capacità adattiva delle bufale.

Possiamo inoltre suggerire che l'analisi di marcatori dello stato redox (PC, N-Tyr, Asc, Toc e Ret) nei fluidi biologici può essere utilizzata come ulteriore parametro per valutare l'effetto della stabulazione sugli animali "sani".

Il latte e i prodotti caseari sono una buona fonte di proteine di alta qualità e di antiossidanti liposolubili come Toc,  $\beta$ -carotene e Ret.

I tocoferoli inibiscono la catena di reazione della perossidazione lipidica andando a bloccare diversi radicali liberi che catalizzano l'inizio delle reazioni a catena. Toc ossidandosi, dà luogo a diversi intermedi tra cui l' $\alpha$ -tocoferilchinone (TQ) (Bieri et al., 1981), la produzione di TQ riflette, quindi, il consumo di Toc nelle reazioni antiossidanti (Faustman et al., 1999). Un elevato rapporto TQ/Toc è atteso quando sono presenti alti livelli di lipidi e bassi livelli di antiossidanti liposolubili. Tale risultato è stato ottenuto negli estratti di mozzarella di bufala dove, effettivamente, sono presenti elevate concentrazioni di grassi (circa il doppio di quella bovina) e bassi livelli di  $\beta$ -carotene (Addeo et al., 1995). Gli eventi ossidativi associati alla

produzione di mozzarella (come l'esposizione ad alte temperature e all'ossigeno), determinano la formazione di grandi quantità di lipoperossidi, che possono consumare grandi quantità di Toc. Questo spiegherebbe perché nella Mozzarella di bufala Campana è stato trovato un elevato rapporto TQ/Toc.

PC e DT sono markers di due eventi di ossidazione proteica diversi: i PC sono prodotti da reazioni di ossidazione dei carboidrati indotte dal calore (reazione di Maillard), i DT si formano da reazioni di ossidazione catalizzata da metalli che favoriscono la formazione di radicali idrossilici dai perossidi d'idrogeno o dai lipoperossidi (reazione di Fenton). L'aver trovato che i valori di DT sono paragonabili nei due gruppi di mozzarella suggerisce che i DT non sono la principale causa delle elevate quantità di aggregati di  $\alpha$ lattoalbumina trovate nella mozzarella bovina. È probabile, pertanto, che tali aggregati derivino da altro tipo di legami crociati tra due o più molecole di  $\alpha$ lattoalbumina oppure tra una molecola di  $\alpha$ lattoalbumina e altre proteine (o frammenti di proteine). Gli alti livelli di PC riscontrati nella mozzarella bovina possono essere responsabili della formazione di legami intramolecolari e avere un ruolo nella formazione di aggregati proteici stabili, legati covalentemente, che si sono ritrovati anche dopo l'elettroforesi in condizioni denaturanti e riducenti. Inoltre, la variabilità osservata tra i valori di PC nella mozzarella bovina può riflettere l'eterogeneità dei meccanismi di produzione adottati nelle diverse industrie (il che non accade nella produzione della mozzarella di bufala). Tuttavia, non è stata riscontrata una correlazione positiva tra i livelli di PC e la quantità di aggregati di  $\alpha$ lattoalbumina, come nella mozzarella di bufala, quindi è possibile che anche altri fattori fisici o chimici possano concorrere alla formazione di aggregati proteici.

Gli eventi ossidativi inducono la formazione di aggregati proteici che abbassano la qualità della mozzarella in termini di consistenza (Parris et al., 1993) e di perdita di amminoacidi assimilabili (Naranjo et al., 1998). In questo contesto la qualità della Mozzarella di Bufala Campana può essere ritenuta superiore rispetto alla mozzarella bovina. Per di più, il fatto che la mozzarella bovina contenga maggiori

livelli di antigeni pesanti di  $\alpha$ lattoalbumina può essere considerato un criterio oggettivo di distinzione tra mozzarella bovina e mozzarella di bufala. Resta da indagare se le differenze riscontrate tra i due tipi di mozzarella dipendono soltanto da differenze nella modalità di produzione o dalle differenze biochimiche esistenti tra latte bovino e bufalino.

## 8. Conclusione

I risultati ottenuti dalle ricerche effettuate hanno permesso di dimostrare che:

1. Sia Toc sia Ret sono legati da proteine presenti nel citoplasma di cellule mammarie. Come emerso dalle nostre analisi, queste proteine, che agiscono da “carriers” intracellulari, hanno apparentemente lo stesso peso molecolare (33 kD). Le variazioni nelle concentrazioni di questi carriers solubili sono associate alle variazioni del trasporto dei due antiossidanti attraverso le cellule mammarie.
2. L’aumento dei livelli plasmatici di T3, nelle bufale in lattazione, in inverno è associato all’incremento dei livelli di proteine che legano Ret e Toc nel citoplasma delle cellule epiteliali delle mammelle, e di conseguenza all’aumento dei livelli di Ret e Toc nel latte.
3. L’analisi di specifici marcatori dello stato redox nei fluidi biologici può essere utilizzata come ulteriore parametro per valutare l’effetto della stabulazione sugli animali.
4. L’aumento della densità di stabulazione non influenza lo stato redox del plasma né quello del liquido follicolare, il che permette di ipotizzare che la stabulazione delle bufale a 13.3 m<sup>2</sup>/capo possa essere utilizzata senza compromettere il benessere dell’animale e lo sviluppo del follicolo ovarico. Inoltre, è stata confermata la maggiore capacità adattativa delle bufale alle variazioni di condizioni esterne rispetto alle bovine.
5. La qualità della Mozzarella di Bufala Campana può essere ritenuta superiore rispetto a quella bovina, da un punto di vista organolettico (consistenza del prodotto) e da un punto di vista nutrizionale (disponibilità di amminoacidi assimilabili). Nel prodotto di bufala, infatti, l’entità dei danni ossidativi alla matrice proteica è minore rispetto a quello di origine bovina. Inoltre, la mozzarella bovina contiene maggiori livelli di antigeni pesanti contenenti  $\alpha$ -lattoalbumina. La presenza di questi specifici aggregati proteici

può essere utilizzata come criterio oggettivo di distinzione tra mozzarella bovina e Mozzarella di Bufala Campana.

## 9. Bibliografia

- Accomando G.** rivista on line "Rivista di Agraria.org" N. 43 - 1 settembre 2007
- Addeo et al.** 1995. tradizione ed innovazione nella produzione di Mozzarella di Bufala campana. *Bubalus bubalis*, 3. 46-62.
- Addeo, F., V. Alloisio, L. Chianese, and V. Alloisio.** 2007. Tradition and innovation in the water buffalo dairy products. *Ital. J. Anim. Sci.* 6(Suppl. 2):51–57.
- Amante L, Campanile G, Ciotola F, Coletta A, De Rosa C, Di Palo R, Peretti V, Zicarelli L.** studio preliminare sulle caratteristiche morfo-funzionali della bufala mediterranea italiana. Approccio alla valutazione lineare computerizzata. Opuscolo pubblicato nell'ambito del 1° congresso Nazionale sull'allevamento di Bufalo, Eboli (SA) Ottobre 2001.
- Associazione Italiana Allevatori (**AIA**). 1999. Controlli della produttività del latte in Italia. AIA-Roma.
- Barile, V. L., A. Galasso, C. Pacelli, M. Francillo, A. Cigliano, L.Penna, M. Panfili, M. Fiorini, and A. Borghese.** 1999. Conception rate in synchronised and artificially inseminated buffalo cows in two different seasons under field conditions. Pages 262–264 in Proc. 13th Mtg. Italian Sci. Assoc. Anim. Prod. Franco Angeli, Milano, Italy.
- Bauman D.E. and Elliot J.M.,** Control of nutrient partitioning in lactating ruminants, in: *Biochemistry of Lactation*, T.B. Mepham, ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1983, pp 43-468.
- Bell A.W. and Bauman D.E.,** Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation, *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2 (1997), 265-278.
- Berlett B.S., Stadtman E.R.** Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. 1997. *J. Biol. Chem* 272, 20313-20316.
- Bertoni, G.** (2001). I perché del benessere animale e come apprezzarlo nella lattifera. Supplemento a *l'Informatore Agrario*, 39: 7-9.
- Bertoni, G., Lombardelli, R., Piccioli Cappelli, F., Bartocci, S., Amici, A.,** 1994. Alcuni fattori che influenzano le condizioni endocrino-metaboliche della specie bufalina. *Agricoltura e Ricerca*. 16 (153): 87-98.
- Bettini T.M. e Ferrara L.** tentativo di interpretare mediante serie temporali la variazione della produzione latea in vacche in lattazione, *Prod. Anim.*, 13, 1974.
- Bieri et al.** 1981. on the occurrence of  $\alpha$ tocopherolquinone in rat tissue. *Lipids*, 16, 777-779.
- Bradford M.M.,** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72 (1976), 248-252.
- Brambell F. W. r.,** 1965. Report of the Technical Committee to inquire into the Welfare of Animals kept under Intensive Livestock Husbandry Systems. Command Report 2836, Her Majesty's Stationery Office, London.
- Broom, D. M.** (1986). Indicators of poor welfare. *Br. Vet. J.*, 142:
- Buss H., Chan T.P., Sluis K.B., Domigan N.M, Winterbourne C.C.** 1997. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radical Biology & Medicine* 23, 361–366.
- Campanile G., Neglia G., Gasparrini B., Galiero G., Prandi A., Di Palo R., D'Occhio M.J., Zicarelli L.,** 2005. Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. *Theriogenology* 63: pp. 2334-2340.
- Campanile, G., Di Palo, R., D'angelo, A.,** 1998. Haematological profile in buffalo. pp. 236- 249 in Proc. 3rd Course on biotechnology of reproduction in buffaloes, Caserta, Italy.

- Cassano E., Tosto L., Balestrieri M., Zicarelli L., Abrescia P.** (1999). Antioxidant defense in the follicular fluid of water buffalo. *Cell Physiol. And Biochem.* 9, 106-116.
- Castrillo M.** (2003). Una specie che resiste alla globalizzazione. *L'Allevatore*, 10.
- Catillo G., Macciotta N. P. P., Carretta A. and Cappio-Borlino A.** Effects of Age and Calving Season on Lactation Curves of Milk Production Traits in Italian Water Buffaloes *Journal of Dairy Science* Vol. 85, No. 5, 2002
- Cero'n-Mun~ oz M., Tonhati H., Duarte J., Oliveira J., Mun~ oz-Berrocal M., and Jurado-Ga'mez H.** Factors Affecting Somatic Cell Counts and Their Relations with Milk and Milk Constituent Yield in Buffaloes, *J. Dairy Sci.* 85:2885–2889, 2002.
- Chatterjee, I. B.** 1970. Biosynthesis of L-ascorbate in animals. Pages 18A:28–34 in *Methods in Enzymology*. D. B. McCormick and L. D. Wright, eds. Academic Press, San Diego, CA.
- Chilliard Y., and Bocquier F.,** *Ruminant Physiology*, P.J. Cronjè, ed., CABI Publishing, NewYork, USA, 2000, pp 205-223.
- composition. *Bubalus bubalis*, 4 : 51-57.
- Coppola, S., E. Parente, S. Dumontet, and A. La Peccerella.** 1988. The microflora of natural whey cultures utilized as starter in the manufacture of Mozzarella cheese from water-buffalo milk. *Lait* 68:295–310.
- Coppola, S., F. Villani, R. Coppola, and E. Parente.** 1990. Comparison of different starter systems for water-buffalo mozzarella cheese manufacture. *Lait* 70:411–423.
- Correale E.** (1987). *Informatore Zootecnico*, 9, 52-55.
- D.P.C.M.** 10/05/93 in G.U. n° 219, (1993). *Disciplina di produzione della Mozzarella di Bufala Campana.*
- Dawkins, M. S.** 1980. *Animal Suffering*. pp 10-26. Chapman Hall, London.
- De Franciscis, G.,** 1992. *Notizie sull'allevamento della bufala in Italia. Il Picentino.* 36: 15-36.
- De Rosa G, Grasso F, Braghieri A, Bilancione A, Di Francia A, and Napolitano F.** 2009 Behavior and milk production of buffalo cows as affected by housing system. *J. Dairy Sci.* 92:907–912
- Dharmarajan A.M., Hisheh S., Singh B., Parkinson S., Tilly K.I., Tilly J.L.** 1999. Antioxidants mimic the ability of chorionic gonadotropin to suppress apoptosis in the rabbit corpus luteum in vitro: a novel role of superoxide dismutase in regulating bax expression. *Endocrinology.* 140: 2555-2560
- Ercolini, D., G. Mauriello, G. Blaiotta, G. Moschetti, and S. Coppola.** 2004. PCR-DGGE fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo mozzarella cheese. *J. Appl. Microbiol.* 96:263–270.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H.** (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 11, 81-128
- Estevez I, Andersen IL & Nævdal E** 2007 Group size, density and social dynamics in farm animals. *Applied Animal Behaviour Science* 103 185–204
- Fisher, A.D., Crowe, M.A., Prendiville, D.J., Enright, W.J.,** 1997. Indoor space allowance: effects on growth, behaviour, adrenal and immune responses of finishing beef heifers. *Anim. Sci.* 64: 53-62.
- Fraser, D.** (1999). *Animal ethics and animal welfare science: bridging the two cultures.* *Applied animal behaviour science*, 65:171-189.
- Fustman C, Liebler D. C., Burr J.** A alpha-tocopherol oxidation in beef and in bovine muscle microsomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1396-1399, 1999.
- Gudas, L. J., Sporn, M. B., and Roberts, A. B.** (1994) in *The Retinoids, Biology, Chemistry and Medicine* (Sporn, M. B., Roberts, A. B., and Goodman, D. S., eds) 2nd Ed., pp. 443–520, Raven Press, Ltd., New York
- Haley, D.B., Rushen, J., De Passille, A.M.,** 2000. Behavioural indicators of cow comfort: activity and resting behaviour of dairy cows in two types of housing. *Can. J. Anim. Sci.* 80: 257-263.

- Halliwell B.** 1997. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? *FEBS Letters* 411, 157-160
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C.** 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Huggins T G, Well-Knecht M C, Detoire N A, Bayenes J W and Thorpe S R,** Formation of o-tyrosine and dityrosine in proteins during radiolytic and metal-catalyzed oxidation. *Journal Biological Chemistry*, 268 (17), 12341-12347, 1993.
- Hughes, B. O.** (1976). Behaviour as an index of welfare. *Proc. V Europ. Poultry Conf.*, Malta, 1005-1018.
- Ikeda S., Kitagawa M., Imai H., and Yamada M.** The roles of vitamin a for cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 51, No. 1, 2005.
- Infascelli, F., Cutrignelli, M.I., Bovera, F., Piccolo, G., Tudisco, R., Calabrò, S., Zicarelli, F. and INRA,** Alimentation des Bovins and Caprins, R. Jarrige, ed., Institut Nationale de la Recherche Agronomique, Paris, France, 1988.
- Jensen SK, Nielsen KN,** Tocopherols, retinol, beta-carotene and fatty acids in fat globule membrane and fat globule core in cows' milk. *J Dairy Res* 1996 Nov;63(4):565-74.
- Jensen SK, Johannsen AK, Hermansen JE.** Quantitative secretion and maximal secretion capacity of retinol, beta-carotene and alpha-tocopherol into cows' milk. *J Dairy Res* 1999 Nov;66(4):511-22
- Jero'nimo C, Henrique R, Oliveira J, Lobo F, Pais I, Teixeira M R, Lopes C.** Aberrant cellular retinol binding protein 1 (CRBP1) gene expression and promoter methylation in prostate cancer. *J Clin Pathol* 2004;57:872-876.
- Jialal, I., S. Devaraj, and N. Kaul.** 2001. The effect of alpha-tocopherol on monocyte proatherogenic activity. *J. Nutr.* 131:389-394.
- Jozwik M, Wolczynski S, Jozwik M and Szamatowicz M.** Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans, *Molecular Human Reproduction* vol.5 no.5 pp. 409-413, 1999.
- Koga, A.** 1991. Effects of high environmental temperatures on some physicochemical parameters of blood and heat production in swamp buffaloes and Holstein cattle. *Anim. Sci. Technol. (Jpn.)* 62:1022-1028.
- Kristal B.S, Yu B.P.** (1992). An emerging hypothesis: synergistic induction of aging by free radicals and Maillard reactions. *J. Gerontol.* 47, B 107-114
- Laurienzo P., Malinconico M., Pizzano R., Manzo C., Piciocchi N., Sorrentino A., and Volpe M. G.** Natural Polysaccharide-Based Gels for Dairy Food Preservation *J. Dairy Sci.* 89:2856-2864 2006
- Lindsay, D. B.** 1959. The significance of carbohydrate in ruminant metabolism. *Vet. Res. Annotations* 5:103-128.
- Macleod, D., X. Zhang, L. Ozimeck, and J. J. Kennelly.** 1999. Ascorbyl-2-polyphosphate as a source of ascorbic acid for dairy cattle. *Milchwissenschaft* 54:123-129.
- Mangelsdorf, D. J., Umesono, K., and Evans, R. M.** (1994) in *The Retinoids, Biology, Chemistry and Medicine* (Sporn, M. B., Roberts, A. B., and Goodman, D. S., eds) 2nd Ed., pp. 319-350, Raven Press, Ltd., New York.
- Maret G, Traber A, Graham W, Burton B and Hamilton R L.** Vitamin E Trafficking. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1031: 1-12 (2004).
- Maton, A., Daelemans, J.,** 1989. Modern housing of cattle and their welfare. In: *Agricultural engineering*. pp. 921-925 in *Proc. 11th Int. Congr. On Agricultural Engineering*, Dublin, Ireland.
- Maymone, B.** 1945. I bufali allevati in Italia. *Annali dell'Istituto Sperimentale Zootechnico di Roma*, vol. III: 5-65.
- McNamara J.P.,** Role and regulation of metabolism in adipose tissue during lactation, *Nutritional Biochemistry* 6 (1995), 120-129.

- Mench**, J. A., and A. van Tienhoven. 1986. Farm Animal welfare. Am. Sci. 74
- Menghi**, A., E. Corradini, and K. De Roest. 2007. Profitability of buffalo's milk in the province of Latina (Italy) in 2004 and 2005. Ital. J. Anim. Sci. 6(Suppl. 2):1390–1393.
- Monnier**, V., Gerhardinger, C., Marion, M. S., and Taneda, S. (1995) in Oxidative Stress and Aging (Cutler, R. G., **Packer**, L., Bertram, J., and Mori, A., eds) pp. 141–149, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland
- Montemurro**, N., Pacelli, C., Borghese, A., 1997. Blood metabolites change in milking buffalo cows. *Bubalus bubalis*. 3(3): 69-78.
- Napoli** J.L., Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism, *Biochimica and Biophysica Acta* 1440 (1999), 139-162.
- Napolitano**, F., (2001). Considerazioni sullo studio del benessere degli animali in produzione zootecnica. Large animals review, anno 7, n.1: 9-11.
- Napolitano**, F., De Rosa, G., Grasso, F., Migliori, G., Alnimer, M., Ferrara, L., Bordi, A., 2000. Influenza della densità di allevamento sul benessere della specie bufalina. pp. 165-173 in Proc. Nat. Workshop Stato di benessere ed efficienza riproduttiva negli animali di interesse zootecnico, Viterbo, Italy.
- Naranjo** et al. 1998. Reducing sugars effect on available lysine loss of casein by moderate heat treatment. *Food chemistry*, 62, 309-313.
- Nockels**, C. F. 1988. The role of vitamins in modulating disease resistance. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 4:531–542.
- O'Byrne** S M., Wongsiriroj N, Libien J, Vogel S, Goldberg I J., Baehr W, Palczewski K, and Blaner W S. Retinoid Absorption and Storage Is Impaired in Mice Lacking Lecithin:Retinol Acyltransferase (LRAT) *The Journal Of Biological Chemistry* VOL. 280, NO. 42, pp. 35647–35657, October 21, 2005
- O'Farrell** P.H., High resolution two-dimensional eletrophoresis of proteins, *The Journal of Biological Chemistry* 250 (1975), 4007-4021.
- Paonessa**, A. 2004. Influence of the preservation liquid of Mozzarella di Bufala Campana D.O.P. on some aspects of its preservation. *Bubalus bubalis* IV:30–36.
- Parris** et al., 1993. Aggregation of whey proteins in sweet whey. *Journal of agricultural and food chemistry*, 41,460-464.
- Piccolo, V. 2003. Nutritional characteristics of buffalo meat: Cholesterol content and fatty acid  
Publication No. 89: 238-247.
- Pugliese** C. (1998). Storia del bufalo italiano. *Bubalus bubalis*, 2, 30-38.
- Ramsey** J.J., Harper M-E. and Weindruch R., Restriction of energy intake, energy expenditure, and aging. *Free Radical Biology and Medicine* 29 (2000), 946-968.
- Rapporto AIA 2001.**
- Rapporto FAO 2001.**
- Rice-Evans** C and Miller N J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology*, 234, 279-293, 1994.  
Roma, vol. III: 5-65.
- Sandøe**, P., Munksgaard, L., Badsgard, N.P., Jensen, K.H., 1997. How to manage the management factor assessing animal welfare at the farm level. In J.T. Sørensen (ed.) *Livestock farming systems – More than food production*. Proc. 4th Int. Symp. On Livestock Farming Systems. EAAP Publ. No. 89, pp. 221-227.
- Sevi** A, Massa S, Annicchiarico G, Dell'Aquila S & Muscio A . 1999, Effect of stocking density on ewes milk yield, udder health and microenvironment. *Journal of Dairy Research* 66 489–499
- Stelwagen** K, Hopster H, Van Der Werf JT, Blokhuis HJ, Effects of isolation stress on mammary tight junctions in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2000 Jan;83(1):48-51
- KING N.** (1955). Commonwealth Agr. Bureaux-Fahan.

- Sundrum**, A. (1997). Assessing livestock housing conditions in terms of animal welfare – possibilities and limitations. In: Sørensen J. T. (1997). Livestock farming systems. More than food production. Proceedings of the 4th international symposium on livestock farming systems, Foulum, Denmark, 22-23 August 1996. EAAP
- Tannebaum**, J. (1991). Ethics and animal welfare: the inextricable connection. *J. of Am. Vet. Med. Ass.*, 198: 1360-1376.
- Terranova** M.L., and Laviola G (2004). Health-promoting factors and animal welfare. *Ann Ist Super Sanità*, 40:187-193
- Thomas** F. H., Leask R., Srs̃en V., Riley S. C., Spears N. and Telfer E. E. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. *Reproduction*,(2001) 122, 487–495.
- Uchida** K, Stadtman ER. 1993. Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra- and intermolecular cross-linking reaction. *J Biol Chem.* 268, 6388-6393
- Umetsu** H. Chuyen N.V. Digestibility and peptide patterns of modified lysozyme after hydrolyzing protease. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 44, 291-300, 1998.
- Vernon** R.G., Homeorhesis, in: *Research Reviews, Hannah Yearbook*, Hannah Research Institute, Ayr, U.K., 1998, pp 64-73.
- Williamson** D.H. and P. Lund, Cellular mechanisms for the regulation of adipose tissue lipid metabolism in pregnancy and lactation. In: *Nutrient Regulation During Pregnancy, Lactation and Infant Growth*, L. Allen, J. King and B. Lonnerdal, eds., Plenum Press, New York, USA, 1994, pp 45-70.
- Ye** Y.Z., Strong M., Huang Z.Q., Beckman J.S., 1996. Antibodies that recognize nitrotyrosine. *Methods in Enzymology* 269, 201-209.
- Zahar** M, Smith DE, Martin F , Vitamin A distribution among fat globule core, fat globule membrane, and serum fraction in milk. *J Dairy Sci* 1995 Mar;78(3):498-505
- Zicarelli** L. (2001 ). *Atti I Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo*. Eboli (SA). 1-19.
- Zicarelli** L., Coppola A., Franchi F., Gasperi M., Luisi M. (1984) Steroidi ovarici e prolattina in bufale anaestro: variabilità di risposta stagionale al ciclofenile. *Riv. Zoot. Vet.*, 12, 3.
- Zicarelli**, F., G. Campanile, B. Gasparini, R. Di Palo, and L. Zicarelli. 2005. Influence of the period and of the space on the milk production and on the consumption of dry matter in the Italian Mediterranean Buffalo. Pages 75–76 in *Proc. 3rd Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo – 1st Buffalo Symp. Europe and the Americas*, Paestum (SA), Italy.
- Zimmer** S., A. Stocker, M.N. Sarbolouki, S.E. Spycher, J. Sassoon and A. Azzi, A novel human tocopherol-associated protein, *The Journal of Biological Chemistry* 275 (2000), 25672-25680.
- Zurbrigg** K, Kelton D, Anderson N, Millman S. Stall dimensions and the prevalence of lameness, injury, and cleanliness on 317 tie-stall dairy farms in Ontario *Can Vet J* Volume 46, October 2005.