

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Produzioni Animali, Biotecnologie
Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti

Ciclo XXV

Stato nutrizionale e produzione di citochine:
effetti sulle performance produttive e riproduttive
in specie animali di interesse zootecnico

Coordinatore:
Chiar.ma Prof.ssa Paola Superchi

Tutor:
Chiar.ma Prof.ssa Roberta Saleri

Dottorando: Paolo Amicucci

INDICE

Premessa	01
Il suino “Nero di Parma”: contenuto in acidi grassi e caratteristiche endocrine del tessuto adiposo	04
Introduzione	05
Contenuto di acidi grassi del tessuto adiposo sottocutaneo ed intramuscolare	08
Introduzione	08
Materiali e metodi	08
Analisi statistica	09
Risultati	09
Discussione	11
Adipochine e tessuto adiposo: confronto fra tre tipi genetici di suino	13
Introduzione	13
Leptina	14
Adiponectina	15
Resistina	16
Mediatori dell’infiammazione	16
Altre adipochine	17
Materiali e metodi	19
Risultati	23
Leptina	23
Resistina	24
Adiponectina	24
Mediatori dell’infiammazione	24
Altre adipochine	25
Discussione	26
Effetti della supplementazione di nucleotidi nella dieta sulle performance di crescita, sui marcatori biologici e sulle risposte ormonali e immunitarie nei suinetti	28
Introduzione	29
Materiali e Metodi	31
Animali, allevamento e diete	31

Rilievi	33
Analisi del rame e dello zinco	33
Analisi ormonale	33
Linfociti da sangue periferico	34
Espressione genica delle citochine	35
Analisi statistica	36
Risultati	37
Performance di crescita	37
Ormoni	39
Risposta immunitaria	40
Discussione	42
Variazioni ematiche della leptina durante la gestazione e la lattazione nella scrofa. Interazione con l'asse somatolattotropo materno	46
Introduzione	47
Materiali e metodi	48
Animali	48
Analisi ormonali su plasma materno	49
Leptina	49
Ormone somatotropo	49
Prolattina	49
Progesterone	50
Cortisolo	50
Espressione della leptina e dei suoi recettori sulla placenta	50
Analisi statistica	51
Risultati	51
Leptina	51
Ormone somatotropo	53
Prolattina	54
Progesterone	55
Cortisolo	56
Discussione	57
Bibliografia	60

PREMESSA

Gli stress nutrizionali e sociali sono importanti fattori che influenzano lo stato neuro-endocrino immunitario e determinano un incremento nel dispendio energetico negli animali influenzandone le performance produttive e riproduttive. Questo lavoro di tesi si è soffermato su alcuni aspetti di questa problematica, prendendo in considerazione una specie, quella suina, che riveste un grande interesse zootecnico, ma presenta, nelle varie tipologie di allevamento, necessità e richieste assolutamente diverse. Il fil rouge che lega questo studio è dato dalle citochine, un insieme di proteine secrete da svariati tipi di cellule legate fondamentalmente al sistema immunitario, che presentano una grande varietà di funzioni. Se per lungo tempo il termine citochina è stato associato a cellule immunitarie, negli ultimi vent'anni, si è profilato un nuovo tessuto sede attiva di produzione di questi fattori, il tessuto adiposo. Il tessuto adiposo è stato per lungo tempo tradizionalmente considerato come un tessuto dedito allo stoccaggio di energia. Tuttavia, già negli anni '50 Kennedy postulò l'esistenza di un fattore prodotto dagli adipociti in grado di agire centralmente inibendo l'assunzione di cibo e aumentando il consumo di energia, quando il peso del corpo eccede il cosiddetto valore soglia. La scoperta, avvenuta nel 1994, da parte di Zhang (Zhang et al., 1994) del gene ob e del suo prodotto genico, la leptina, ha permesso di gettare luce sul meccanismo omeostatico di regolazione del peso corporeo. La scoperta della leptina alimentò la speranza nelle comunità scientifiche e cliniche di una risposta al grave problema dell'obesità. In realtà, l'asse leptinico si è dimostrato molto più complesso di quanto atteso e negli anni gli studi sul tessuto adiposo si sono moltiplicati portando a tratteggiarne un profilo di vero organo endocrino. Come conseguenza della crescente attenzione dedicata allo studio del tessuto adiposo negli ultimi anni, l'attuale comprensione della biologia degli adipociti e il loro ruolo nella

fisiologia e patologia è notevolmente migliorata. In ambito veterinario, il forte interesse nato intorno a questo tessuto ha un duplice sguardo. Il primo, più evidente, in parallelo con la medicina umana, legato all'aspetto dell'obesità che affligge gli animali da compagnia, il secondo, all'importanza dell'aspetto fisiologico: capire come funziona il tessuto adiposo e quale può essere il ruolo delle molecole che produce, al fine di migliorare le produzioni zootecniche. Il tessuto adiposo è infatti coinvolto nella regolazione dei sistemi immunitario ed endocrino ed i fattori espressi dagli adipociti sono legati alla qualità delle produzioni animali. In particolare, la genetica della qualità della carne suina è diventata oggetto di attività di ricerca ed il suo studio è attualmente un elemento essenziale per soddisfare le richieste del consumatore attento alle qualità organolettiche dei prodotti. La qualità della carne è influenzata da un gran numero di fattori e un ruolo importante nel "disegnare" la composizione della carcassa è proprio quello del tessuto adiposo. La ricerca dei geni associati ai caratteri qualitativi della carcassa degli animali ha messo in chiara evidenza la notevole potenzialità delle tecniche di biologia molecolare per fini applicativi. Il mio lavoro si è quindi centrato su una specie importante dal punto di vista produttivo, la specie suina e, in quest'ottica, la prima parte di questa tesi è stata dedicata alla caratterizzazione del tessuto adiposo di una razza suinicola autoctona, il "Nero di Parma" che per la pregiatezza di alcuni suoi tagli commerciali (lardo, culatello) si affianca alle cosiddette razze bianche presenti negli allevamenti intensivi. Ho valutato le caratteristiche del tessuto adiposo dal punto di vista della composizione in acidi grassi, ponendolo a confronto con quello proveniente da razze commerciali e in parallelo ho studiato l'espressione di alcune adipochine, implicate nella regolazione dell'omeostasi energetica e nel metabolismo ed assorbimento dei lipidi. Il termine adipochina raccoglie una popolazione molto ampia e varia di fattori: dai più noti, quali leptina e adiponectina, fino alle classiche citochine infiammatorie e non (e.g TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ). Proprio

la presenza di questi fattori, storicamente legati al sistema immunitario, mi ha spinto a guardare oltre, andando a focalizzare l'attenzione su altre fasi del ciclo produttivo in quanto, almeno in un allevamento intensivo, hanno un notevole impatto economico e sanitario. Mentre il suino Nero di Parma è allevato allo stato brado e quindi nel rispetto delle abitudini sociali della specie, nell'allevamento intensivo gli animali sono inevitabilmente sottoposti a situazioni di stress ad alto impatto economico. Nell'allevamento intensivo uno dei maggiori momenti di stress sociale e nutrizionale è rappresentato dal periodo dello svezzamento, con lo shift dal latte materno all'alimento secco che induce serie modificazioni morfo-funzionali dell'apparato gastroenterico. Il mio studio ha quindi indagato lo stato neuroendocrino ed immunitario in suinetti durante la lattazione ed il successivo svezzamento e valutato quanto una supplementazione con nucleotidi possa migliorare la capacità di risposta allo stress da svezzamento. L'ultimo aspetto che in questa specie ho affrontato e che, per così dire, "chiude il cerchio" è stato focalizzato sulle scrofe in gestazione. A differenza delle femmine gestanti appartenenti ad altre specie, le scrofe sono sottoposte a razionamento e non possono soddisfare l'iperfagia gravidica tipica della gestazione in quanto un'eccessiva adiposità al parto ha effetti nefasti non solo sulla vitalità dei suinetti ma anche sul comportamento alimentare delle scrofe durante la successiva lattazione e sulla ripresa dell'attività ciclica. Inoltre se, come è vero, le performance produttive di un soggetto si determinano già nella vita intrauterina, mi è sembrato interessante studiare l'andamento della leptina in tali soggetti e cercare di capire quale possa essere il ruolo di tale ormone in questi soggetti.

CAPITOLO I

*Il suino “Nero di Parma”:
contenuto in acidi grassi e
caratteristiche endocrine
del tessuto adiposo*

Introduzione

Il suino “Nero di Parma” (Figura 1) rappresenta un tipo genetico, ottenuto a seguito di un programma volto al recupero di una razza locale della provincia di Parma, riconosciuto dal Ministero dell’Agricoltura (D.M. n. 20196, 24/1/2006) nell’ambito di un Registro Riproduttori Ibridi gestito dall’ANAS (Sabbioni et al., 2009). È un animale robusto, di mole medio-grande, ma con un giusto equilibrio tra conformazione della coscia e della spalla. È riconoscibile dalla sua pelle di colore ardesia scuro e dal suo mantello formato da setole rade di colore grigio scuro tendente al nero. Tra le caratteristiche che lo contraddistinguono vi sono le orecchie dirette in avanti e verso il basso, e, in alcuni esemplari, delle appendici che partono dalle guance, denominate "tettole".

Figura 1: Esempari di suino “Nero di Parma”



È un tipo genetico a prolificità bassa ed attualmente gli animali censiti ed allevati fra Parma e Piacenza sono circa un migliaio divisi fra 28 allevamenti.

Le caratteristiche della carne del Nero di Parma sono legate all'abbondanza di grasso intramuscolare, a causa della particolare capacità di accumulare grasso sottocutaneo e tra le fibre muscolari (Sabbioni et al., 2010) rispetto alle razze bianche come la Large White e Landrace ed ai loro incroci (Figura 2).

Figura 2: Culatello di suino “Nero di Parma” (sinistra) e di suino ibrido industriale (destra): ben evidenti sia la marezzatura che la maggior quantità di grasso.



Questa modalità di deposito del grasso è stata denominata *thrifty genotype*, (Neel, 1962) ossia genotipo parsimonioso ed è stata trovata, oltre che in diverse specie, anche nel suino iberico (Gonzales-Añover et al., 2011). La capacità di immagazzinare il grasso in eccesso rappresenta un meccanismo di adattamento all'ambiente durante i cicli stagionali di carestia: questi soggetti tendono ad accumulare grasso quando il cibo è in eccesso.

Tuttavia, mentre il suino iberico è oggetto di molti studi, tesi a definirne sia le caratteristiche organolettiche della carne, sia quelle genetiche del deposito e accumulo di grasso, non esistono dati relativi inerenti al suino Nero di Parma.

È noto che l'equilibrio tra la biosintesi e l'ossidazione degli acidi grassi determina lo spessore del grasso sottocutaneo ed il suo contenuto a livello intramuscolare. L'adipogenesi, cioè il processo di differenziazione degli adipociti che contribuisce all'aumento della massa adiposa (Loo et al, 2009) e la regolazione dell'assorbimento dei lipidi sono fortemente influenzati dalla razza animale e, in misura minore, dalla dieta (Morales et al., 2002). Il tessuto adiposo bianco (WAT), con la sua fonte di peptidi bioattivi, è coinvolto in questa serie di processi (Farmer, 2006).

Il mio lavoro si è quindi sviluppato in due momenti, il primo teso a valutare il contenuto in acidi grassi nel tessuto adiposo sottocutaneo ed intramuscolare: interesse non solo dal punto di vista tecnologico, ma anche per i risvolti sulla salute umana (Zhang et al., 2007). Successivamente, partendo dal presupposto che i fattori genetici influenzano in modo significativo le caratteristiche organolettiche e la qualità della carne, ho confrontato l'espressione di alcuni fattori coinvolti nella deposizione e nell'accumulo di grasso in tre tipi genetici: il Nero di Parma, il suino industriale [Large White puro o incrociato con Landrace: Lw x (Lw x L)], ed il suino ibrido ottenuto dall'incrocio Nero di Parma x [Lw x (Lw x L)].

Contenuto di acidi grassi del tessuto adiposo sottocutaneo ed intramuscolare.

Introduzione

La composizione in acidi grassi del tessuto adiposo è di grande interesse per la sua implicazione verso la salute umana. È influenzata da fattori ambientali, come la dieta, e da fattori genetici, come la razza, il sesso e il genotipo (De-Smet et al., 2004). Un elevato consumo di acidi grassi saturi (SFA) provoca livelli elevati di colesterolo nel plasma, contribuendo all'aumento delle malattie cardiovascolari (Bronte-Stewart et al., 1956). Al contrario, gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) e monoinsaturi (MUFA) diminuiscono la concentrazione circolante di colesterolo a bassa densità (LDL, Low Density Lipoprotein) (Woollett et al, 1992;. Rudel et al, 1995.). La preoccupazione per la salute dovuta ai grassi alimentari, in particolare agli SFA, ha indotto la selezione verso la produzione di suini “magri”.

Materiali e metodi

La ricerca è stata condotta su 18 suini del tipo genetico Nero di Parma, maschi castrati e femmine, allevati all'aperto nella stessa struttura ed alimentati con un mangime biologico a base di cereali e di pisello proteico, integrato con foraggio. Per ogni soggetto è stato calcolato il coefficiente di inbreeding, attraverso l'analisi del pedigree (Gutierrez et al., 2005). Alla macellazione sono stati prelevati campioni di grasso di deposito a livello di regione dorsale (punto P2), regione della groppa (grasso di rifilatura della coscia) e di muscolo *longissimus dorsi* (in corrispondenza delle prime vertebre toraciche). I campioni di lardo prelevati al punto P2 sono stati suddivisi nei due strati interno ed esterno. La composizione in acidi grassi del tessuto adiposo sottocutaneo ed intramuscolare è stata determinata previa estrazione dei lipidi totali secondo la procedura di Folch *et al.* 1957, e

transmetilazione di una aliquota di grasso (250 mg). Gli esteri metilici degli acidi grassi (FAME) sono stati quindi sottoposti ad analisi cromatografica mediante un gascromatografo HP 6890 (Agilent Technologies Italia, Milano) dotato di colonna capillare HP INNOWax (30 m, 0,25 mm, spessore 0,25 μ m), iniettore split (260°C) e rivelatore a ionizzazione di fiamma (270°C). La composizione acidica è presentata in termini percentuali (% FAME).

Analisi statistica

I dati sono stati elaborati con analisi della covarianza, adottando un modello lineare comprendente, come fattori fissi, la localizzazione (4 livelli), il sesso (2 livelli), la data di macellazione (5 livelli) e l'interazione sesso*localizzazione, e, come covariate l'età alla macellazione (valore medio = 430 giorni), il peso della carcassa (valore medio = 153 kg) ed il coefficiente di inbreeding (valore medio = 19,7%). Il fattore localizzazione è stato poi scomposto nei tre confronti ortogonali permessi dai gradi di libertà: a) sottocutaneo vs intramuscolare; b) regione dorsale vs groppa; c) strato esterno vs interno.

Risultati

L'età alla macellazione ed il peso della carcassa sono risultati elevati, in rapporto ai parametri normalmente riscontrati su suini provenienti da allevamenti intensivi, ma sono comunque da considerarsi comuni nell'ambito dell'allevamento all'aperto del suino Nero di Parma. La tabella 1 riporta l'analisi della covarianza condotta sui dati sperimentali. Il modello adottato ha spiegato quote di variabilità oscillanti fra il 39.5% (C20:3) ed il 90.8% (PUFA). Fra i fattori presi in considerazione dal modello, la localizzazione è risultata la fonte di variabilità maggiormente coinvolta nella composizione in acidi grassi del tessuto adiposo. L'interazione sesso*localizzazione non è invece quasi mai risultata significativa.

Tabella 1: Analisi della covarianza.

Fattori	Sesso	Localizza- zione	Macellazione	Sesso*Loca- lizzazione	Covariate			R ²
					Inbreeding	Età	Car- cassa	
G.L.	1	3	4	3	1	1	1	
C10	*	**	**	n.s.	n.s.	**	**	0.889
C12	*	n.s.	**	n.s.	n.s.	***	*	0.657
C14	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	**	*	0.653
C14:1	***	n.s.	*	n.s.	**	***	*	0.806
C16	n.s.	**	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	0.751
C16:1	**	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.858
C17	n.s.	*	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.700
C17:1	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.590
C18	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.494
C18:1	*	*	**	n.s.	*	*	n.s.	0.727
C18:2	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	0.911
C18:3	**	***	*	n.s.	n.s.	n.s.	*	0.841
C20	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.671
C20:1	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.842
C20:2	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.855
C20:3	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.395
C20:4	*	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.784
SFA	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.658
MUFA	n.s.	*	**	n.s.	*	*	n.s.	0.733
PUFA	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	0.908
SFA/UFA	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.665

*:P<0,05; **:P<0,01; ***:P<0,001; n.s.: P>0,05.

Nella tabella 2 sono indicate le medie stimate del contenuto di acidi grassi nelle diverse localizzazioni ed i relativi contrasti ortogonali. Il tessuto adiposo sottocutaneo, rispetto a quello intramuscolare, ha presentato valori significativamente inferiori di C10, C16, C16:1, C18, C20:3, SFA e MUFA, e valori superiori di C17, C17:1, C18:2, C18:3, C20:1, C20:2, C20:4 e PUFA. Limitatamente al grasso sottocutaneo, quello prelevato al punto P2, rispetto a quello di rifilatura della coscia, ha mostrato un minor contenuto di C18:1, C20:1, C20:2, C20:4 e

MUFA. Lo strato adiposo esterno al punto P2 si è caratterizzato per un più ridotto contenuto di C16 e di SFA rispetto all'interno e per un più basso rapporto fra acidi grassi saturi e insaturi ($P < 0,05$).

Tabella 2: Effetto della localizzazione sul contenuto in acidi grassi (% FAME) del tessuto adiposo nel suino Nero di Parma. P2E: grasso sottocutaneo a livello dorsale, strato esterno. P2I: grasso sottocutaneo a livello dorsale strato interno. GR: grasso sottocutaneo a livello della groppa. IM: grasso intramuscolare.

	Localizzazione				Contrasti ortogonali				DSR
	P2E	P2I	GR	IM	P2E+P2I+ GR <i>vs</i> IM	P2E+P2I GR	<i>vs</i> P2E P2I		
C10	0.06	0.06	0.06	0.07	<0.001	n.s.	n.s.	0.01	
C12	0.11	0.11	0.10	0.10	n.s.	n.s.	n.s.	0.01	
C14	1.71	1.79	1.70	1.70	n.s.	n.s.	n.s.	0.10	
C14:1	0.03	0.03	0.03	0.03	n.s.	n.s.	n.s.	0.00	
C16	23.56a	25.22b	22.95a	25.50b	<0.05	<0.10	<0.01	1.14	
C16:1	3.01a	3.22a	2.93a	4.13b	<0.001	n.s.	n.s.	0.26	
C17	0.28b	0.28b	0.28b	0.18a	<0.01	n.s.	n.s.	0.05	
C17:1	0.30	0.27	0.31	0.21	<0.05	n.s.	n.s.	0.06	
C18	16.99	17.65	16.22	18.74	<0.05	n.s.	n.s.	1.43	
C18:1	36.90ab	35.70a	38.23b	38.01b	n.s.	<0.05	<0.10	1.36	
C18:2	13.47b	12.52b	13.35b	8.48a	<0.001	n.s.	n.s.	1.19	
C18:3	0.88b	0.86b	0.89b	0.59a	<0.001	n.s.	n.s.	0.09	
C20	0.22	0.22	0.22	0.21	n.s.	n.s.	n.s.	0.02	
C20:1	1.22b	1.00a	1.32b	0.96a	<0.01	<0.05	<0.01	0.13	
C20:2	0.86c	0.69b	0.99c	0.39a	<0.001	<0.05	<0.05	0.14	
C20:3	0.21a	0.19a	0.17a	0.58b	<0.001	n.s.	n.s.	0.18	
C20:4	0.22c	0.18b	0.25c	0.11a	<0.001	<0.05	<0.05	0.04	
SFA	42.92a	45.34b	41.54a	46.49b	<0.05	<0.10	<0.05	2.20	
MUFA	41.45ab	40.23a	42.82bc	43.34c	<0.05	<0.05	n.s.	1.45	
PUFA	15.63b	14.43b	15.64b	10.17a	<0.001	n.s.	n.s.	1.39	
SFA/UFA	0.759a	0.833b	0.723a	0.866b	<0.05	<0.10	<0.05	0.064	

a, b, c diversi per $P < 0.05$.

Discussione

Il contenuto di acidi grassi del tessuto adiposo sottocutaneo del suino Nero di Parma si è caratterizzato per un più basso contenuto di acidi

grassi saturi e monoinsaturi ed un più elevato tenore di polinsaturi, rispetto a quello intramuscolare. Tale rilievo è in accordo con quanto riportato da Perez-Palacios et al. (2009) per il suino Iberico, allevato al pascolo durante il finissaggio ed alimentato con ghiande o concentrati arricchiti in acido oleico (Monziols et al., 2007) per suini Large White e incroci LW*Meishan. Ciò può assumere importanza anche nel caso del suino Nero di Parma, in relazione all'impiego alimentare del lardo, sia per una riduzione dell'incidenza di problemi cardiovascolari nell'uomo, legato all'assunzione di una fonte lipidica ad elevato tenore di PUFA e correlato alla riduzione del colesterolo-LDL (Zhang et al., 2007, Woollett et al., 1992, Rudel et al., 1995), sia per il possibile ruolo dei grassi polinsaturi nel processo di irrancidimento della frazione lipidica durante la stagionatura. Anche i risultati emersi dal confronto fra le diverse tipologie di grasso sottocutaneo nel suino Nero di Parma, caratterizzate da valori più alti di C18:1 e MUFA nel grasso di copertura del prosciutto rispetto a quello dorsale, hanno trovato conferma in bibliografia (Rudel et al., 1995). Le differenze fra gli strati esterno ed interno del grasso sottocutaneo riscontrate nella nostra indagine, caratterizzate da un maggior contenuto di C16 e SFA e da un più basso contenuto di C20:1, C20:2 e C20:4 nello strato interno, accompagnati da un più elevato rapporto SFA/UFA, trovano conferma nei risultati ottenuti su altri tipi genetici (Rudel et al., 1995, Daza et al., 2009).

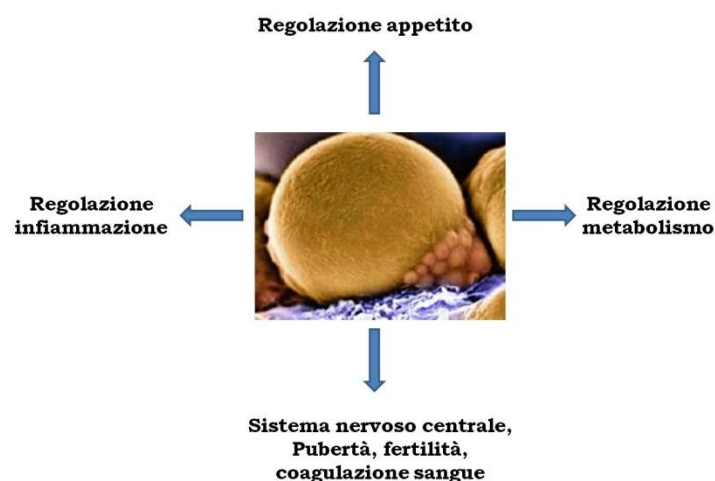
In conclusione possiamo affermare che la composizione in acidi grassi del tessuto adiposo del suino Nero di Parma risente in modo significativo della localizzazione del grasso. Ai fini della valorizzazione dei prodotti ottenuti da tale tipo genetico, analogamente a quanto avvenuto con il suino Iberico (Perez-Palacios et al., 2009), appare importante continuare le indagini al fine di stabilire l'effetto di altri fattori (in particolare la razione) sulla qualità dei grassi.

Adipochine e tessuto adiposo: confronto fra tre tipi genetici di suino.

Introduzione

Nel 1994 la scoperta della leptina (Zhang et al., 1994), un ormone con struttura simile alle citochine e con un'ampia gamma di funzioni biologiche, ha conferito agli adipociti la dignità di cellule endocrine. Le adipochine sono molto diverse tra di loro, sia in termini di struttura che di funzione. Esse includono citochine classiche, fattori di crescita, proteine di trasporto, enzimi, proteine della fase acuta e della risposta allo stress, proteine della via alternativa del sistema del complemento, proteine dell'emostasi, della coagulazione e del tono vascolare. La maggior parte delle adipochine interviene, soprattutto, nel bilancio energetico e nel metabolismo lipidico (Trayhurn et al., 2004). Questa ampia gamma di fattori e segnali proteici ci lascia intendere quanto il tessuto adiposo sia un organo complesso, altamente integrato nella fisiologia e nel metabolismo degli animali, capace di stabilire nessi di comunicazione con altri tessuti e organi, non ultimo il sistema nervoso centrale (Figura 3).

Figura 3: Principali funzioni del tessuto adiposo.



Leptina

La leptina (da *leptos* = magro) è una proteina di 167 amminoacidi con una struttura a 4 eliche, analoga a quella delle citochine, con un peso molecolare di circa 16 kDa. È prodotta prevalentemente, ma non esclusivamente, dal tessuto adiposo bianco: nelle femmine in gestazione, ad esempio, la placenta diviene sede attiva. Altri siti di sintesi sono il tessuto adiposo bruno, l'epitelio gastrico, gli osteoblasti, l'epitelio mammario, il fegato e il cuore, ma in molti casi l'effetto è locale, cioè con azione paracrina piuttosto che endocrina (Klok et al., 2007). La sintesi e la secrezione della leptina è regolata da una complessa serie di segnali neuroendocrini, endocrini e paracrini. I meccanismi biochimici e molecolari alla base della sintesi e della secrezione di questo peptide non sono completamente definiti, tuttavia sono stati identificati vari fattori regolatori: alcuni fattori stimolanti sono l'insulina, i glucocorticoidi, il TNF- α , la prolattina e gli estrogeni; alcuni inibitori sono le catecolamine, gli androgeni, gli agonisti dei recettori β -adrenergici e gli ormoni tiroidei (Bradley et al., 2001). La concentrazione di leptina in circolo è proporzionale alla quantità di tessuto adiposo e la dimensione degli adipociti sembra essere un determinante per la sua sintesi (Maffei et al., 1995). Pertanto, l'espansione del tessuto adiposo (energia in eccesso) aumenta la sintesi e secrezione della leptina; al contrario, la perdita di massa grassa porta a inibizione della secrezione di leptina con conseguente aumento di appetito e diminuzione della spesa energetica. Così la concentrazione di leptina aumenta con la sovralimentazione; ma è soggetta a notevole variabilità individuale indipendentemente dalla quantità di massa grassa. Infatti fattori quali l'età, il sesso, l'attività fisica, l'apporto calorico, l'indice di massa corporea (BMI) e la genetica influenzano la concentrazione fisiologica della leptina (Kratzsch et al., 1997).

Alcune cavie con mutazione del gene per la leptina (*ob/ob*) o per il suo recettore (*db/db*) mostrano un'adiposità massiva (Trayhurn et al., 2004) e di conseguenza un'aumentata concentrazione plasmatica di leptina,

che può portare a leptino-resistenza centrale (Gonzalez-Añover et al., 2011). La leptina agisce legandosi ai suoi recettori OB-R, anch'essi molto simili ai recettori delle citochine. Esistono diverse isoforme del recettore distribuiti in numerosi tessuti. (Klok et al, 2007). L'ipotalamo è il principale centro regolatore dell'assunzione di cibo e del dispendio di energia e la leptina plasmatica attraversa la barriera ematoencefalica attraverso un sistema di trasporto saturabile mediato dai recettori OB-Ra e OB-Rc, mentre l'isoforma OB-Rb sembra essere quella che attiva la cascata dei segnali di trasduzione JAK/STAT (Lopez et al., 2007).

Adiponectina

L'adiponectina è prodotta dagli adipociti maturi e viene secreta nel torrente ematico. Strutturalmente appartiene alla superfamiglia del collagene e si presenta in tre forme oligomeriche maggiori: un trimero a basso peso molecolare, un esamero con peso molecolare medio ed un 12-18-mero ad alto peso molecolare. Sono stati identificati due recettori per l'adiponectina, uno (AdipoR1) è espresso nel muscolo, l'altro (AdipoR2) è espresso prevalentemente dal fegato; pertanto gli effetti biologici dell'adiponectina non dipendono solo dalla sua concentrazione in circolo, ma anche dall'attività ed espressione di specifici recettori tissutali (Oh et al., 2007). Comunemente, l'adiponectina è espressa abbondantemente nell'adipocita, ma, diversamente da altre adipochine, i suoi livelli plasmatici correlano negativamente con l'adiposità. L'adiponectina migliora la sensibilità all'insulina nel tessuto adiposo, nel muscolo e nel fegato; favorisce l'ossidazione dei lipidi; migliora la vasodilatazione endotelio-dipendente; riduce l'espressione delle proteine di adesione; inibisce la differenziazione dei monociti e la formazione di cellule schiumose. È stato osservato che l'adiponectina possiede importanti proprietà antinfiammatorie, contrastando gli effetti negativi del TNF- α (Berg et al., 2005).

Resistina

La resistina era generalmente considerata un prodotto esclusivo del tessuto adiposo, ma sono state osservate espressioni anche nel pancreas, nella placenta e nel fegato (Wilkinson et al., 2007). È un ormone peptidico di circa 12 kDa, appartenente alla famiglia delle proteine ricche in cisteina e circola nel sangue in forma esamerica (Steppan et al., 2004). Benchè sul suo ruolo si sappia ancora poco, soprattutto in virtù delle differenze riscontrate fra le due specie più studiate (uomo e topo) è comunque implicata nella regolazione dei processi infiammatori associandosi all'attività del TNF- α e dell'IL-6 (Fagnoli et al., 2010). È riconosciuta una correlazione positiva tra la resistina e l'indice di massa corporea (BMI) oltre ad un'azione antagonista sull'insulina (Azuma et al., 2003) in quanto è stata trovata all'interno dell'ipotalamo, e quindi si pensa che abbia un ruolo nel bilancio energetico (Bouret et al., 2004). Infine partecipa al controllo della massa grassa insieme all'adiponectina (Hivert et al., 2008) Nonostante il notevole interesse generato dalla sua scoperta, ancora poco si conosce sulle vie di segnalazione mediante le quali la proteina induce i suoi effetti metabolici (Gelsinger, 2010).

Mediatori dell'infiammazione

Una svolta essenziale nella comprensione del ruolo dell'adipocita è stata determinata dal riconoscimento che il tessuto adiposo è la sede patogenetica di molti dei disordini correlati all'aumento di grasso e che l'eccesso di adiposità viscerale si associa ad uno stato flogistico di basso grado (Weisberg et al, 2003). È stata dimostrata un'espressione aumentata del Fattore di Necrosi Tumorale α (TNF- α) nel tessuto adiposo dell'animale geneticamente obeso (Hotamisligil et al. 1993). Da allora sono stati individuati molti altri fattori secreti dal tessuto adiposo come interleuchine (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10), interferone- γ (INF- γ) e fattori della cascata del complemento (Schenk et al., 2008). I livelli circolanti di questi fattori aumentano con l'aumentare della massa adiposa, specie

se addominale. Molti di questi fattori della flogosi sono prodotti, oltre che dagli adipociti, anche dai macrofagi attivati residenti nel tessuto adiposo; la presenza di queste cellule infiammatorie è molto probabilmente determinata dal reclutamento di monociti circolanti ad opera di fattori chemiotattici prodotti da adipociti resi ipertrofici dall'eccesso calorico e perciò sofferenti. L'infiltrazione monocitaria nel tessuto adiposo amplifica il processo flogistico (Neels et al., 2006).

Altre adipochine

Tra le altre adipochine più conosciute, ho preso in considerazione la Lipoprotein Lipasi (LPL) che svolge un ruolo importante nel metabolismo e trasporto dei lipidi. È un enzima responsabile dell'idrolisi dei trigliceridi (Eckel et al., 1988), può interagire con le lipoproteine ed ancorarle alla parete dei vasi per facilitare l'assorbimento degli acidi grassi; promuove anche lo scambio di lipidi tra lipoproteine plasmatiche. Queste attività fisiologiche regolano la fornitura degli acidi grassi ai vari tessuti (Seo et al., 2000).

L'Acido Grasso Sintasi (FAS) è un enzima che svolge un ruolo chiave nella sintesi degli acidi grassi: non è un singolo enzima, ma è un sistema enzimatico composto da un polipeptide multifunzionale di 272 kDa (Smith et al., 2003), che agisce sugli acidi grassi effettuando l'aggiunta sequenziale di unità di carbonio. Oltre al suo ruolo diretto nella sintesi di nuovi acidi grassi, è anche importante per la regolazione dell'assunzione di cibo. Un suo inibitore radiomarcato è stato trovato nel cervello, tuttavia il meccanismo fisiologico con cui una ridotta attività di FAS porti a una minor assunzione di cibo è ancora da determinare (Loftus et al., 2000).

La produzione delle adipochine è coregolata da numerosi fattori quali proteine di trasporto, proteine di membrana e fattori trascrizionali. La Proteina Regolatrice dell'Elemento-Associazione dello Sterolo (SREBP) rappresenta un gruppo di 3 fattori di trascrizione, SREBP-1a, SREBP-1c, SREBP-2, e sono membri della famiglia delle proteine a cerniera di

leucina. SREBP-1c è principalmente coinvolto nella regolazione dei geni correlati alla sintesi dei trigliceridi ed alla differenziazione degli adipociti.

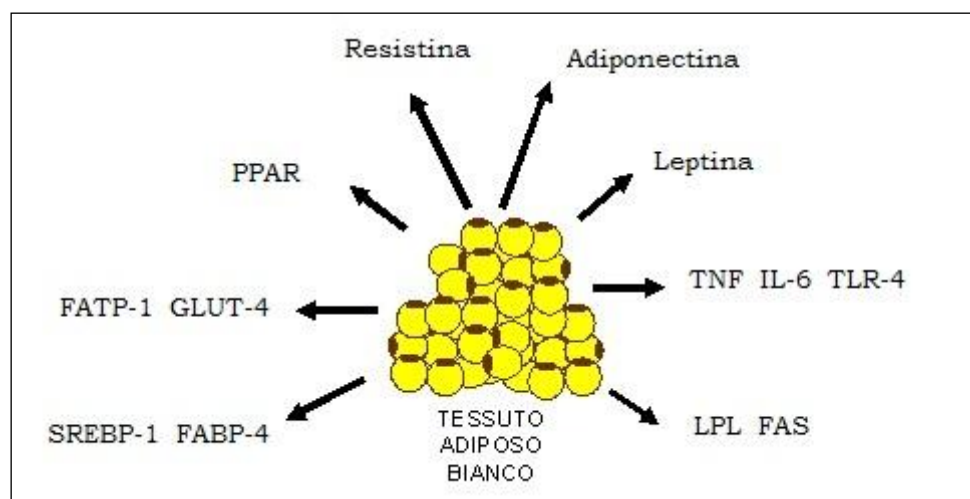
Le Proteine Leganti gli Acidi Grassi (FABPs) comprendono una famiglia di proteine tra le quali il FABP-4 altamente espresso nel tessuto adiposo per mezzo degli adipociti e dei macrofagi (Krusinová et al., 2008). FABP-4 è una proteina citoplasmatica rilasciata anche nel sangue (Xu et al., 2006). La sua funzione è quella di trasportare ed aumentare la solubilità degli acidi grassi liberi nei vari compartimenti cellulari, come nei mitocondri e perossisomi per l'ossidazione, nel reticolo endoplasmatico per la riesterificazione, nel tessuto adiposo per lo stoccaggio o nel nucleo per la regolazione genica (Chmurzynska et al., 2006).

Il Trasportatore degli Acidi Grassi 1 (FATP-1) è una proteina di transmembrana di 71 kDa del tessuto adiposo. L'insulina induce la traslocazione di questa proteina da intracellulare perinucleare alla membrana plasmatica dove unitamente al trasportatore di glucosio (GLUT-4) si localizza. Questa traslocazione coincide con un maggior assorbimento di acidi grassi suggerendo che FATP ha un ruolo importante nell'omeostasi energetica (Stahl et al., 2002).

I Recettori della Proliferazione Perossisomale (PPAR) sono recettori ormonali nucleari la cui attività trascrizionale è modulata da interazione ligando-recettore (Brun e Spiegelman 1997). Si distinguono 3 tipi di PPAR, α , γ , δ che si legano a elementi di risposta simili ai proliferatori perossisomiali, ma presentano diverse funzioni di trans attivazione dovute al tipo di tessuto, specificità del ligando e reclutamento dei coattivatori. Il PPAR- γ , oltre ad essere un componente importante nella cascata trascrizionale che porta all'adipogenesi, si pensa sia implicato nel controllo trascrizionale dei macrofagi (Barak et al. 1999). Il PPAR- α regola geni che influenzano il metabolismo delle lipoproteine e la captazione ed ossidazione degli acidi grassi così come la produzione di marcatori infiammatori (Ochoa et al., 2004).

Infine i Recettori di tipo Toll (TLR) sono recettori transmembrana utili per l'avvio di una serie di meccanismi di difesa dell'ospite in risposta a prodotti microbici (Foster et al., 2009). L'attivazione di TLR porta ad una cascata di segnalazione con produzione di citochine infiammatorie. La famiglia TLR è composta da 10 membri. Accanto al loro ruolo nel sistema immunitario, TLR è stato descritto per regolare il metabolismo energetico. Gli acidi grassi, in particolare gli acidi grassi saturi, possono attivare il Recettore di tipo Toll 4 (TLR-4) espresso nel tessuto adiposo, il quale fungerebbe da sensore del processo infiammatorio dovuto all'elevata concentrazione di acidi grassi (Kumar et al., 2009).

Figura 4: Principali adipochine espresse dal tessuto adiposo bianco.



Materiali e metodi

Per la seguente ricerca sono stati presi in esame 9 suini LW x (LW x L), 9 suini Nero di Parma e 5 suini ottenuti dall'incrocio tra questi due, Nero di Parma x [Lw x (Lw x L)] . Alla macellazione sono stati prelevati campioni di tessuto adiposo della regione dorsale (P2); in questa sede sono stati raccolti anche campioni di sangue per determinare i livelli ematici di leptina, in funzione del fatto che sicuramente i soggetti erano a digiuno. Il sangue è stato raccolto in provette contenenti EDTA e

quindi refrigerato e trasportato in laboratorio dove è stato centrifugato a 1800 x g per 10 min a temperatura ambiente ed il plasma conservato a -20 °C fino al momento delle analisi. I campioni di tessuto adiposo sono stati conservati a -80 °C fino al momento delle analisi. La determinazione della leptina ematica è stata effettuata mediante metodica immunoenzimatica (EIA) eterologa con un kit commerciale, specie specifico, Porcine leptin DSL 10-82200 (DSL Italia, Padova). L'RNA è stato estratto utilizzando il protocollo Tri Reagent (Molecular Research Center RNA kit) usato per l'isolamento di DNA, RNA e proteine da materiali biologici. La quantificazione dell'RNA è stata effettuata utilizzando uno spettrofotometro (GeneQuant pro®, Amersham Pharmacia Biotech-GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK). La retrotrascrizione (RT) è stata effettuata con High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystem) come descritto dal produttore. Aliquote (5 µl) dal cDNA generato sono state utilizzate per la successiva amplificazione tramite PCR in tampone di reazione contenente 1,5 µl di MgCl₂ (50 mM), 1 µl di dNTPs (12,5 mM) ed 1 µl di DNA polimerasi Taq (1 µg/µl), per un volume finale di 50 µl, per 27 cicli prima di raggiungere il plateau di amplificazione. Ciascun ciclo consisteva in una denaturazione a 94 °C per 1 minuto, annealing ad una temperatura specifica per ciascun set di primer per 1 minuto, estensione a 72 °C per 1 minuto, al termine del 27° ciclo, è stata eseguita un'altra estensione per 5 minuti. Le sequenze dei primers, le temperature di annealing ed i pesi dei prodotti di amplificazione (paia di basi, bp) sono elencate nella tabella n.3. I prodotti dell'amplificazione sono stati visualizzati dopo elettroforesi su gel di agarosio al 2% contenente il colorante SYBR® Safe DNA gel (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). La valutazione delle differenti bande è stata effettuata utilizzando un software di analisi di immagine (Image J). Valori sono presentati come rapporto tra l'intensità della banda degli specifici prodotti RT-PCR e quella della banda della corrispondente β-actina. I dati, presentati attraverso grafici, sono espressi in unità arbitraria relativa (% RAU). L'effetto del genotipo (3

livelli) sull'espressione dei geni considerati sono stati analizzati utilizzando la procedura GLM (SAS, 2008).

Tabella 3: Sequenze oligonucleotidiche dei primer progettati per la rilevazione delle differenti adipochine. S: senso; AS: antisenso.

	Coppie di primers	Temp. di annealing (°C)	Prodotto (bp)
IL-6	S: 5'-ATG AAC TCC CTC TCC ACA AGC-3'	56.0	493
	AS: 5'-TGG CTT TGT CTG GAT TCT TTC-3'		
TNF-α	S: 5'-CCA CCA ACG TTT TCC TCA CT-3'	57.3	351
	AS: 5'-AAT AAA GGG ATG GAC AGG GG-3'		
Leptina	S: 5'-CCC TGC TTG CAC TTG GTA GC-3'	60.4	658
	AS: 5'-CTG CCA CAC GAG TCT TTG-3'		
Adiponectina	S: 5'-GCT CAG GAT GCT GTT GTT GG-3'	60.4	768
	AS: 5'-TGG TGG AGG CTC TGA GTT GG-3'		
PPAR-γ	S: 5'-TGA CCC AGA AAG CGA TGC-3'	56	595
	AS: 5'-CCT GAT GGC GTC GTT ATG AGA CA-3'		
PPAR-α	S: 5'-CAG CCT CCA GCC CCT CGT C-3'	63.7	381
	AS: 5'-GCG GTC TCG GCA TCT TCT AGG-3'		
Resistina	S: 5'-TCA AGC CAG CCC CAG TCT C -3'	61	653
	AS: 5'-GTG GGT GGT GGG GCA GTT G -3'		
SREBP-1	S: 5'-GCG ACG GTG CCT CTG GT -3'	60	218
	AS: 5'-CGC AAG ACG GCG GAT TT -3'		
Glut-4	S: 5'-CCA ACA GAT AGG CTC CG -3'	60	520
	AS: 5'-TGG CCA GTT GGT TGA GC -3'		
FABP-4	S: 5'-CAG GAA AGT CAA GAG CA -3'	57	227
	AS: 5'-TCG GGA CAA TAC ATC CAA -3'		
FATP	S: 5'-GGT TCC AGC CTG TTG AAT -3'	57	275
	AS: 5'-AAC AAA ACC TTG GTG CTT -3'		
FAS	S: 5'-GAA CAC GGC CTA GAA GT -3'	59	199
	AS: 5'-ATC TGG ATC CTG CAG ATG -3'		
TRL-4	S: 5'-AAG GTT ATT GTC GTG GTG -3'	61	179
	AS: 5'-CTG CTG AGA AGG CGA TA -3'		
LPL	S: 5'-CGA AGT ATT GGC ATC CAG AAA C-3'	61	527
	AS: 5'-TTG ATC TCA TAG CCC AAG TTG TT-3'		

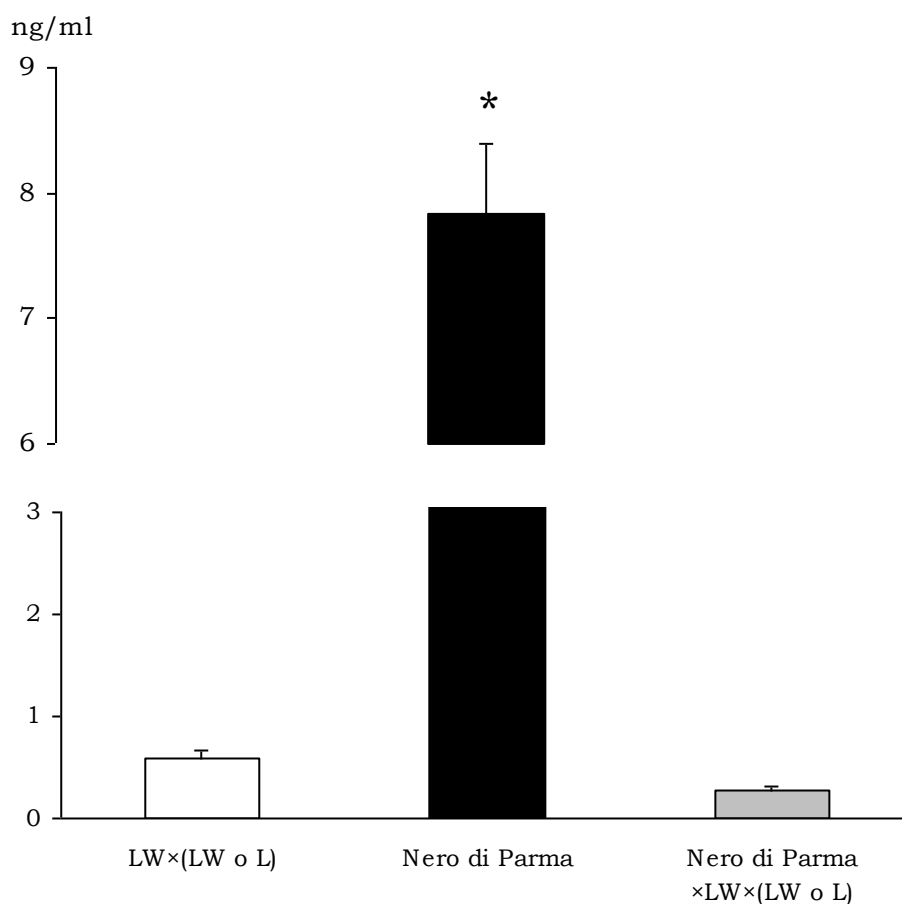
Risultati

I risultati relativi all'espressione delle adipochine sono riassunti in tabella 4.

Leptina

Il dosaggio della leptina ematica ha evidenziato livelli significativamente maggiori ($P < 0,001$) nel suino Nero di Parma: 7,84 ng/ml rispetto a 0,28 e 0,60 ng/ml dei suini industriali (grafico 1). Nel suino Nero di Parma e nell'ibrido industriale l'espressione della leptina è risultata significativamente maggiore rispetto al suino industriale.

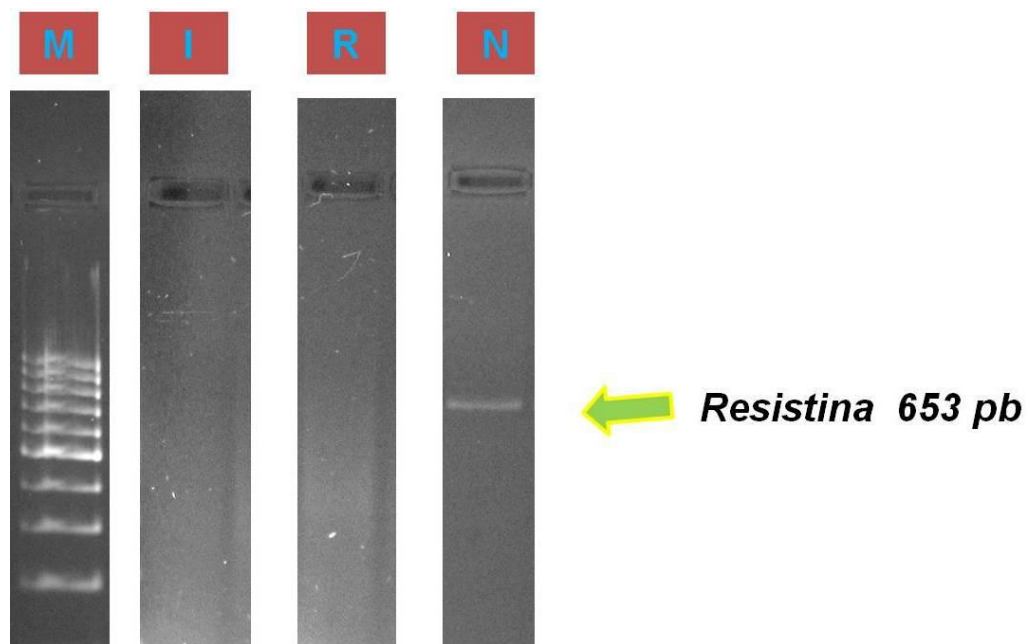
Grafico 1: Valori ematici della leptina.



Resistina

La resistina è risultata espressa nei campioni provenienti dal suino Nero di Parma, ma non in quelli provenienti dagli altri due tipi genetici ($P < 0.001$).

Figura 5: Corsa elettroforetica su gel di agarosio del cDNA del gene per la resistina. M:marker, I:ibrido industriale [Nero di Parma x LW x (LW x L)], R: suino industriale LW x (LW x L) , N:Nero di Parma.

Adiponectina

L'espressione dell'adiponectina è significativamente maggiore nel suino Nero di Parma rispetto agli altri due tipi ($P < 0,001$).

Mediatori dell'infiammazione

Per quanto riguarda i mediatori dell'infiammazione, l'espressione del TNF- α è significativamente più bassa ($P < 0,001$), mentre l'espressione dell'IL-6 è più alta ($P < 0,001$) nel suino Nero di Parma rispetto ai valori denunciati dagli altri soggetti.

Altre adipochine

Elevati livelli significativi di espressione di FAS, FABP-4, PPAR- γ e LPL sono stati osservati nel suino Nero di Parma rispetto ai suini industriali. Un risultato analogo è stato osservato per l'ibrido industriale per quanto riguarda FAS, PPAR- γ e LPL, mentre l'espressione di FABP-4 è significativamente simile al suino industriale. Bassi livelli significativi di espressione di TLR-4 sono stati riscontrati nel suino Nero di Parma rispetto ai due tipi di suino industriale. Risultati significativamente diversi tra i 3 fenotipi sono stati riscontrati per FATP e GLUT-4, mentre non c'è alcuna differenza significativa tra i tre fenotipi per quanto riguarda l'espressione di PPAR- α e SREBP-1.

Tabella 4: Valori dei geni analizzati sono presentati come rapporto tra l'intensità della banda delle specifiche RT-PCR e quella della banda della corrispondente β -actina. I dati sono espressi in unità arbitraria relativa (% RAU).

Gene	Nero di Parma	Ibrido	LW x (LW x L)	RMSE
Leptina	0.81B \pm 0.016	0.82B \pm 0.035	0.49A \pm 0.020	0.049
Adiponectina	0.69B \pm 0.019	0.53A \pm 0.042	0.56A \pm 0.024	0.059
TNF- α	0.36A \pm 0.022	0.58B \pm 0.047	0.53B \pm 0.027	0.066
IL-6	0.84B \pm 0.012	0.87B \pm 0.026	0.20A \pm 0.015	0.036
PPAR- α	0.48 \pm 0.022	0.41 \pm 0.046	0.44 \pm 0.027	0.066
PPAR- γ	0.75B \pm 0.021	0.66AB \pm 0.046	0.54A \pm 0.026	0.065
Resistina	0.21 \pm 0.010	non espresso	non espresso	0.029
LPL	0.79B \pm 0.011	0.78B \pm 0.023	0.69A \pm 0.013	0.032
SREBP1	0.58 \pm 0.016	0.51 \pm 0.035	0.51 \pm 0.020	0.049
FATP	0.74C \pm 0.016	0.44A \pm 0.033	0.55B \pm 0.019	0.047
GLUT-4	0.47C \pm 0.020	0.18B \pm 0.042	0.84A \pm 0.024	0.060
FABP4	0.95B \pm 0.011	0.79A \pm 0.024	0.78A \pm 0.013	0.033
TLR4	0.75a \pm 0.017	0.82b \pm 0.037	0.85b \pm 0.021	0.052
FAS	0.64b \pm 0.025	0.60b \pm 0.053	0.53a \pm 0.031	0.076

A, B, C P <0,001. a,b P <0,01

Discussione

Due sono i risultati che ci hanno maggiormente colpito: la presenza dell'espressione della resistina ed una significativa elevata concentrazione ematica di leptina solo nel suino "Nero di Parma" ed una significativa elevata espressione di leptina nel suino Nero di Parma e nell'ibrido industriale.

Per quanto riguarda il suino Nero di Parma, questi risultati correlano positivamente con la sua massa grassa indicando una possibile condizione di leptino-resistenza. Questa condizione è stata recentemente associata al genotipo *thrifty* ed è stata identificata con l'interruzione dei processi di trasduzione del segnale a livello dei recettori per la leptina, con effetti sul deposito di grasso (Gonzalez-Añover et al., 2011). Nel ratto, ma non nell'uomo, alti livelli di trascrizione del gene per la resistina si osservano in soggetti con elevata adiposità. In assenza di dati specifici riguardanti l'azione della resistina nella specie suina, possiamo ritenere che la presenza dell'espressione della resistina solo in uno dei tre fenotipi valutati, possa essere legata alla capacità di accumulare grasso a livello sottocutaneo e tra le fibre muscolari tipica del suino Nero di Parma, capacità presente anche in altre razze autoctone di suini del bacino del Mediterraneo, sempre identificate come portatrici del genotipo *thrifty* (Gonzalez-Añover et al., 2011). Nei casi in cui l'adiposità è elevata, maggiori livelli di espressione di adiponectina potrebbe sottendere ad un meccanismo anti-infiammatorio e di controllo della deposizione di grasso. Ciò è confermato dal valore del TNF- α che, non correlando con la leptina, implica che l'aumento di grasso non conduce il soggetto ad uno stato infiammatorio cronico, cioè ad una condizione patologica, ma è dovuto al suo genotipo *thrifty*, confermato anche dal minor livello del sensore dell'infiammazione TLR-4. I livelli di espressione dell'IL-6 non correlano con il TNF- α , ma con la leptina. Si potrebbe supporre che l'IL-6, avendo un meccanismo d'azione diverso dal TNF- α , assuma un ruolo antinfiammatorio (Xu et al., 2003) e che sia quindi in grado di diminuire

la segnalazione dell'insulina ed attenuare la trasduzione del segnale a livello dei recettori della leptina inducendo leptino-resistenza con meccanismi ad oggi sconosciuti. Le rimanenti adipochine sono fattori che correlano positivamente con la massa grassa e, come dimostrato in letteratura, valori elevati dell'espressione di LPL, PPAR- γ , FABP-4 e FAS correlano positivamente con la leptina, andando ad evidenziare la maggiore attività cellulare nella distribuzione e deposito di grasso da parte del suino Nero di Parma con effetti sulla assunzione di cibo, sul peso corporeo e sull'elevato potenziale per la deposizione di grasso rispetto alle razze industriali.

Il suino ibrido industriale sembra riflettere alcune caratteristiche provenienti dal suino Nero di Parma e altre dal suino industriale. Ad esempio, l'espressione di alcuni fattori che correlano con la massa grassa, cioè leptina e FAS, sono significativamente simili al Nero di Parma, così come i principali fattori di controllo del deposito di grasso come l'IL-6, PPAR- γ e LPL. Questi risultati non correlano con i livelli ematici di leptina, pertanto non è presente una condizione di leptino-resistenza. Al contrario, l'espressione dell'adiponectina, TNF- α e TLR-4, fattori legati all'infiammazione ed anche all'inibizione della produzione di grasso, sono simili al suino LW x (LW x L). Questa diversità di risultati conferisce al suino ibrido un interesse particolare in quanto i prodotti alimentari, pur avendo una marezzatura meno forte, riescono a mantenere le stesse qualità e caratteristiche organolettiche dei prodotti derivati dal suino Nero di Parma.

CAPITOLO II

*Effetti della supplementazione con
nucleotidi sulle performance produttive
e sulle risposte ormonali
e immunitarie nei suinetti.*

Introduzione

I fattori di stress sociali e nutrizionali associati al processo di svezzamento influenzano la fisiologia digestiva, lo stato neuroendocrino ed immunitario e incrementano la spesa energetica nei suinetti.

Tra essi, risulta particolarmente critico il passaggio dall'alimentazione liquida, latte materno, ad una solida rappresentata dal mangime che induce un periodo transitorio di digiuno provocando alterazioni a carico della struttura morfologica e funzionalità dell'intestino (Pluske et al., 1997b).

L'assenza di nutrienti ed il loro assorbimento sono infatti processi essenziali per la crescita e la funzionalità dell'epitelio intestinale (Brooks e Tsourgiannis, 2003) il quale fornisce un'interfaccia ampia e complessa tra il sistema immunitario del suinetto e l'ambiente in cui esso vive.

Con la messa al bando dal 2006 degli antibiotici come promotori di crescita (Reg. UE n.1831/2003), per consentire ai suinetti di far fronte a questo delicato periodo sono stati studiati diversi approcci nutrizionali con l'obiettivo ultimo di consentire un appropriato sviluppo del tessuto intestinale. In generale, essi includono l'utilizzo di sostanze in grado di aumentare l'appetibilità del mangime o con proprietà antimicrobiche e/o immunostimolanti.

Recentemente, sono state proposte, per suinetti in svezzamento, diete supplementate con nucleotidi (Di Giancamillo et al., 2003; Martinez-Puig et al., 2007; Godlewski et al., 2009).

I nucleotidi sono composti intracellulari a basso peso molecolare, costituiti da una base azotata legata ad un pentoso (ribosio o desossiribosio) che può avere da uno a tre gruppi fosforici. La base azotata può essere costituita dal gruppo delle pirimidine (citosina, uridina, timida) o delle purine (adenina, guanina, ipoxantina).

Sono elementi essenziali per il metabolismo cellulare in quanto intervengono:

- a) nella costituzione degli acidi nucleici e quindi importanti per il trasferimento e l'espressione dell'informazione genetica;
- b) nella biosintesi di diversi composti come ad es. il glicogeno;
- c) nel trasferimento dell' ATP poichè fungono da carriers per le reazioni enzimatiche che prevedono il passaggio di energia chimica;
- d) nella composizione di coenzimi come il NAD, il FAD ed il CoA;
- e) come regolatori biologici

con effetti sulla crescita e sullo sviluppo soprattutto delle cellule a rapido turnover, come sono quelle del sistema immunitario e del tratto gastrointestinale (Wang et al., 2008). In condizioni ottimali di salute, i nucleotidi, continuamente degradati e risintetizzati da parte delle cellule, non sono probabilmente elementi essenziali nella dieta, tuttavia, durante periodi di stress o di limitata assunzione di alimenti, li possono diventare (Dancey et al., 2006).

Essi sono naturalmente presenti negli alimenti e nei mangimi di origine animale e vegetale (mg/100 g) (Mateo e Stein, 2004):

Alimento	5'AMP	5'CMP	5'GMP	5'IMP	5'UMP
Orzo	0.1	0.2	0.1	0.1	0
Caseina	0	0.1	0	0	0
Mais	0.2	0.3	0.3	0.1	0
Farina di Pesce	1.1	2.6	0.2	3.5	0.1
Farina di plasma	0.2	0.2	0.2	0.1	0
Concentrato proteico di soia	0.1	0	0.2	0.1	0
Farina di soia 44% PG	0.8	1.6	0.3	0.2	0.9
Siero di latte	1.9	2.7	0	0.4	0.1

In considerazione di ciò si è voluto valutare l'effetto della supplementazione con nucleotidi di diete somministrate durante la fase

di allattamento come creep feed e di post-svezzamento, sulle performance produttive dei suinetti e sui sistemi neuroendocrino e immunitario, entrambi coinvolti nella risposta allo stress (Sapolsky et al., 2000).

Materiali e metodi

Animali, allevamento e diete

L'indagine ha riguardato 10 nidiate [HBI Fomeva11 × (Large White × Landrace)] (n = 108 suinetti) che sono state allevate, dalla nascita a 21 giorni di età, nella stessa sala parto (temperatura ambiente: 26 °C, temperatura della zona di suinetti: 30 °C) e da 22 a 55 giorni di età in box (1 nidiate/box) nelle stesse condizioni ambientali (temperatura: 27 °C nella prima settimana dopo lo svezzamento, per poi ridurla di 1 °C a settimana). Nel corso delle due fasi di allevamento le nidiate hanno avuto libero accesso all'acqua di abbeverata. Le diete, creep feed a partire dal 9° giorno di vita fino al termine dell'allattamento e mangime standard del commercio nella fase successiva (tabella 1) sono state integrate con lo 0% (T0, n = 53 suinetti) o lo 0,1% (T1, n = 55 suinetti) di nucleotidi estratti da lievito (Nucleoforce Piglets™ Bioiberica, Palafolls, Spain). Nelle razioni non è stata prevista la presenza di antimicrobici. L'assegnazione delle nidiate (5/trattamento) è stata casuale.

Tabella 1: Componenti ed analisi chimica dei mangimi.

Ingredienti (%)	Diete			
	Creep feed		Post svezzamento	
	T0	T1	T0	T1
Orzo	26.50	26.40	29.50	29.40
Mais	20.00	20.00	21.00	21.00
Farina di pesce	6.25	6.25	5.00	5.00
Siero di latte	6.25	6.25	3.75	3.75
Polpa di bietola essiccata	--	--	3.00	3.00
Farina di estrazione di soia	--	--	4.00	4.00
Semi di soia integrale	11.25	11.25	9.00	9.00
Destrosio	2.50	2.50	1.25	1.25
Fiocchi di orzo	3.75	3.75	3.20	3.20
Acido citrico	1.00	1.00	0.50	0.50
Sottoprodotti di panetteria	15.00	15.00	12.00	12.00
Integratore vitam. e oligomin. ¹	7.50	7.50	7.50	7.50
Acido formico	--	--	0.19	0.19
Acido lattico	--	--	0.11	0.11
Nucleotidi da lievito	--	0.1	--	0.1
Analisi chimica				
ED (Mcal/kg)	3.57	3.57	3.44	3.44
Proteina grezza (%)	17.51	17.55	17.68	17.72
Ceneri grezze (%)	4.71	4.71	5.10	5.10
Grassi grezzi (%)	9.44	9.44	7.63	7.63
Fibra grezza (%)	2.57	2.56	3.36	3.36
Zn (ppm)	111	111	111	111
Cu (ppm)	15	15	15	15

¹ per Kg: Vit. A 160.000 UI, Vit. D3 26.660 UI, Vit. E 1.330 mg, Vit. K 27 mg, Vit. B1 20 mg, Vit. B2 80 mg, acido pantotenico 200 mg, Vit. B6 27 mg, Vit B12 0.4 mg, Vit. PP 400 mg, biotina 1.33 mg, acido folico 13.3 mg, Vit. C 533 mg, betaina 2.000 mg, I 20 mg, Co 7 mg, Se 5.6 mg, Cu 2.000 mg, Mn 666.6 mg, Zn 1.400 mg, Fe 2.133 mg, 6-fitasi EC 3.1.3.26 8.000 FTU.

Il prodotto del commercio a base di nucleotidi estratti da lievito utilizzato è stato formulato in modo tale da fornire una quantità di nucleotidi al giorno pari a quella apportata dal latte di scrofa al 21° giorno di lattazione (135 μ mol/100 ml) (Mateo et al., 2004), considerando un consumo di latte pari a 1 kg/giorno (Pluske et al., 1997a) e una assunzione di cibo in post-svezzamento di 250 g/giorno.

A 4 e 21 giorni di età tutti i soggetti sono stati vaccinati contro il *Mycoplasma hyopneumoniae* (Suvaxyn™M Hyo, Pfizer Animal Health, Madison, NJ, USA).

Rilievi

I suinetti sono stati identificati mediante marchi auricolari e sono stati pesati individualmente a 9 giorni di età, allo svezzamento (21 giorni di età), a 35 giorni, e alla fine del periodo di post-svezzamento (55 giorni di età). L'assunzione media giornaliera di mangime, per nidiata, è stata valutata nei periodi 9°-21° e 22°-55° giorni di età. La consistenza fecale è stata registrata quotidianamente a livello di nidiata e valutata soggettivamente utilizzando una scala di quattro punti dove 1 = feci solide e 4 = feci liquide (Welloch et al., 2007). Al 9° giorno, allo svezzamento e dopo la seconda vaccinazione contro *Mycoplasma hyopneumoniae* (giorni 28 e 35), sono stati raccolti campioni di sangue (0800 h) dalla vena giugulare esterna in provette vacutainer contenenti litio-eparina. Il sangue è stato refrigerato e quindi in parte utilizzato subito per le analisi. Il plasma è stato ottenuto mediante centrifugazione a 1800 x g per 10 min a temperatura ambiente e poi conservato a -20 °C fino al momento dell'analisi.

Analisi del rame e dello zinco

Il tenore ematico di rame e zinco è stato valutato mediante spettrometro ad emissione atomica con plasma ad accoppiamento induttivo (ICP-AES; Jobin Yvon Ultima 2). La radio frequenza del generatore di potenza è stato fissato a 1000W ed il flusso di gas a 12 l/min.

Analisi ormonale

Il contenuto di cortisolo è stato valutato mediante un saggio radioimmunologico Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) convalidato (Tamanini et al., 1983). I coefficienti intra e inter-variazione sono stati

rispettivamente 7,4% e 9,5%. Il limite di rilevamento minimo è stato di 500 pg/ml.

I tenori di GH sono stati analizzati mediante ELISA (Baratta et al., 2002). ED90, ED50 e ED10 sono stati rispettivamente 0,039, 0,166 e 5 ng/pozzetto. I coefficienti intra e inter-variazione sono stati rispettivamente 5,3% e 7,8%. Il limite di rilevamento minimo è stato di 100 pg/ml. Il GH suino (PGH, AFP10864B) e anti-PGH antisiero (AFP5672099) sono stati forniti dal Dr. AF Parlow (National Hormone and Pituitary Program, Harbor-University of California-Los Angeles Medical Center, La Jolla, CA, USA).

Il contenuto di IGF-1 è stato valutato utilizzando un saggio ELISA IGF-1 multispecie (Alpco Diagnostic, Salem NH, USA), secondo le istruzioni del produttore, applicato in precedenza da Rogan et al. (2010). I coefficienti intra e inter-variazione sono stati rispettivamente 7,8% e 5,3%. Il limite di rilevamento minimo è stato di 30 pg/ ml.

Linfociti del sangue periferico

La caratterizzazione fenotipica delle sottopopolazioni di linfociti T nel sangue intero è stata eseguita mediante citometria a flusso (Borghetti et al., 2006). In breve, 50 ml di sangue eparinizzato sono stati miscelati con 5 ml di anticorpo specifico per ciascun antigene di superficie. Un approccio diretto per la colorazione dei CD4 α CD8 α è stato effettuato mediante incubazione con un PE e FITC anticorpo primario coniugato (anti-pig CD4-PE e anti-pig CD8-FITC) (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) per 15 min al buio, a temperatura ambiente. Dopo incubazione, le cellule sono state lavate con PBS + 1% FBS e centrifugate per 5 minuti a 400 x g a temperatura ambiente. I globuli rossi presenti sono stati lisati mediante trattamento con una soluzione di NH₄Cl, pH 7,2, per 15 minuti a temperatura ambiente al buio. La sospensione cellulare è stata quindi lavata due volte con PBS + 1% FBS, centrifugata per 5 minuti a 400 x g a temperatura ambiente, sospesa in

0,5 ml di PBS + 1% FBS ed infine analizzata mediante citometria a flusso (Epics XL-MCL, Beckman-Coulter , Brea, CA, USA).

Espressione genica delle citochine

L'espressione genica dell'interleuchina-6 (IL-6), interleuchina-10 (IL-10), interferone- γ (IFN- γ), interleuchina-1 β (IL-1 β), e del fattore di necrosi tumorale α (TNF- α) è stata valutata su cellule mononucleate ottenute da sangue periferico (PBMC) come segue. Le cellule mononucleate del sangue periferico sono state separate mediante sedimentazione in gradiente di densità utilizzando Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e lavate due volte con PBS sterile. L'acido ribonucleico è stato estratto mediante una soluzione di TRI Reagent (Applied Biosystems, Monza, Italia). Brevemente, 1 ml di TRI Reagent è stato aggiunto a 1×10^7 PBMC e l'RNA è stato estratto secondo le istruzioni del produttore. La quantificazione di RNA è stata effettuata con l'utilizzo dello spettrofotometro (GeneQuant pro, Amersham Pharmacia, UK). La retrotrascrizione (RT) dell'acido ribonucleico è stata effettuata utilizzando un Ready-to-go You-Prime First-Strand Beads kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Svezia), come descritto dal produttore. 2 μ g di RNA totale sono stati utilizzati nella RT. Aliquote (5 μ l) del cDNA ottenute sono state utilizzate per la successiva amplificazione PCR in un tampone di reazione contenente 1,5 μ l di $MgCl_2$ (50 mM), 1 μ l dNTPs (12,5 mM), e 1 μ l di Taq DNA polimerasi (1 μ g / μ l), per un volume finale di 50 μ l. L'amplificazione è stata eseguita per 27 cicli, prima di raggiungere il plateau. Ciascun ciclo è consistito in denaturazione a 94 °C per 1 min, annealing ad una temperatura specifica per ciascun set di primer per 1 min, estensione a 72 °C per 1 min e al termine del 27° ciclo in un'ultima fase di estensione per 5 min. In tabella 2 sono elencati gli specifici set di primer utilizzati.

Tabella 2: Sequenze oligonucleotidiche specifiche per la rivelazione di differenti citochine suine. S: senso; AS: antisenso.

	Coppie di primers	Temp. di annealing (°C)	Prodotto (bp)
IL-6	S: 5'-ATG AAC TCC CTC TCC ACA AGC-3'	56.0	493
	AS: 5'-TGG CTT TGT CTG GAT TCT TTC-3'		
INF-γ	S: 5'-CTC TCC GAA ACA ATG AGT TAT ACA-3'	55.0	503
	AS: 5'-GCT CTC TGG CCT TGG AA-3'		
TNF-α	S: 5'-CCA CCA ACG TTT TCC TCA CT-3'	57.3	351
	AS: 5'-AAT AAA GGG ATG GAC AGG GG-3'		
IL-1β	S: 5'-ACA GGG GAC TTG AAG AGA G-3'	54.5	285
	AS: 5'-CTG CTT GAG AGG TG CTG ATG T-3'		
IL-10	S: 5'-TCT GAG TGG AAC TCA AGG AA-3'	55.0	394
	AS: 5'-CAG GTC TGT CAC TGA TCT TG-3'		

Come controllo positivo interno è stato utilizzato il QuantumRNA 18S (n 1717, Ambion, Inc., Applied Biosystems, Monza, Italia) per ogni RT-PCR quantitativa. Per amplificare il frammento 18S (323 bp) senza raggiungere la fase di plateau, coppie di primer 18S alternate (5 mM) sono state co-incubate con 18S competimers (5 mM; rapporto 2:8) secondo le istruzioni del produttore. I prodotti della reazione a catena della polimerasi sono stati visualizzati dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% mediante SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen SRL, San Giuliano Milanese, Italia). I valori sono mostrati come rapporto tra l'intensità della banda di ogni citochina e il corrispondente ribosomiale 18S, espressi come unità arbitraria relativa (RAU).

Analisi statistica

I dati sono stati sottoposti ad analisi ANOVA utilizzando la procedura GLM (SAS, 2008) con l'animale come unità sperimentale per i dati di crescita ed ematologici e la nidiata come unità sperimentale per il

consumo volontario di alimento e per l'efficienza alimentare. I dati relativi alle performance di crescita sono stati analizzati utilizzando un modello fattoriale con il gruppo, il sesso e l'interazione gruppo \times sesso come fattori fissi e la nidiata della scrofa all'interno del gruppo come fattore casuale. I dati del consumo di mangime e dell'efficienza alimentare sono stati analizzati utilizzando un modello con il gruppo come un fattore fisso. Per i dati ematologici, il gruppo, il sesso, il giorno di campionamento e le interazioni tra gruppo \times sesso e gruppo \times giorno di campionamento sono stati utilizzati come fattori fissi e la nidiata della scrofa all'interno del gruppo è stata considerata come un fattore casuale. Le performance dei suinetti e i dati ematologici, del rame e dello zinco relativi al giorno 9 sono stati utilizzati come covariata. I risultati sono stati espressi come medie stimate \pm errore standard della media. I livelli plasmatici di cortisolo, IGF-1 GH sono stati sottoposti ad analisi della correlazione. Le differenze statisticamente significative sono state assunte per $P \leq 0.05$, mentre $0.10 > P > 0,05$ è stato considerato una tendenza.

Risultati

Performance di crescita

In entrambi i gruppi la consistenza fecale per tutta la durata dell'indagine è stata inferiore a 3. Gli effetti della supplementazione con nucleotidi sulle performance di crescita dei suinetti sono riportati in Tabella 3. Nonostante il consumo alimentare tra i due gruppi sia risultato sovrapponibile ($P > 0.05$), il peso vivo dei suinetti al 21° ($P < 0,10$), 35° e 55° giorno di età ($P < 0,05$) è risultato maggiore in T1 rispetto al T0. L'incremento ponderale giornaliero (IPG) (dal 9° al 55° giorno) è risultato più elevato ($P < 0,05$) e l'efficienza alimentare migliore ($P = 0.10$) in T1 rispetto al T0.

Tabella 3: Medie stimate (\pm s.e.) delle performance di crescita dei suinetti.

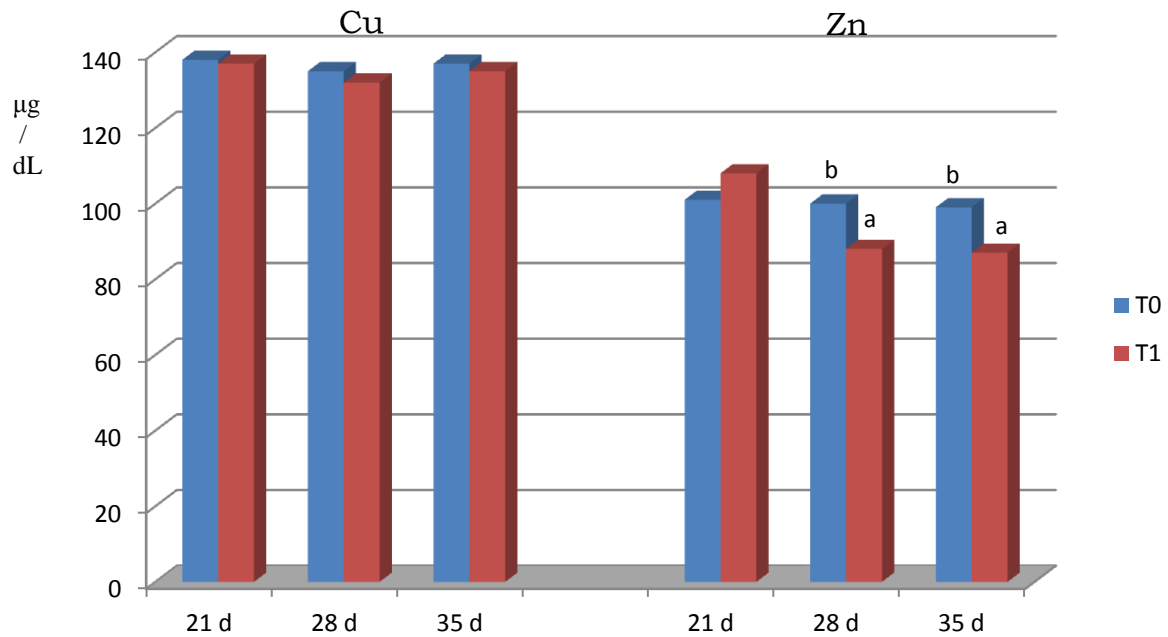
Variabile	Trattamento		Significatività
	T0	T1	
PV (kg)			
9 d	3.18 \pm 0.03	3.21 \pm 0.03	ns
21 d	5.16 \pm 0.08	5.35 \pm 0.08	§
35 d	8.71 \pm 0.15	9.07 \pm 0.16	***
55 d	14.38 \pm 0.26	15.54 \pm 0.25	***
IPG (g)			
9-21 d	160 \pm 7	167 \pm 6	ns
22-35 d	253 \pm 13	267 \pm 19	*
36-55 d	283 \pm 15	322 \pm 20	***
9-55 d	244 \pm 6	275 \pm 6	***
Consumo di alimento (g/d)			
9-21 d	11 \pm 2	14 \pm 2	ns
22-55 d	549 \pm 32	498 \pm 32	ns
9-55 d	400 \pm 23	364 \pm 23	ns
Efficienza alimentare ¹			
9-55 d	0.61 \pm 0.05	0.72 \pm 0.05	§

Significatività: *: $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, ns = non significativo ($P > 0.05$).

§ $0.10 > P > 0.05$

¹ Efficienza alimentare = g di IPG/g di alimento consumato.

L'analisi di marcatori biologici, considerati indicatori di una scarsa crescita come il rame e lo zinco (Graham et al., 2010) ha messo in evidenza che la supplementazione nucleotidica non ha influenzato il tenore ematico di rame mentre quello dello zinco è risultato più basso nel gruppo T1 a 28 e 35 giorni ($P < 0,05$) (Grafico 1). Il rapporto Cu/Zn è risultato maggiore nel gruppo T1 rispetto al gruppo T0 a 28 giorni (1,7 vs 1,3) ($P < 0,05$).

Grafico 1: Contenuto plasmatico di rame e zinco.

a,b P<0.05

Ormoni

La significatività dei livelli ematici del cortisolo, del GH e dell'IGF-1 è stata riportata in Tabella 4. Il contenuto di cortisolo al giorno 28 e 35 è risultato inferiore in T1 rispetto a T0 e così anche quello del GH al 35° giorno ($P < 0,05$). I livelli di IGF-1 sono risultati simili tra i due gruppi ($P > 0,05$). Una correlazione positiva è stata trovata tra il cortisolo e il GH ($r = 0,326$, $P = 0,002$).

Tabella 4: Medie stimate (\pm s.e.) dei livelli plasmatici di cortisolo, GH e IGF-1.

Variabile	Trattamento		Significatività
	T0	T1	
Cortisolo (ng/ml)			
21 d	13.82 \pm 2.46	12.15 \pm 2.64	ns
28 d	19.35 \pm 2.54	12.55 \pm 2.69	*
35 d	17.52 \pm 2.48	13.67 \pm 2.62	*
GH (ng/ml)			
21 d	19.37 \pm 1.13	18.95 \pm 1.28	ns
28 d	21.02 \pm 1.14	18.61 \pm 1.39	ns
35 d	19.37 \pm 1.13	15.61 \pm 1.38	*
IGF-1 (ng/ml)			
21 d	10.54 \pm 1.29	12.69 \pm 1.28	ns
28 d	10.27 \pm 1.30	9.66 \pm 1.25	ns
35 d	9.95 \pm 1.30	9.90 \pm 1.26	ns

*: $P < 0.05$, ns = non significativo ($P > 0.05$).

Risposta immunitaria

La dieta supplementata con i nucleotidi ha incrementato i CD4-CD8^{high} al 21° e 35° giorno ($P < 0,05$), ma non ha influenzato la sottopopolazione di linfociti CD4-CD8⁺ ($P > 0,05$) (Tabella 5). Al giorno 21 di età le cellule CD4⁺CD8⁻ sono risultate superiori in T1 rispetto a T0 ($P < 0,05$). Nessuna differenza è stata osservata tra i gruppi di linfociti helper doppiamente positivi (CD4⁺CD8⁺) ($P > 0,05$). L'espressione delle citochine nelle cellule mononucleate del sangue periferico è stata influenzata dalla supplementazione nucleotidica come riassunto in tabella 6. Allo svezzamento, l'espressione dell'IL-6 e dell'IL-1 β è inferiore in T1 rispetto a T0 ($P < 0,05$), mentre non è stato osservato nessun effetto sull'espressione del TNF- α ($P > 0,05$). Al tempo stesso l'espressione dell'IFN- γ e dell'IL-10 è risultata superiore in T1 rispetto a T0 ($P < 0,05$). Al 28° giorno di età sono stati osservati valori più elevati per l'espressione del TNF- α e più bassi per l'IL-10 in T1 rispetto a T0 ($P < 0,05$). La supplementazione con nucleotidi ha avuto un effetto soppressivo sull'IL-6 e sull'IL-10 al 35° giorno di età ($P < 0,05$). Al contrario, l'espressione di IFN- γ , TNF- α e IL-1 β è stata potenziata ($P < 0,05$).

Tabella 5: Medie stimate (\pm s.e.) dei parametri immunologici

Variabile	Trattamento		Significatività
	T0	T1	
CD4-CD8 ^{high} cell(n. cells/ μ l)			
21 d	552 \pm 97	1.108 \pm 162	*
28 d	514 \pm 92	693 \pm 151	ns
35 d	602 \pm 107	1.194 \pm 158	*
CD4+CD8+ cells (n. cells/ μ l)			
21 d	140 \pm 22	198 \pm 25	ns
28 d	227 \pm 24	218 \pm 24	ns
35 d	301 \pm 27	328 \pm 28	ns
CD4-CD8+ cells (n. cells/ μ l)			
21 d	1.034 \pm 189	1.812 \pm 239	ns
28 d	1.664 \pm 199	1.684 \pm 215	ns
35 d	1.793 \pm 215	2.312 \pm 269	ns
CD4+CD8- cells (n. cells/ μ l)			
21 d	1.256 \pm 132	1.794 \pm 152	*
28 d	1.072 \pm 112	1.070 \pm 121	ns
35 d	1.081 \pm 114	1.283 \pm 132	ns

*: $P < 0.05$, ns = non significativo ($P > 0.05$).

Tabella 6: Medie stimate (\pm s.e.) dell'espressione delle citochine sui PBMC

Variabile	Trattamento		Significatività
	T0	T1	
IL-6 (RAU) ¹			
21 d	0.73 \pm 0.04	0.53 \pm 0.05	*
28 d	0.31 \pm 0.03	0.37 \pm 0.05	ns
35 d	0.48 \pm 0.04	0.34 \pm 0.04	*
IFN- γ (RAU) ¹			
21 d	0.20 \pm 0.03	0.47 \pm 0.03	*
28 d	0.54 \pm 0.04	0.59 \pm 0.04	ns
35 d	0.57 \pm 0.04	0.71 \pm 0.05	*
TNF- α (RAU) ¹			
21 d	0.27 \pm 0.02	0.29 \pm 0.02	ns
28 d	0.60 \pm 0.03	0.48 \pm 0.02	*
35 d	0.49 \pm 0.02	0.59 \pm 0.03	*
IL-1 β (RAU) ¹			
21 d	0.57 \pm 0.02	0.45 \pm 0.01	*
28 d	0.48 \pm 0.01	0.51 \pm 0.02	ns
35 d	0.47 \pm 0.01	0.54 \pm 0.01	*
IL-10 (RAU) ¹			
21 d	0.58 \pm 0.04	0.73 \pm 0.05	*
28 d	0.62 \pm 0.04	0.47 \pm 0.04	*
35 d	0.73 \pm 0.05	0.52 \pm 0.04	*

*: $P < 0.05$, ns = non significativo ($P > 0.05$).

¹ Unità Relativa Arbitraria

Discussione

Nessun effetto sulle performance di crescita dei suinetti, è stato osservato quando la supplementazione della dieta con nucleotidi è stata condotta dopo lo svezzamento (Di Giancamillo et al, 2003; Domeneghini et al., 2004; Andrés-Elias et al., 2007). Viceversa, come dimostrano i risultati ottenuti nella presente indagine, se la supplementazione con nucleotidi viene effettuata sia nel mangime da lattazione sia in quello da postsvezzamento (da 9 a 55 giorni di età), essa migliora le performance di crescita dei suinetti, senza influenzare l'assunzione media giornaliera di mangime. Il consumo medio di alimento durante la lattazione è stato ridotto in entrambi i gruppi, ma allo svezzamento il peso vivo dei T1 risulta più elevato di quello dei T0. Il consumo alimentare durante la lattazione è stato espresso come valore medio del periodo (9-21 giorni) e non come consumo giornaliero. In questo modo è possibile che l'assunzione di mangime sia stata effettivamente molto ridotta nei primi giorni per poi aumentare con il procedere della lattazione. La presenza di nucleotidi nella dieta può aver contribuito, durante la fase critica di transizione dello svezzamento, a risparmiare i costi energetici legati alla sintesi *de novo* di nucleotidi e/o ad una loro minore utilizzazione (Burrin e Stoll, 2002). I più bassi tenori ematici di zinco osservati nei T1 rispetto ai T0 può inoltre far pensare che nei primi vi sia stata una maggiore attività replicativa delle cellule intestinali che coinvolge enzimi DNA e RNA Zn-dipendenti.

Il consumo volontario di alimento nella fase di post-svezzamento ha un profondo effetto sul funzionamento dei diversi sistemi neuroendocrini (Carroll et al, 1998; Hay et al, 2001). Sebbene non ci siano state differenze tra i soggetti nel consumo di alimento, una diversa risposta ormonale è stata osservata tra i due gruppi durante le prime due settimane dopo lo svezzamento. In particolare, mentre nei soggetti considerati di controllo (T0), i livelli plasmatici di cortisolo sono risultati coerenti con dati precedentemente riportati (Carroll et al., 1998; Wu et

al., 2000; Borghetti et al., 2006), in quelli trattati (T1) sono risultati nettamente inferiori.

Il cortisolo influenza il regolare assorbimento degli aminoacidi da parte della mucosa intestinale e facilita la loro metabolizzazione intestinale durante il periodo di post-svezzamento (Wu et al., 2000). A tal proposito è stato osservato che il blocco dei suoi recettori impedisce l'utilizzo della glutammina da parte degli enterociti (Flynn e Wu, 1997). La glutammina, precursore di purine e pirimidine (Ardawi e Newsholme, 1983; Wu, 1998), stimola la proliferazione cellulare e la sintesi proteica (Burrin e Stoll, 2002).

È stato dimostrato che la glutammina riduce la sintesi del cortisolo nella corteccia surrenale a causa del rallentamento dell'attività di alcuni enzimi chiave (Wu et al., 2010). In base a ciò, si può ipotizzare che la dieta supplementata con nucleotidi durante la fase di pre-svezzamento possa avere esercitato un controllo diretto sulle risorse metaboliche dei suinetti, determinando, nei soggetti T1, un feedback negativo sui livelli di cortisolo dal momento che gli stessi nucleotidi, costituiti da basi pirimidiniche o puriniche, rappresentano i mattoni per la sintesi proteica.

Il peso vivo risultato più elevato nei T1 rispetto ai T0 non è stato associato ad un più elevato tenore ematico di GH. Il GH è il principale regolatore della crescita post-natale e i suoi effetti sono mediati principalmente dall'IGF-1 (Møller e Jørgensen, 2009). In condizioni di stress, come il digiuno, la secrezione di GH normalmente aumenta (Vendelbo et al., 2010). Nel presente studio è stata trovata una correlazione positiva tra i livelli plasmatici di cortisolo e di GH ma non tra GH e IGF-1 ed il livello medio di GH plasmatico è risultato inferiore nei T1 al 35° giorno di età. Queste osservazioni fanno propendere per l'esistenza di un disaccoppiamento tra i livelli plasmatici di GH e IGF-1 e che il GH possa essere stato principalmente coinvolto nel controbilanciare i livelli di cortisolo ed i suoi effetti negativi sul metabolismo e sull'efficienza immunitaria dei suinetti (Borghetti et al.,

2006a; 2006b; 2009) In questo modo il differente trend ematico del cortisolo e del GH tra i gruppi può testimoniare un minore effetto negativo dello stress sull'accrescimento nei soggetti T1.

I nostri dati inoltre confermano l'esistenza di una correlazione tra il sistema endocrino ed il sistema immunitario (Sapolsky et al., 2000). Il sistema immunitario dopo un insulto di qualsiasi natura è normalmente riportato ad un livello di risposta basale attraverso i processi omeostatici, in parte regolati dall'asse ipotalamo-ipofisi (Salak-Johnson e McGlone, 2007).

Le citochine linfocitarie, come IFN- γ e IL-10, sono preferenzialmente responsabili della risposta immunitaria T-helper di tipo 1 o 2, mentre le citochine infiammatorie, come l'IL-1 β , l'IL-6 e il TNF- α , sono rapidamente prodotte con l'inizio del processo infiammatorio. (Zelnickova et al., 2008). Allo svezzamento, i suinetti T1 rispetto a quelli T0, hanno mostrato un livello di espressione maggiore di IFN- γ e IL-10 e inferiore di IL-1 β e IL-6, mentre non sono state osservate variazioni nell'espressione del TNF- α .

Sulla base di ciò è possibile assumere che i suinetti, la cui dieta era supplementata con nucleotidi, abbiano risposto in maniera più efficace dopo la vaccinazione al *Mycoplasma hyopneumoniae*, mostrando anche un miglior adattamento alle condizioni ambientali. L'aumento del numero totale sia di CD8⁺ ma soprattutto di CD8^{high} osservato nei suinetti trattati, può essere correlato alla possibile attivazione mediante cellule Th1 dell'IFN- γ , una citochina con un ruolo fondamentale per l'attivazione di cellule T citotossiche (Hayday e Tigelaar, 2003).

Lo stress ormonale inducendo alterazioni nell'espressione delle citochine può influenzare la suscettibilità a patologie e quindi lo squilibrio tra Th1 e Th2 può rappresentare un meccanismo per raggiungere l'omeostasi (Elenkov e Chrousos, 2002. Wieggers et al, 2005).

L'effetto generale dei glucocorticoidi è quello di inibire la sintesi, il rilascio o l'efficacia delle citochine. Tuttavia, non tutte le citochine sono

soppresse dai glucocorticoidi. La secrezione dell'IL-10 è aumentata dai glucocorticoidi (Blotta et al., 1997; Richards et al., 2001), mentre altre citochine (ad esempio l'IL-6) agiscono in sinergia con i glucocorticoidi (Wiegers et al., 2005). I nostri risultati sono coerenti con questi dati a 35 giorni di età quando è stata osservata una maggiore espressione di IFN- γ , TNF- α e IL-1 β nel gruppo T1, associata ad una minore espressione di IL-6 e IL-10.

In conclusione, i nostri dati confermano che i nucleotidi possono essere considerati micronutrienti essenziali durante lo svezzamento dei suinetti. La supplementazione nucleotidica nella dieta durante il pre e post-svezzamento ha migliorato le performance di crescita dei suinetti, potenziando le capacità adattative degli animali per superare i possibili effetti negativi dei fattori di stress durante lo svezzamento. Inoltre, i nostri risultati hanno mostrato un effetto diretto dei nucleotidi sul sistema endocrino e di conseguenza sul sistema immunitario.

CAPITOLO III

*VARIAZIONI EMATICHE DELLA
LEPTINA DURANTE LA GESTAZIONE E
LA LATTAZIONE NELLA SCROFA.
INTERAZIONE CON L'ASSE
SOMATOLATTOTROPO MATERNO*

Introduzione

Durante la gestazione i normali meccanismi omeostatici deputati alla regolazione dell'assunzione di cibo vengono modificati con lo scopo di creare una condizione di bilancio energetico positivo indispensabile per far fronte alle necessità del feto. Normalmente, i livelli ematici di leptina aumentano durante la gestazione, a causa di un'iperproduzione placentare che diviene prevalente rispetto a quella adipocitaria (Forhead et al., 2009) e di un aumento dell'attività dei suoi recettori (Ladyman, 2008). In questo modo si viene a creare un conflitto tra l'azione della leptina adipocitaria e quella placentare, realizzando, nella specie umana e negli animali da laboratorio (Trujillo et al., 2011), uno stato di leptino-resistenza transitorio in grado di spiegare l'iperfagia gravidica che precede la comparsa dell'iperleptinemia, l'aumento della massa grassa e l'iperprolattinemia. Non altrettanto noto è invece il meccanismo d'azione della leptina durante la gravidanza in specie animali come quella suina dove l'iperfagia è tenuta sotto controllo e gestita attraverso determinate strategie alimentari. Nell'allevamento suino per massimizzare la longevità delle scrofe è necessario adeguare il livello alimentare al mantenimento di una condizione corporea ottimale durante le fasi del ciclo riproduttivo. Un eccesso energetico durante la gestazione comporta un'elevata adiposità al parto che ha effetti nefasti non solo sulla vitalità dei suinetti, ma anche sul comportamento alimentare delle scrofe durante la successiva lattazione e sulla ripresa dell'attività ciclica. Per tali motivi, alle scrofe in gestazione viene comunemente fornita una quota di alimento che è pari al 50-60% del loro consumo volontario e, per ridurre la persistente motivazione ad alimentarsi, si può ricorrere all'impiego di diete fibrose che, attraverso una diluizione dell'apporto energetico, consentono di fornire maggiori quantità di alimento senza aumentare l'assunzione giornaliera di energia (Guillemet et al., 2006). Quanto l'impossibilità da parte della scrofa di assecondare la propria soddisfazione alimentare possa andare ad influenzare le performance dei suinetti alla nascita, resta da verificare. È noto che la nutrizione

materna, soprattutto quella effettuata nelle prime fasi della gestazione, può esercitare effetti anche a lungo termine sullo stato di salute della progenie (Chumurzynska et al., 2010). Tale aspetto è quanto mai attuale nell'allevamento suino dove assistiamo ad un paradosso produttivo: da un lato una maggior prolificità delle scrofe e dall'altro un aumento della mortalità perinatale e della variabilità ponderale della nidiata (Edwards et al., 2002).

A tal motivo, si è voluto valutare l'andamento degli ormoni metabolici implicati nella regolazione dell'omeostasi energetica in rapporto alle variazioni ematiche della leptina durante un intero ciclo produttivo, vale a dire dalla fecondazione, per tutta la gestazione, fino alla lattazione.

Materiali e metodi

Animali

Lo studio ha interessato 15 scrofe (Large White × Landrace) pluripare (ordine di parto: $3,0 \pm 0,9$) con un BCS pari a 3, ingravidate entro 7 giorni ($5,3 \pm 1,1$) dallo svezzamento della nidiata precedente. Durante la gestazione gli animali hanno assunto un mangime del commercio (12,8 MJ/kg ED; 13,8 % PG; 0,68 % lisina; 5,0 % FG) alla dose di 2 kg/capo/giorno nella prima settimana di gestazione, di 2,5 kg/capo/d fino al 100° d e poi di 2,7 kg fino al parto. In lattazione (durata 25 g) le scrofe hanno ricevuto un mangime del commercio (13,2 MJ/kg ED; 16,0 % PG; 1 % lisina; 3,6% FG), somministrato *ad libitum*. Gli animali sono stati allevati nelle medesime condizioni ambientali e di allevamento. Su tutti i soggetti sono stati effettuati prelievi di sangue al termine della lattazione precedente, alla fecondazione, ogni 15 giorni fino al 45° giorno di gestazione ed ogni 7 giorni dal 46°giorno fino al parto e dopo 10 e 20 giorni dal parto. Il sangue (6ml), prelevato dalla vena auricolare sulle scrofe a digiuno, è stato raccolto in provette sterili, pretrattate con EDTA, centrifugato a 1800 rpm per 10 minuti e il plasma è stato conservato a -20°C fino alla determinazione dei livelli di

leptina, ormone della crescita (GH), prolattina (PRL), cortisolo e progesterone.

Alla nascita è stata prelevata per ogni suinetto una porzione di tessuto placentare sulla quale è stata valutata l'espressione della leptina e dei suoi recettori. Sino al momento dell'analisi il campione di placenta è stato conservato in azoto liquido.

Analisi ormonali sul plasma materno

Leptina

Le concentrazioni ematiche di leptina sono state dosate mediante metodica immunoenzimatica (EIA) eterologa con un kit commerciale, specie specifico, Porcine leptin DSL 10-82200 (DSL Italia, Padova). I coefficienti di variazione intra- ed inter saggio sono stati del 4% e del 9%, rispettivamente. La sensibilità del saggio è stata 50 pg/ml.

Ormone somatotropo (GH)

I campioni sono stati saggiati utilizzando una metodica immunoenzimatica (ELISA) precedentemente validata (Baratta et al., 2002), L'ED90, l'ED50 e l'ED10 sono state rispettivamente 0,039, 0,166 e 5 ng/pozzetto; la variazione tra saggi differenti e all'interno di uno stesso saggio è risultata dell'8,6 e del 6,1%, rispettivamente.

Prolattina (PRL)

La PRL è stata dosata mediante metodica ELISA precedentemente La sensibilità del saggio è stata di 0,06 ng/ml.validato (Borghetti et al., 2006) L'ED90, l'ED50 e l'ED10 sono state rispettivamente 0,011, 0,123 e 3 ng/pozzetto La variazione intra- ed intersaggio è risultata del 7, e del 4,5%, rispettivamente; la cross-reattività con altri ormoni ipofisari, calcolata in base all'ED50, è stata: 0,001% per pFSH, 0,007% per pLH, 0,005% per pTSH e 0,03% per pGH. Il limite di sensibilità dell'analisi è stato di 0,015ng/ml.

Progesterone

La determinazione del progesterone è stata effettuata mediante dosaggio EIA (Progesterone ELISA Kit, Cayman Chemical, Italy) . La sensibilità del dosaggio è stata di 16,5 pg/ml ed i coefficienti di variazione intra- ed intersaggio sono risultati pari al 6% e al 12%, rispettivamente.

Cortisolo

Il dosaggio è stato eseguito con metodica EIA (Cortisol ELISA Kit, Cayman Chemical, Italy). La sensibilità del dosaggio è stata di 6 pg/ml; i coefficienti di variazione intra- ed intersaggio sono risultati minori del 7%.

Espressione della leptina e dei suoi recettori sulla placenta

L'estrazione dell'RNA totale dal tessuto placentare è stata realizzata mediante il QuickPrep Total RNA Extraction Kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK), secondo le indicazioni della ditta produttrice. L'RNA totale ottenuto è stato quantificato attraverso uno spettrofotometro (GENEQUANTpro, AmershamPharmacia, UK). Il contenuto medio è risultato di 15 µg, suddiviso in aliquote di 2µg/10µl che sono state subito congelate a -80°C, per ridurre al minimo la degradazione dell'RNA stesso.

La trascrizione inversa è stata condotta mediante il kit Ready-To-Go (Amersham Pharmacia Biotech, UK), secondo le istruzioni della casa produttrice: 1 µg di RNA totale è stato usato in ogni reazione di trascrizione. Un'aliquota di 2 µl del DNA complementare ottenuto è stata usata per l'amplificazione: i primers specifici, le relative temperature di annealing e le dimensioni dell'amplicone sono schematizzati nella tabella 1. L'amplificazione è stata condotta per 27 cicli; ogni ciclo risulta così composto: denaturazione a 94° C per 90", annealing a temperatura specifica per 70" ed estensione a 72°C per 90". Gli amplificati sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 2%. (1g d'agarosio in 50 ml di tampone Sybr ® Safe). La

quantificazione delle bande degli amplificati è stata ottenuta mediante il programma Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Tale analisi permette di ottenere informazioni semiquantitative di espressione genica attraverso la normalizzazione dell'intensità delle bande dei prodotti d'interesse rispetto al livello d'espressione relativo controllo interno (β -Actina) per ciascun campione.

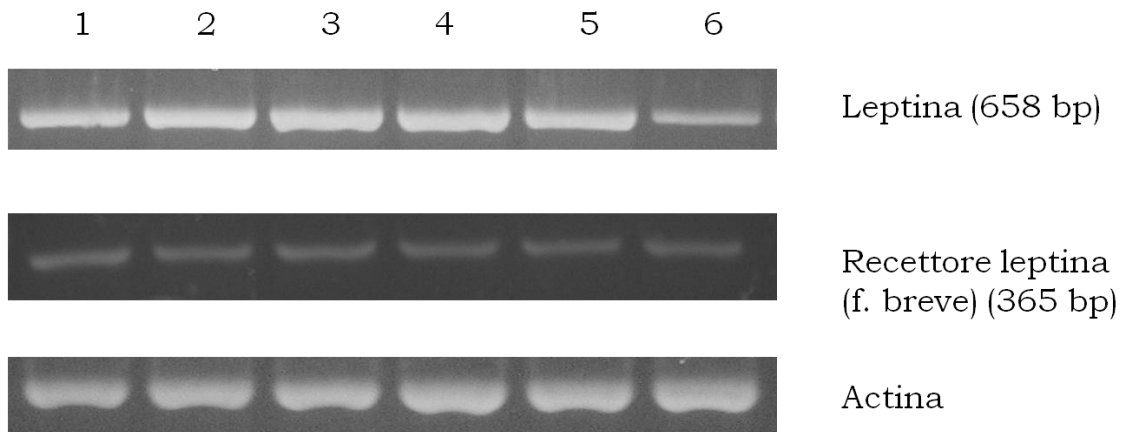
Analisi Statistica

Tutti i risultati relativi ai valori basali degli ormoni considerati sono presentati come media \pm deviazione standard (DS). La valutazione del profilo ematico di ogni soggetto stata effettuata avvalendosi dell'uso del programma PULSAR [Merriam e Wachter, 1982]. Si è considerato un coefficiente di variazione dei 5% per tutti i punti della curva standard della leptina. I criteri di esclusione per l'identificazione dei pulses sono stati 3,98, 2,4, 1,7, 1,2 e 0,9 deviazioni standard intra-saggio per pulse di durata di 1, 2,3,4 e 5 punti, rispettivamente. Le differenze fra i diversi valori sono state analizzate mediante Student's t test: una probabilità inferiore a 0,05 è stata considerata significativa.

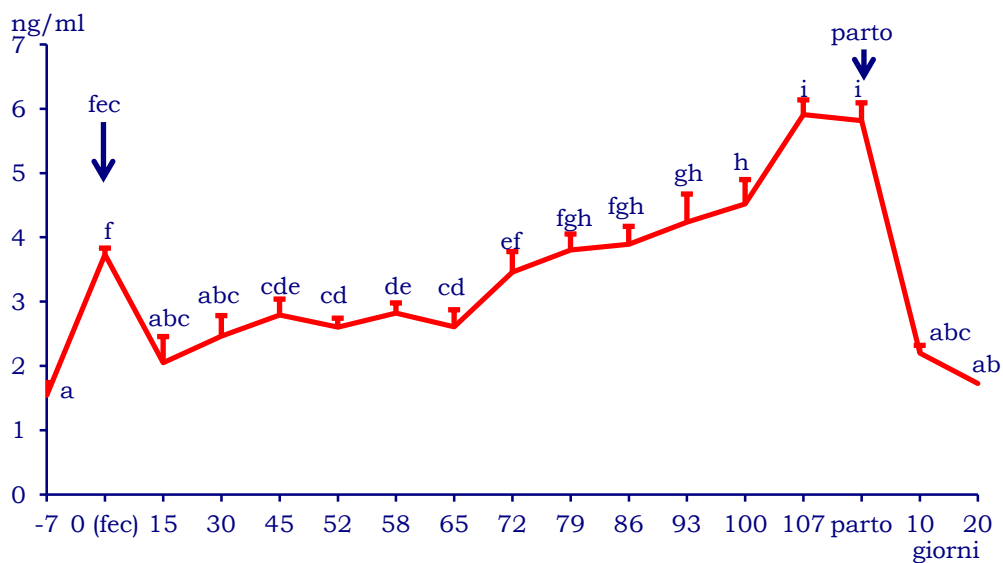
Risultati

Leptina

La leptina è risultata espressa in tutti i campioni di placenta analizzati. L'espressione non è stata modificata dalla localizzazione del prelievo. L'analisi recettoriale ha indicato l'assenza della forma lunga, mentre la forma recettoriale breve è stata evidenziata in tutti i campioni. I risultati sono evidenziati in figura 1.

Figura 1: Corsa elettroforetica dei geni per la leptina ed il suo recettore.

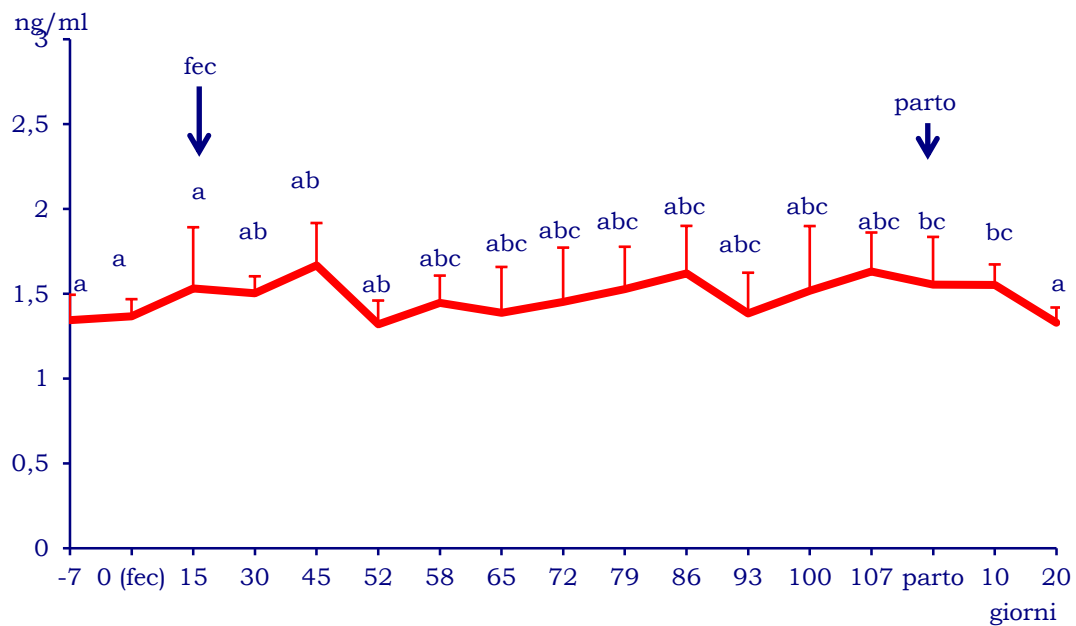
La concentrazione media di leptina, ($1,55 \pm 0,27$ ng/ml) prima della fecondazione è più che raddoppiata ($3,74 \pm 0,27$ ng/ml; $p < 0,05$) alla fecondazione, per poi ritornare ai valori basali nei primi 15 giorni di gravidanza. A partire dal 70° giorno e fino a circa il 100° d di gravidanza la sua concentrazione aumenta gradualmente per poi incrementare notevolmente nelle due settimane precedenti il parto, momento in cui tocca valori di $5,91 \pm 0,28$ ng/ml. Durante la lattazione i valori ematici di leptina tornano sui valori basali (grafico 1).

Grafico 1: Valori ematici della leptina.

Ormone somatotropo

Nel grafico 2 è riportato l'andamento ematico del GH. I livelli medi basali di GH sono risultati $1,45 \pm 0,13$ ng/ml; per tutta la durata della gravidanza non si sono rilevate variazioni significative.

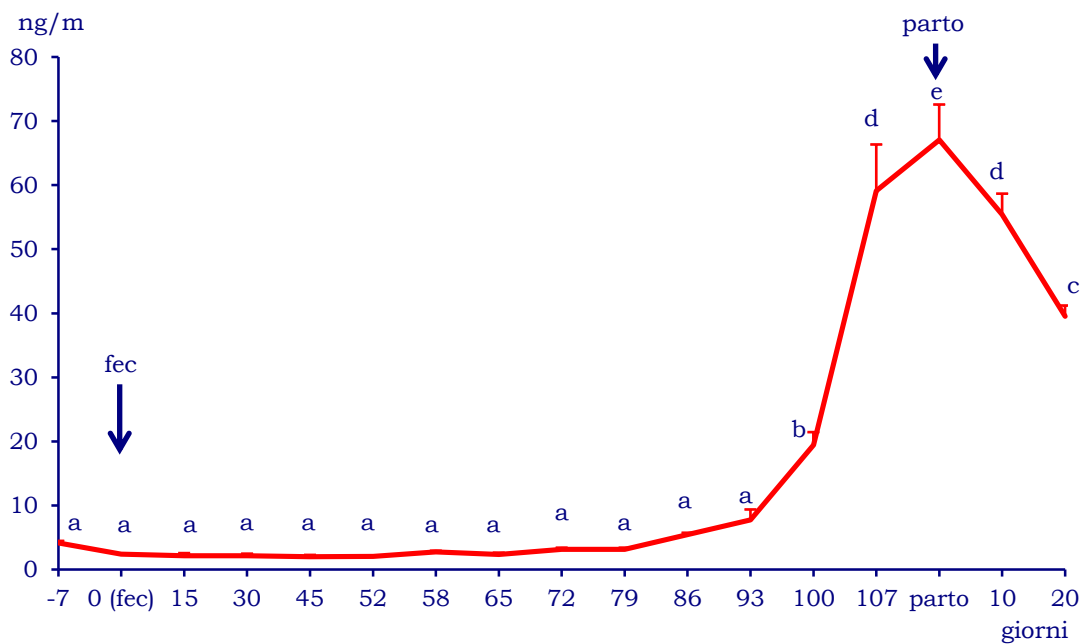
Grafico 2: Livelli ematici dell'ormone somatotropo.



Prolattina

Nel corso del primo mese di gestazione, la PRL (grafico 3) si è mantenuta su livelli basali ($1,98 \pm 0,87$ ng/ml), con lieve, ma non significativo incremento ($2,47 \pm 0,41$ ng/ml) fino al terzo mese. Da questo momento la PRL ha avuto un significativo ($p < 0,05$) incremento fino a raggiungere le massime concentrazioni al parto ($87 \pm 2,9$ ng/ml) e durante la lattazione ($55,4 \pm 3,2$ ng/ml al 10° giorno e $39,5 \pm 1,6$ ng/ml al 20° giorno dal parto).

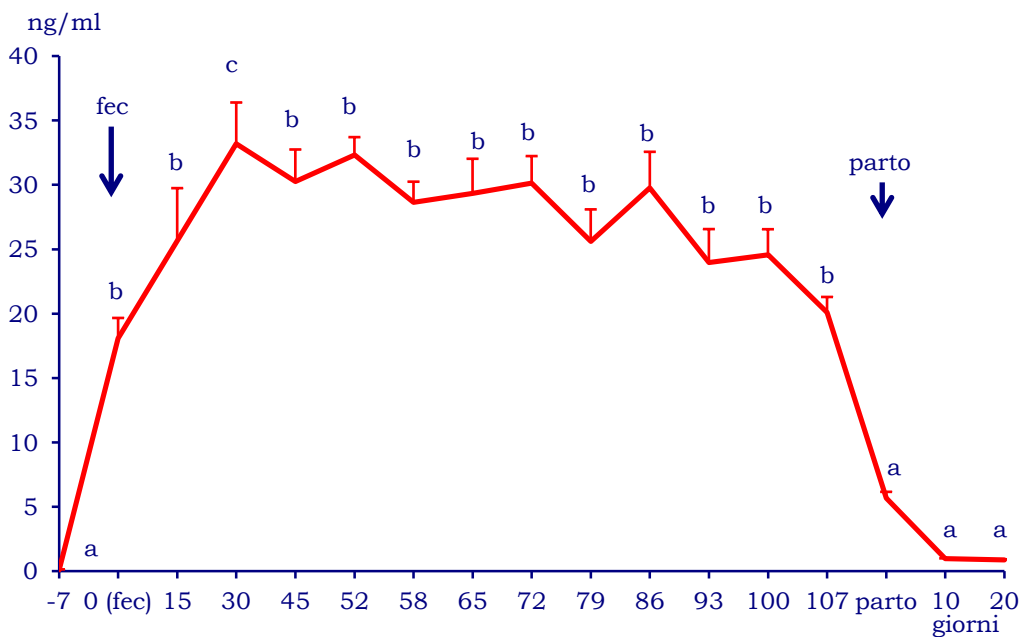
Grafico 3: Livelli ematici della prolattina.



Progesterone

La concentrazione ematica di progesterone, riportata nel grafico 4, pari a $0,28 \pm 0,05$ ng/ml all'inseminazione, aumenta con l'instaurarsi della gravidanza ($p < 0,05$) e rimane costante per tutto il periodo gestazionale ($45,23 \pm 3,5$ ng/ml) ($p > 0,05$). Al parto il livello di progesterone scende a valori di $7,3 \pm 0,5$ ng/ml.

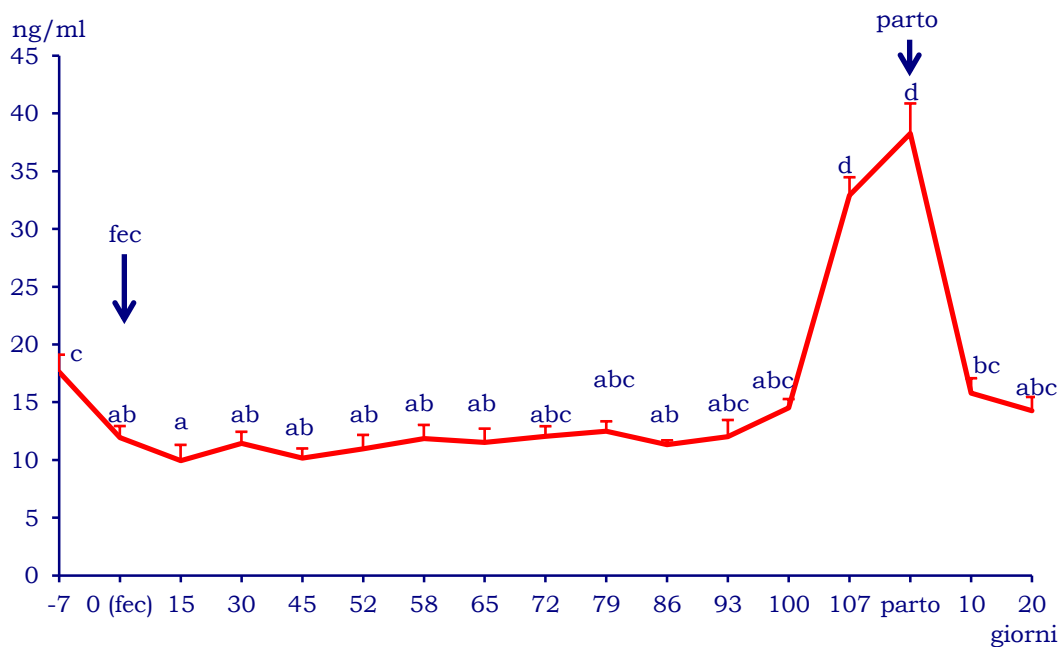
Grafico 4: Livelli ematici del progesterone.



Cortisolo

Nel grafico 5 si osserva che i livelli basali di cortisolo ($17,63 \pm 1,4$ ng/ml) si riducono alla fecondazione ($p < 0,05$) e rimangono tali sino a oltre metà della gestazione. A partire dal 100°giorno, si assiste ad un tendenziale aumento del tenore di cortisolo che raggiunge il picco massimo in prossimità del parto ($38,7 \pm 2,6$ ng/ml; $p < 0,05$), per poi tornare ai valori basali.

Grafico 5: Livelli ematici di cortisolo.



Discussione

Gravidanza significa necessità da parte della madre di rispondere alle crescenti domande del/i feto/i in crescita, nel mantenimento del suo stato di salute. Tutti gli adattamenti che coinvolgono i diversi sistemi materni (cardio-respiratorio, neuroendocrino, immunitario) sono finalizzati all'omeostasi energetica e si traducono in un incremento nell'appetito e nell'assunzione di cibo che inizia molto prima della reale necessità metabolica materna e rappresenta la risposta adattiva della madre alla maternità. Nella specie suina, la quantità di cibo che la gestante può assumere è strettamente regolamentata e impedisce al soggetto un'alimentazione *ad libitum*, anche se la qualità della dieta è tale da garantire il corretto apporto energetico. L'ormone che regola l'assunzione di cibo è la leptina (Zhang et al., 1994), un ormone adipocitario che sopprime, a livello centrale, l'assunzione di cibo ed agisce, come mediatore locale, sui metabolismi di glucosio e lipidi. Durante la gestazione la placenta diviene sede attiva di sintesi e secrezione dell'ormone ed è responsabile dello stato di iperleptinemia gravidica associato a leptino resistenza (Trayhurn et al., 2006) con disaccoppiamento fra assunzione di cibo (iperfagia gravidica) ed attività metabolica. Nella scrofa, l'insorgenza di leptino-resistenza non dovrebbe rivestire un significato funzionale, a differenza di altre specie dove l'alimentazione *ad libitum* la rende necessaria. I nostri risultati indicano che, nonostante la somministrazione controllata di alimento, si assiste anche nella scrofa ad un aumento dei livelli di leptina con il procedere della gestazione fino al parto. Gli elevati livelli di ormone sono compatibili con un meccanismo di leptino-resistenza anche se l'impossibilità di avere iperfagia è coerente con un'azione locale piuttosto che centrale. Quest'ipotesi trova conferma nell'espressione a livello placentare sia della leptina che della forma recettoriale breve, indicando sia la produzione diretta che l'azione locale. Del resto, Margetic e coll. (2002), riportano numerosi studi che riconoscono alla leptina placentare sia il ruolo di fattore di crescita e mitogeno, sia la

capacità di modulare perifericamente il bilancio delle riserve energetiche, anche attraverso la facilitazione delle risposte endocrine tipiche della gravidanza. Il progesterone, da un punto di vista metabolico, è un ormone oressigenico noto per indurre aumento del peso e dell'assunzione di cibo senza alcun effetto sui livelli di leptina (Grueso et al., 2001). Anche nel nostro modello sperimentale dove la scrofa non può accedere liberamente al cibo, il suo profilo è indipendente da quello della leptina. Un andamento indipendente dalla leptina è stato riportato anche per l'estradiolo: l'estradiolo è in grado di ridurre l'assunzione di cibo e di incrementare l'utilizzazione dell'energia, indipendentemente dai livelli di leptina (Rocha et al., 2001). Questo effetto si traduce in un potenziamento degli effetti della leptina e conseguente riduzione dell'assunzione di cibo: in effetti, nei nostri soggetti abbiamo rilevato un aumento dei livelli di leptina all'estro, quando i livelli di estradiolo sono elevati e quando in tutte le specie le femmine presentano una tipica inappetenza.

È interessante sottolineare anche la relazione osservata fra leptina e cortisolo. Durante la gestazione, i glicocorticoidi promuovono la sintesi e la secrezione di leptina nel feto (Forhead et al., 2009): dalla figura [cortisolo] si evidenzia un significativo aumento del cortisolo in corrispondenza del terzo trimestre, cioè quando l'aumento della leptina inizia a farsi più evidente. Gli adattamenti metabolici della gravidanza in relazione alle richieste dello sviluppo fetale e neonatale vengono integrate anche dagli ormoni lattogenici e somatogenici materni, quali GH e PRL. Nei nostri soggetti si assiste ad un mantenimento del GH sui valori basali: in molte specie, durante la gestazione, l'espressione ipofisaria di GH materno è soppressa e una variante prodotta a livello placentare diviene di fatto la forma predominante. Non esistono dati nella specie suina, ma il fatto che i normali dosaggi non siano in grado di discriminare fra le due forme e che sia stata evidenziata la presenza di un analogo del GHRH nella placenta di scrofa (Farmer et al., 1997), non ci permette di escludere che possa esserci un contributo placentare

e un'azione diretta e locale del GH. L'altro ormone somatogenico è la PRL, che classicamente è correlato con la lattazione e il comportamento materno: nei nostri risultati è infatti ben evidente l'aumento nelle concentrazione ematica di PRL nelle ultime fasi di gestazione e durante la lattazione. Nell'uomo e nel ratto (Trujillo et al., 2011) si assiste ad un picco di prolattina all'inizio della gestazione che stimola una risposta oressigenica attraverso azioni dirette e non (i.e stimolazione della secrezione di progesterone) sostenuta poi dallo stato di leptino-resistenza. Nella nostra indagine non abbiamo rilevato alcuna variazione nei livelli di prolattina nelle fasi iniziali di gestazione e questo potrebbe ulteriormente essere conferma dell'assenza di uno stato di leptino-resistenza nei nostri animali. Il ruolo della PRL nella scrofa sarebbe, pertanto, più connesso con le ultime fasi di gestazione e la lattazione seguente.

In conclusione, riteniamo il dato di maggior interesse emerso da questo lavoro sia legato alla predominanza di un'azione locale della leptina nelle scrofe in gestazione. La non induzione della resistenza alla leptina in questi animali è funzione esclusiva delle modalità di gestione dell'alimentazione (razionamento). La nutrizione della scrofa gestante è fondamentale nella determinazione della variabilità intra-nidiata e le performance produttive di un animale vengono "programmate" durante la vita fetale (Campos et al., 2012). La possibilità di intervenire sulla nutrizione della madre non solo attraverso le caratteristiche della dieta, ma soprattutto attraverso il modo in cui il sistema endocrino gestisce i nutrienti apportati con la dieta, rende la programmazione fetale una possibilità reale all'interno del management aziendale. I nostri studi successivi saranno infatti volti a studiare come l'induzione o no della leptino-resistenza (effetto centrale vs effetto locale) possa influenzare le nidiata e quindi possa programmare in modo diverso i soggetti al fine di migliorarne le performance produttive.

BIBLIOGRAFIA

Andrés-Elias N, Pujols J, Badiola I and Torrallardona D. Effect of nucleotides and carob pulp on gut health and performance of weanling piglets. *Livestock Production Science*. 2007. 108: 280-283.

Ardawi MSM and Newsholme EA. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. *Biochemical Journal*. 1983. 212: 835-842.

Azuma K, Katsukawa F, Oguchi S, Murata M, Yamazaki H, Shimada A, Saruta T. Correlation between serum resistin level and adiposity in obese individuals. *Obesity Research*. 2003. 11: 997-1001.

Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Molecular Cell*. 1999. 4: 585-95.

Baratta M, Saleri R, Mainardi GL, Valle D, Giustina A, Tamanini C. Leptin regulates GH gene expression and secretion and nitric oxide production in pig pituitary cells. *Endocrinology*. 2002. 143: 551-7.

Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation Research*. 2005. 96: 939-49.

Blotta MH, DeKruyff RH and Umetsu DT. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes. *Journal of Immunology*. 1997. 158: 5589-5595.

Borghetti P, De Angelis E, Saleri R, Cavalli V, Cacchioli A, Corradi A, Mocchegiani E and Martelli P. Peripheral T lymphocyte changes in neonatal piglets: relationship with growth hormone (GH), prolactin (PRL) and cortisol changes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2006a. 110: 17-25.

Borghetti P, Ferrari L, Cavalli V, De Angelis E, Saleri R, Corradi A and Martelli P. Effect of weaning and vaccinations on immune and hormonal parameters in neonatal piglets. *Veterinary Research Communication*. 2006b. 30 (suppl. 1): 227-230.

Borghetti P, Saleri R, Mocchegiani E, Corradi A and Martelli P. Infection, immunity and the neuroendocrine response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2009. 130: 141-162.

Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science*. 2004. 304: 108-10.

Bradley RL, Cleveland KA, Cheatham B. The adipocyte as a secretory organ: mechanisms of vesicle transport and secretory pathways. *Recent Progress in Hormone Research*. 2001. 56: 329-58.

Brooks PH and Tsourgiannis CA. Factors affecting the voluntary feed intake of weaned pig. In *Weaning the pig. Concepts and consequences* (eds JR Pluske, J Le Dividich and MWA Verstegen). Wageningen Academic Publishers, The Netherlands. 2006. 81-116.

Bronte-Stewart B, Antonis A, Eales L, Brock JF. Effects of feeding different fats on serum-cholesterol level. *Lancet*. 1956. 270: 521-526.

Brun RP, Spiegelman BM. PPAR gamma and the molecular control of adipogenesis. *Journal of Endocrinology*. 1997. 155: 217-218.

Burrin DG and Stoll B. Key nutrients and growth factors for the neonatal gastrointestinal tract. *Clinics in Perinatology*. 2002. 29: 65-96.

Carroll JA, Veum TL and Matteri RL. Endocrine responses to weaning and changes in post-weaning diet in the young pig. *Domestic Animal Endocrinology*. 1998. 15: 183-194.

Campos PH, Silva BA, Donzele JL, Oliveira RF, Knol EF. Effects of sow nutrition during gestation on within-litter birth weight variation: a review. *Animal*. 2012. 6: 797-806.

Chmurzyńska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *Journal of Applied Genetics*. 2006. 47: 39-48.

Chumurzynska A. Fetal programming: link between early nutrition, DNA methylation, and complex diseases. *Nutrition Reviews*. 2010. 68: 87-98.

Dancey CP, Attree EA and Brown KF. Nucleotide supplementation: a randomised double-blind placebo controlled trial of IntestAidIB in people with Irritable Bowel Syndrome. *Nutrition Journal*. 2006. 5: 16-24.

Daza A, Menoyo D, Lopez Bote CJ. Carcass traits and fatty acid composition of subcutaneous, intramuscular and liver fat from Iberian pigs fed in confinement only with acorns or a formulated diet food. *Food and Science and Technology International*. 2009. 15: 563-569.

De Smet S, Raes K, Demeyer D. Meat fatty acid composition as affected by fatness and genetic factors: a review. *Animal Research*. 2004. 53: 81-98.

Di Giancamillo A, Domeneghini C, Paratte R, Dell'Orto V and Bontempo V. Oral feeding with L-glutamine and nucleotides: impact on some GALT (gut associated lymphoid tissue) parameters and cell proliferation / death rates in weaning piglets. *Italian Journal of Animal Science 2 (Suppl.1)*. 2003. 364-366.

- Domeneghini C, Di Giancamillo A, Savoini G, Paratte R, Bontempo V and Dall'Orto V. Structural patterns of swine ileal mucosa following L-glutamine and nucleotide administration during the weaning period. A histochemical and histometrical study. *Histology and Histopathology*. 2004. 19: 49-59.
- Eckel RH, Yost TJ, Jensen DR, Haugen BR. Effect of dietary macronutrient composition on tissue-specific lipoprotein lipase activity and insulin action in normal-weight subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1998. 68: 296-302.
- Edwards, SA. Perinatal mortality in the pig: environmental or physiological solutions?. *Livestock Production Science*. 2002. 78: 3-12.
- Elenkov IJ and Chrousos GP. Stress hormones, pro-inflammatory, and anti-inflammatory cytokines and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002. 96: 290-303.
- Fargnoli JL, Sun Q, Olenczuk D, Qi L, Zhu Y, Hu FB, Mantzoros CS. Resistin is associated with biomarkers of inflammation while total and high-molecular weight adiponectin are associated with biomarkers of inflammation, insulin resistance, and endothelial function. *European Journal of Endocrinology*. 2010. 162: 281-288.
- Farmer C, Gaudreau P. Presence of a bioactive and immunoreactive growth-hormone-releasing-factor-like substance in porcine placenta. *Biology of the Neonate*. 1997. 72: 363-369.
- Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metabolism*. 2006. 4: 263-73.
- Flynn NE and Wu G. Glucocorticoids play an important role in mediating the enhanced metabolism of arginine and glutamine in enterocytes of postweaning pigs. *Journal of Nutrition*. 1997. 127: 732-737.
- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 1957. 226: 497-500.
- Forhead AJ, Fowden AL. The hungry fetus? Role of leptin as a nutritional signal before birth. *Journal of Physiology*. 2009. 587: 1145-1152.
- Foster SL, Medzhitov R. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clinical Immunology*. 2009. 130: 7-15.
- Gelsinger C, Tschoner A, Kaser S, Ebenbichler CF. Adipokine update - new molecules, new functions. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2010. 160: 377-390.
- Godlewski MM, Bierla JB, Strzalkowski A, Martinez-Puig D, Pajak B, Kotunia A, Chetrit C and Zabielski R. A novel cytometric approach to study intestinal mucosa

rebuilding in weaned pigs fed with dietary nucleotides. *Livestock Science*. 2009. 123: 215-220.

Gonzalez-Añoover P, Encinas T, Sanz E, Letelier CA, Torres-Rovira L, de Mercado E, Pallares P, Sanchez-Sanchez R, Gonzalez-Bulnes A. Preovulatory follicle dynamics and ovulatory efficiency in sows with thrifty genotype and leptin resistance due to leptin receptor gene polymorphisms (Iberian pig). *General and Comparative Endocrinology*. 2011. 170: 200-206.

Grueso E, Rocha M, Puerta M. Plasma and cerebrospinal fluid leptin levels are maintained despite enhanced food intake in progesterone-treated rats. *European Journal of Endocrinology*. 2001. 144: 659-665.

Gutierrez JP, Goyache F. A note on ENDOG: a computer program for analysing pedigree information. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 2005. 122: 172-176.

Guillemet R, Dourmad J. Y., Meunier-Salaün M. C. Feeding behavior in primiparous lactating sows: impact of a high-fiber diet during pregnancy. *Journal of Animal Science*. 2006. 84: 2474-2481

Hay M, Orgeur P, Levy F, Le Dividich J, Concordet D, Nowak R, Schaal B and Mormède P. Neuroendocrine consequences of very early weaning in swine. *Physiology and Behavior*. 2001. 72: 263-269.

Hayday A and Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nature Reviews Immunology*. 2003. 3: 233-242.

Hivert MF, Sullivan LM, Fox CS, Nathan DM, D'Agostino RB Sr, Wilson PW, Meigs JB. Associations of adiponectin, resistin, and tumor necrosis factor-alpha with insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2008. 93: 3165-3172.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993. 259: 87-91.

Kennedy G.C. The hypothalamic control of food intake in rats. *Biological Science*. 1950. 137: 535-549.

Klok MD, Jakobsdottir S, Drent ML. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity Reviews*. 2007. 8: 21-34.

Kratzsch J, Dehmel B, Pulzer F, Keller E, Englaro P, Blum WF, Wabitsch M. Increased serum GHP levels in obese pubertal children and adolescents: relationship to body composition, leptin and indicators of metabolic disturbances. *International Journal of Obesity*. 1997. 21: 1130-1136.

Krusinová E, Pelikánová T. Fatty acid binding proteins in adipose tissue: a promising link between metabolic syndrome and atherosclerosis? *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2008. 82 Suppl 2: 127-134.

Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 2009. 388: 621-625.

Ladyman SR. Leptin resistance during pregnancy in the rat. *Journal of Neuroendocrinology*. 2008. 20: 269-277.

Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD, Kuhajda FP. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science*. 2000. 288: 2379-2381.

Loo LH, Lin HJ, Singh DK, Lyons KM, Altschuler SJ, Wu LF. Heterogeneity in the physiological states and pharmacological responses of differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Cell Biology*. 2009. 187: 375-84.

López M, Tovar S, Vázquez MJ, Williams LM, Diéguez C. Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proceeding of the Nutrition Society*. 2007. 66: 131-55.

Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine*. 1995. 1: 1155-61.

Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *International Journal of Obesity*. 2002. 26: 1407-33.

Martinez-Puig D, Manzanilla EG, Morales J, Borda E, Pérez JF, Piñeiro C and Chetrit C. Dietary nucleotides supplementation reduces occurrence of diarrhoea in early weaned pigs. *Livestock Science*. 2007. 108: 276-279.

Mateo CD and Stein HH. Nucleotides and young animal health: can we enhance intestinal tract development and immune function? In *Nutritional biotechnology in the feed and food industries*. Proceedings of Alltech's 20th annual symposium (ed. TP Lyons and KA Jacques). Nottingham University Press, Nottingham, UK. 2004. 159-168.

Mateo CD, Peters DN and Stein HH. Nucleotides in sow colostrum and milk at different stages of lactation. *Journal of Animal Science*. 2004. 82: 1339-1342.

Møller N and Jørgensen JO. Effects of growth hormone on glucose, lipid and protein metabolism in human subjects. *Endocrine Reviews*. 2009. 30: 152-177.

Monziols M, Bonneau M, Davenel A, Kouba M. Comparison of the lipid content and fatty acid composition of intermuscular and subcutaneous adipose tissues in pig carcasses. *Meat Science*. 2007. 76: 54-60.

Morales J, Pérez JF, Martín-Orúe SM, Fondevila M, Gasa J. Large bowel fermentation of maize or sorghum-acorn diets fed as a different source of carbohydrates to Landrace and Iberian pigs. *British Journal of Nutrition*. 2002. 88: 489-98.

Neel JV. "Diabetes Mellitus: A "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"?. *American Journal of Human Genetics*. 1962. 14: 353–362.

Neels JG, Olefsky JM. Inflamed fat: what starts the fire? *Journal of Clinical Investigation*. 2006. 116: 33-35.

Ochoa Mdel C, Martí A, Martínez JA. Obesity studies in candidate genes. *Clinical Medicine*. 2004. 122: 542-551.

Oh DK, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin in health and disease. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2007. 9: 282-289.

Perez-Palacios T, Ruiz J, Tejeda JF, Antequera T. Subcutaneous and intramuscular lipid traits as tools for classifying Iberian pigs as a function of their feeding background. *Meat Science*. 2009. 81: 632-640.

Pluske JR, Fenton TW, Lorschly ML, Pettigrew JE, Sower AF and Aherne FX. A modification to the isotope-dilution technique for estimating milk intake of pigs using pig serum. *Journal of Animal Science*. 1997a. 75: 1279-1283.

Pluske JR, Hampson DJ and Williams JH. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science*. 1997b. 51: 215-236.

Richards DF, Fernandez M, Caulfield J and Hawrylowicz CM. Glucocorticoids drive human CD8 (+) T cell differentiation towards a phenotype with high IL-10 and reduced IL-4, IL-5 and IL-13 production. *European Journal of Immunology*. 2001. 30: 2344-2354.

Rocha M, Grueso E, Puerta M. The anorectic effect of oestradiol does not involve changes in plasma and cerebrospinal fluid leptin concentrations in the rat. *Journal of Endocrinology*. 2001. 171: 349-354.

Rogan MP, Reznikov LR, Pezzullo AA, Gansemer ND, Samuel M, Prather RS, Zabner J, Fredericks DC, McCray PB Jr, Welsh MJ and Stoltz DA. Pigs and humans with cystic fibrosis have reduced insulin-like growth factor 1 (IGF1) levels at birth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010. 107: 20571-20575.

Rudel LL, Park JS, Sawyer JK. Saturated and unsaturated fatty acids independently regulate low density lipoprotein receptor activity and production rate *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 1995. 15: 2101-2110.

Sabbioni A, Beretti V, Manini R, Cervi C, Superchi P. Effect of sex and season of birth on Gompertz growth curve parameters in “Nero di Parma” pigs. *Italian Journal of Animal Science*. 2009. 8: 719-726.

Sabbioni A, Zanardi E, Beretti V, Paini V, Amicucci P, Saleri R, Superchi P. LXIV Convegno nazionale SISVet, Asti, 7-10 Settembre 2010.

Salak-Johnson JL and McGlone JJ. Making sense of apparently conflicting data: stress and immunity in swine and cattle. *Journal of Animal Science*. 2007. 85: 81-88.

Sapolsky RM, Romero LM and Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*. 2000. 21: 55-89.

Schenk, S., Saberi, M., Olefsky, J. M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 2008. 118: 2992–3002.

Seo T, Al-Haideri M, Treskova E, Worgall TS, Kako Y, Goldberg IJ, Deckelbaum RJ. Lipoprotein lipase-mediated selective uptake from low density lipoprotein requires cell surface proteoglycans and is independent of scavenger receptor class B type 1. *Journal of Biological Chemistry*. 2000. 275: 30355-30362.

Smith S, Witkowski A, Joshi AK. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Progress in Lipid Research*. 2003. 42: 289-317.

Stahl A, Evans JG, Pattel S, Hirsch D, Lodish HF. Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes. *Developmental Cell*. 2002. 2: 477-488.

Statistical Analysis System (SAS) 2008. User's Guide: Statistics (Version 9.2). SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Steppan CM, Lazar MA. The current biology of resistin. *Journal of Internal Medicine*. 2004. 255: 439-447.

Tamanini C, Giordano N, Chiesa F and Seren E. Plasma cortisol variations induced in the stallion by mating. *Acta Endocrinologica*. 1983. 447-450.

Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *British Journal of Nutrition*. 2004. 92: 347-55.

Trayhurn P, Bing C. Appetite and energy balance signals from adipocytes. *Biological Sciences*. 2006. 361: 1237-1249.

Trujillo ML, Spuch C, Carro E, Señarís R. Hyperphagia and central mechanisms for leptin resistance during pregnancy. *Endocrinology*. 2011. 152: 1355-1365.

Vendelbo MH, Jørgensen JO, Pedersen SB, Gormsen LC, Lund S, Schmitz O, Jessen N and Møller N. Exercise ad fasting activate growth hormone-dependent myocellular signal transducer and activator of transcription-5b phosphorylation and insulin-like growth factor-1 messenger ribonucleic acid expression in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2010. 95: 64-68.

Wang LF, Gong X, Le GW and Shi YH. Dietary nucleotides protect thymocyte DNA from damage induced by cyclophosphamide in mice. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2008. 92: 211-218.

Wellock IJ, Fortomaris PD, Houdijk JGM and Kyriazakis I. Effect of weaning age, protein nutrition and enterotoxigenic *Escherichia coli* challenge on the health of newly weaned piglets. *Livestock Science*. 2007. 108: 102-105.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante Jr AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*. 2003. 112: 1796–1808.

Wieggers GJ, Stec IEM, Sterzer P and Reul JMHM. Glucocorticoids and the immune response. In *Handbook of stress and the brain* (eds T Steckler, NH Kalin and JMHM Reul). Elsevier, Amsterdam , The Netherlands. 2005. 175-191.

Wilkinson M, Brown R, Imran SA, Ur E. Adipokine gene expression in brain and pituitary gland. *Neuroendocrinology*. 2007. 86: 191-209.

Woollett LA, Spady DK, Dietschy JM. Saturated and unsaturated fatty acids independently regulate low density lipoprotein receptor activity and production rate. *Journal of Lipid Research*. 1992. 33: 77-88.

Wu G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *Journal of Nutrition*. 1998. 128: 1249-1252.

Wu G, Meininger CJ, Kelly K, Watford M and Morris SM Jr. A cortisol surge mediates the enhanced expression of pig intestinal pyrroline-5-carboxylate synthase during weaning. *Journal of Nutrition*. 2000. 130: 1914-1919.

Wu G, Bazer FW, Johnson GA, Knabe DA, Burghardt RC, Spencer TE, Li XL and Wang JJ. Important roles for L-glutamine in swine nutrition and production. *Journal of Animal Science*. 2011. 89: 2017-2030.

Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 2003. 112: 1821-30.

Xu A, Wang Y, Xu JY, Stejskal D, Tam S, Zhang J, Wat NM, Wong WK, Lam KS. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clinical Chemistry*. 2006. 52: 405-413.

Zelnickova P, Leva L, Stepanova H, Kovaru F and Faldyna M. Age-dependent changes of proinflammatory cytokine production by porcine peripheral blood phagocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2008. 124: 367-378.

Zhang Y, Proenca R, Maffaei M, Barone M, Lepold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994. 372: 425-432.

Zhang S, Knight TJ, Stalder KJ, Goodwin RN, Lonergan SM, Beitz DC. Effects of breed, sex, and halothane genotype on fatty acid composition of pork. *Journal of Animal Science*. 2007. 85: 583–591.