



# UNIVERSITÀ DI PARMA

Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie

Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in Medicina  
Veterinaria

## GLI EFFETTI DELLO STRESS OSSIDATIVO NELLA CAPRA DA LATTE

THE EFFECTS OF OXIDATIVE STRESS IN DAIRY GOAT

**Relatore:**

Chiar.mo Prof. Fausto Quintavalla

**Correlatore:**

Chiar.ma Prof. Giuseppina Basini

**Laureanda:**

Michelle Sartori

302557

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**



# Indice

|   |    |
|---|----|
| Abstract .....  | 5  |
| Introduzione.....   | 7  |
| 1. Lo stress ossidativo .....                                 | 9  |
| 1.1 Specie reattive dell'ossigeno (ROS) .....                 | 10 |
| 1.2 Specie reattive dell'azoto (RNS) .....                    | 11 |
| 1.3 Sistemi antiossidanti .....                               | 12 |
| 1.3.1 Antiossidanti enzimatici .....                          | 13 |
| 1.3.2. Antiossidanti non enzimatici .....                     | 14 |
| 1.4 Effetti benefici di ROS e RNS .....                       | 15 |
| 2. Stress ossidativo e produzione di latte .....              | 19 |
| 2.1 Cenni sull'allevamento delle capre da latte .....         | 19 |
| 2.1.1 Parto e prime cure al neonato .....                     | 20 |
| 2.1.2 Allevamento della rimonta: svezzamento .....            | 21 |
| 2.1.3 Lattazione .....  | 22 |
| 2.1.4 Gestione delle monte.....                               | 23 |
| 2.1.5 Gravidanza e asciutta.....                              | 24 |
| 2.2 Alimentazione nelle varie fasi produttive .....           | 24 |
| 2.3 Stress ossidativo e Mastiti.....                          | 26 |
| 2.3.1 Introduzione.....                                       | 26 |
| 2.3.2 Mastite e produzione di latte.....                      | 28 |
| 2.3.3 Effetti sui parametri qualitativi.....                  | 28 |
| 2.3.4 Effetti sugli enzimi.....                               | 30 |
| 2.3.5 Stress ossidativo e mastite .....                       | 31 |
| 2.4 Stress ossidativo e periparto .....                       | 33 |
| 2.5 Stress ossidativo e stress da caldo .....                 | 35 |
| 3. Effetti dello stress ossidativo nella capra da latte ..... | 39 |

|   |    |
|---|----|
| 3.1 Materiali e metodi.....                             | 39 |
| 3.1.1 Selezione dei soggetti .....                      | 39 |
| 3.1.2 Prelievi ematici e stoccaggio dei campioni .....  | 41 |
| 3.1.3 Analisi dei campioni .....                        | 42 |
| 3.1.4 d-ROMs (Derived Reactive Oxygen metabolites)..... | 42 |
| 3.1.5 NO (Ossido nitrico).....                          | 45 |
| 3.1.6 WST (Anione superossido).....                     | 47 |
| 3.1.7 SOD (Enzima Superossido dismutasi) .....          | 48 |
| 3.1.8 FRAP (Ferric reducing ability of plasma) .....    | 50 |
| 4. Risultati.....                                       | 53 |
| 5. Discussione .....                                    | 65 |
| 5.1 Asciutta vs Lattazione .....                        | 65 |
| 5.2 Asciutta VS Stress da caldo .....                   | 66 |
| 5.3 Lattazione vs Stress da caldo .....                 | 67 |
| 6. Conclusioni .....                                    | 69 |
| Bibliografia.....                                       | 71 |

## **Abstract**

In recent years oxidative stress has been the subject of numerous studies in both the human and animal field.

Oxidative stress means the condition in which the production of free radicals exceeds the ability of the body's antioxidant systems to counteract them. While initially almost everyone thought that ROS and RNS produced by metabolic processes had exclusively harmful role on the cells of organisms, it was later discovered that these molecules play a fundamental role as secondary messengers in intercellular communication.

In the zootechnical field, numerous studies have been carried out on oxidative stress, in particular in dairy cattle has been evaluated during pathologies, such as mastitis and heat stress, or in para physiological conditions, such as perinatal and dry, what were the levels of ROS and RNS produced and what was the response of antioxidant systems.

In Europe, goat farming has taken off considerably in the last twenty years, initially the dairy farming systems have been adopted, after which numerous studies have been carried out to better understand its physiology, production, disease response, nutritional needs, ethology, and behavioral needs, and on the basis of this numerous changes have been made to farming systems to increase animal welfare and to ensure adequate production.

As in all living beings, also in sheep and goats we talk about oxidative stress and consequently some scientific work has been carried out based on previous studies carried out on dairy cows, even if there is still a lot of work to be done.

The purpose of this thesis is to try to understand if the variables that characterize the various production phases (dry, perinatal, lactation, hot stress, etc.) affect the activity of antioxidant systems and the production of free radicals and whether there is a relationship with the occurrence of oxidative stress. For this purpose, serum and plasma samples were taken on a semi-intensive goat farm of thirty animals located in the Parma Apennines. The samples were taken during the dry period in the winter, mid-lactation and after exposure to a period of intense heat to assess heat stress.



## Introduzione

Negli ultimi anni lo stress ossidativo è stato oggetto di numerosi studi sia in campo umano che in campo animale.

Per stress ossidativo si intende la condizione in cui la produzione di radicali liberi supera la capacità dei sistemi antiossidanti dell'organismo di contrastarli. Mentre inizialmente si pensava che ROS ed RNS prodotti dai processi metabolici avessero esclusivamente ruolo dannoso sulle cellule degli organismi, si è poi scoperto che in realtà queste molecole hanno ruolo fondamentale come messaggeri secondari nella comunicazione intercellulare.

In campo zootecnico sono stati effettuati numerosi studi sullo stress ossidativo, in particolare nella bovina da latte è stato valutato in corso di patologie, come mastite e stress da caldo, o in condizioni para fisiologiche, come il periparto e l'asciutta, quali fossero i livelli di ROS ed RNS prodotti e quale fosse la risposta dei sistemi antiossidanti.

In Europa negli ultimi vent'anni l'allevamento caprino ha preso notevolmente piede, inizialmente sono stati adottati i sistemi di allevamento delle vacche da latte, dopodiché sono stati effettuati numerosi studi per capirne meglio la fisiologia, le produzioni, la risposta alle patologie, le esigenze nutritive, l'etologia e le esigenze comportamentali e sulla base di questo sono state apportate numerose modifiche ai sistemi di allevamento per aumentare il benessere animale e per garantire produzioni adeguate.

Come in tutti gli esseri viventi, anche negli ovi-caprini si parla di stress ossidativo e di conseguenza sono stati effettuati alcuni lavori scientifici basandosi sui precedenti studi effettuati sulle bovine da latte, anche se in realtà il lavoro da fare è ancora tanto.

Lo scopo di questa tesi è cercare di capire se le variabili che caratterizzano le varie fasi produttive (asciutta, periparto, lattazione, stress da caldo, ecc.) influenzino o meno l'attività dei sistemi antiossidanti e la produzione di radicali liberi e se esiste correlazione con l'insorgenza di stress ossidativo. A tale scopo sono stati effettuati campioni di siero e plasma su un allevamento caprino semi-intensivo di trenta animali situato nell'Appennino Parmense. I prelievi sono stati effettuati durante il periodo di asciutta nella stagione invernale, a metà lattazione e successivamente all'esposizione ad un periodo di caldo intenso per valutare lo stress da caldo.





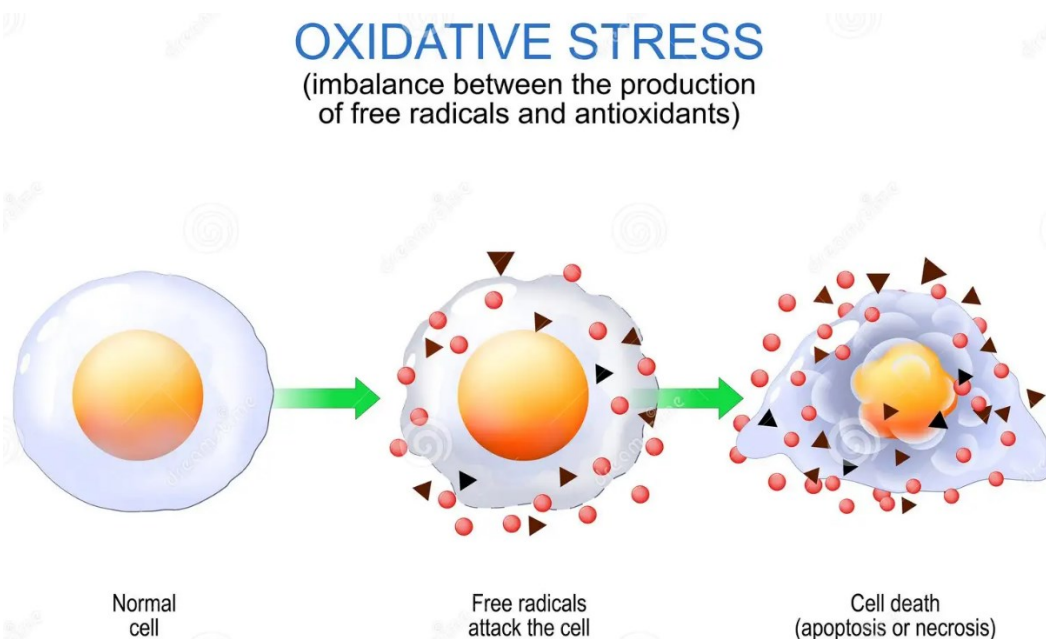
## 1. Lo stress ossidativo

Con il termine "Stress ossidativo" si intende quel meccanismo di danno cellulare determinato da un eccesso di sostanze chimiche prodotte a livello mitocondriale (Calabresi, 2008), denominate radicali liberi, caratterizzate da elevata reattività e instabilità chimica dovuta alla presenza di elettroni spaiati (Valko, et al., 2006).

Il concetto di stress ossidativo è stato introdotto da Harman nel 1956. (Barbagallo, 2005). Fisiologicamente circa l'1,5 % dell'ossigeno consumato dall'attività metabolica dei mitocondri viene convertito in specie ossidative dell'ossigeno (ROS). La loro attività ossidante viene contrastata da un sistema di sostanze antiossidanti di difesa (Barbagallo, 2005).

I principali agenti ossidanti sono i ROS (Reactive Oxygen Species) e i RNS (Reactive Nitrogen Species).

Queste sostanze vengono comunemente prodotte durante i processi metabolici degli organismi viventi, fino a che la loro quota rimane entro certi limiti i sistemi antiossidanti sono in grado di neutralizzarli, quando però la loro quota eccede la capacità di neutralizzazione di questi ultimi non vengono correttamente eliminati e provocano danni a livello della struttura cellulare (*Figura 1*), in particolar modo a lipidi, membrane, proteine ed acidi nucleici (Valko, et al., 2006).



*Figura 1. Effetto dello stress ossidativo sulle cellule (Dreamstime)*

## 1.1 Specie reattive dell'ossigeno (ROS)

L'ossigeno, nonostante sia un elemento indispensabile per la vita, è il principale responsabile della produzione dei radicali liberi.

I radicali liberi dell'ossigeno vengono prodotti a partire da sostanze esogene e da sostanze endogene come mitocondri, CP450, perossisomi e dall'attivazione delle cellule infiammatorie.

In condizioni fisiologiche, la produzione di ROS viene controllata da meccanismi omeostatici, in particolare da meccanismi *scavenger* mediati da enzimi antiossidanti in grado di convertire le specie reattive in  $O_2$  e  $H_2O$  (Calabresi, 2008).

I principali sono:

- $O_2^-$ : Anione superossido
- $\cdot OH$ : Ossidrilico

Oltre a questi abbiamo anche specie non radicaliche come perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), l'ozono ( $O_3$ ) e l'ossigeno singoletto (Calabresi, 2008).

In condizioni fisiologiche, la produzione di radicali liberi dell'ossigeno si aggira attorno al 5% della totalità introdotta. I ROS sono implicati in moltissime malattie ed è dimostrato che abbiano un ruolo fondamentale nella genesi del danno tissutale in molte condizioni morbose (Barbagallo, 2005).

Il principale è l'anione Superossido, il quale viene prodotto durante la respirazione cellulare nel mitocondrio a seguito della perdita di elettroni tra i vari coenzimi presenti nell'organulo. Questo viene rapidamente convertito in perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) grazie all'enorme quantità di sistemi antiossidanti all'interno del mitocondrio stesso come GSH e da enzimi come la Glutazione perossidasi e la Superossido dismutasi (SOD1, SOD2, SOD3) (Valko, et al., 2006).

Come già abbiamo visto, altre fonti endogene di ROS sono granulociti neutrofili, granulociti eosinofili e macrofagi, questi in particolare, una volta attivati originano numerose specie radicaliche come l'anione superossido, l'ossido nitrico e il perossido di idrogeno (Valko, et al., 2006).

A sua volta il perossido di idrogeno può reagire con metalli intermedi e produrre un altro radicale libero altamente reattivo, il radicale ossidrilico (Calabresi, 2008).

L'anione superossido può inoltre reagire con l'ossido nitrico (NO·) e formare l'anione perossinitrico (Calabresi, 2008).

Un'altra sostanza ossidante è il radicale ossidrile. Questo prodotto reagisce direttamente vicino al suo sito di produzione, può essere generato attraverso vari meccanismi, uno di questi è la decomposizione della molecola H<sub>2</sub>O, con formazione di ·OH e atomi di idrogeno (Valko, et al., 2006).

L'Ossidrile in vivo viene prevalentemente prodotto dalla degradazione metalcatalizzata del perossido di idrogeno, secondo la reazione di Fenton (*Figura 2*):

### The Fenton Reaction



Damages DNA/other biomolecules



Repeated insult leads to carcinogenesis

*Figura 2 Reazione di Fenton (Bystrom, et al., 2014)*

## 1.2 Specie reattive dell'azoto (RNS)

I radicali liberi che derivano dall'azoto vengono prodotti negli organismi dalle cellule muscolari lisce, dalle piastrine e dagli epatociti, i più comuni sono:

- **NO**: Ossido nitrico
- **NO<sub>2</sub>**: Diossido nitrico
- **NO<sub>3</sub><sup>-</sup>**: Perossinitrito
- **N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>**: Tetrossido di diazoto

La molecola più abbondante è l'Ossido Nitrico, il quale agisce come importante segnale biologico ossidativo in tantissimi processi fisiologici, fra cui la neurotrasmissione, la regolazione della pressione sanguigna, i meccanismi di difesa e la regolazione immunitaria e sul rilassamento della muscolatura liscia. Viene generato nei tessuti grazie all'azione dell'Ossido Nitrico sintetasi (Valko, et al., 2006).

Anche questa molecola, come detto in precedenza per i ROS, se prodotto in abbondanza non viene neutralizzato dall'azione dei sistemi antiossidanti e provoca stress Nitrossidativo, che determina alterazione della struttura delle proteine inibendone la loro normale funzione (Valko, et al., 2006).

Le cellule immunitarie, durante i processi infiammatori, producono sia Ossido Nitrico che l'anione superossido, queste due sostanze combinandosi generano una molecola ossidativamente più attiva che è l'anione perossinitrito (ONOO<sup>-</sup>), il quale può provocare frammentazione del DNA e ossidazione lipidica (Valko, et al., 2006).

### 1.3 Sistemi antiossidanti

Particolare importanza assume, quindi, la prevenzione nei confronti di queste sostanze e ciò può essere attuato mediante un attento monitoraggio di quelle che abbiamo definito "difese biologiche" (Barbagallo, 2005).

Gli antiossidanti sono sostanze chimiche che rallentano o prevengono l'ossidazione dei composti. L'ossidazione è una reazione chimica che trasferisce elettroni da una sostanza ad un'altra definita ossidante.

Le caratteristiche dell'antiossidante ideale sono:

- a) Estinguere specificamente i radicali liberi
- b) Chelare i metalli redox
- c) Rigenerare gli altri antiossidanti
- d) Essere assorbiti facilmente
- e) Avere concentrazione a livelli fisiologici nei tessuti
- f) Lavorare sia in ambiente idrofilo che lipofilo

Queste sostanze intervengono nelle reazioni da cui derivano i radicali liberi bloccando altre reazioni di ossidazione facendo ossidare se stessi, per questo vengono definiti agenti riducenti (Valko, et al., 2006).

Fra i vari agenti antiossidanti che si conoscono abbiamo:

- Enzima Superossido dismutasi (**SOD**)
- Enzima Catalasi (**CAT**)
- Enzima Glutazione perossidasi (**GPx**)

- Vitamina C
- Vitamina E
- Selenio

Gli antiossidanti si dividono in idrofili e lipofili, i primi reagiscono con sostanze presenti nel citoplasma cellulare e nel plasma, mentre i secondi agiscono in protezione delle membrane cellulari dalla perossidazione lipidica. (Sies, 1995)

Alcuni composti contribuiscono alla difesa da parte degli antiossidanti, in particolare vanno a chelare i metalli di transizione prevenendo così l'effetto catalitico che forniscono nella produzione dei radicali liberi nella cellula. È particolarmente importante l'abilità della chelazione del ferro ad opera dei trasportatori quali transferrina e ferritina (Imlay, 2003). Alcuni minerali sono considerati antiossidanti diretti, altri, invece, non hanno azione diretta ma sono comunque necessari all'azione degli enzimi antiossidanti.

### 1.3.1 Antiossidanti enzimatici

L'enzima Superossido dismutasi (**SOD**) catalizza la reazione che trasforma l'anione Superossido in Ossigeno e Perossido di idrogeno (*Figura 3*), questo enzima venne isolato nel 1939 ma solo nel 1969 McCord e Fridovich ne dimostrarono l'attività antiossidante. Esistono diverse isoforme di questo enzima, le più importanti sono:

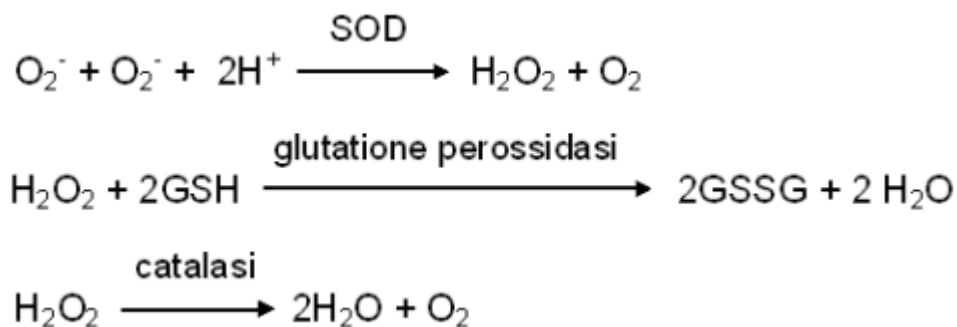
- Citosolica
- Mitocondriale
- Extracellulare

L'isoforma citosolica è detta anche **Cu, Zn-SOD** e catalizza nello specifico la dismutazione dell'anione superossido in acqua e ossigeno ed è caratterizzata dalla presenza di ioni Rame e Zinco nel sito attivo della molecola. L'isoforma mitocondriale, detta **Mn-SOD**, contiene un atomo di Manganese per subunità, è uno dei maggiori antiossidanti con attività anti-tumorale. Infine, l'isoforma extracellulare, detta **EC-SOD**, è una glicoproteina che contiene anch'essa rame e zinco con un'elevata affinità per glicosamminoglicani, la sua regolazione avviene grazie all'azione delle citochine (Valko, et al., 2006).

La Catalasi (**CAT**) è un enzima presente nelle cellule vegetali, animali e batteriche aerobiche e si trova all'interno dei perossisomi. L'enzima si occupa della conversione del

perossido di idrogeno in acqua e ossigeno (*Figura3*) ed è in grado di convertire numerosissime molecole al minuto (Valko, et al., 2006).

L'enzima Glutazione perossidasi (**GPx**) è presente in due forme, una dipendente dal selenio ed una indipendente. Le proprietà antiossidanti della forma selenio dipendente consentono di eliminare i perossidi che fungono da substrato per la reazione di Fenton. L'enzima agisce in combinazione con GSH (*Figura 3*) e compete con la Catalasi per il perossido di idrogeno che funge da substrato per entrambi (Valko, et al., 2006).



*Figura 3. Reazioni catalizzate dagli antiossidanti enzimatici endogeni. (Barbagallo, 2005)*

### 1.3.2. Antiossidanti non enzimatici

La **Vitamina C** (Acido ascorbico) è uno dei più diffusi antiossidanti con la capacità di essere facilmente ossidato in acido deidroascorbico (Pisoschi, et al., 2015). Agisce in ambiente acquoso. Collabora con la Vitamina E per rigenerare il tocoferolo nelle lipoproteine e a livello di membrane (Valko, et al., 2006). È fondamentale nel cervello dove si comporta da cofattore della Dopamina beta-idrossilasi, partecipando alla biosintesi delle catecolamine; protegge inoltre i fosfolipidi di membrana dal danno ossidativo. Agisce eliminando la maggior parte dei ROS ma anche gli RNS prevenendo il decadimento delle biomolecole essenziali. Dobbiamo però prestare attenzione al fatto che, in presenza di metalli di transizione ha attività pro-ossidante (Pisoschi, et al., 2015).

La **Vitamina E** (alfa-tocoferolo) agisce contro la perossidazione dei lipidi di membrana ed è in grado di fermare la catena radicale trasformandola in un derivato a bassa reattività, proteggendo le membrane dai danni dei radicali liberi (Pisoschi, et al., 2015). Questa sostanza viene integrata in numerosi mangimi per ruminanti da latte, in quanto è risaputo che elevati dosaggi di vitamina E sono in grado di inibire i processi infiammatori specie mastiti e metriti.

Il **Selenio**, viene anch'esso implementato tramite appositi integratori nel mangime, in quanto aumenta l'attività della glutatione perossidasi, specie nel tessuto mammario, aumenta inoltre l'attività della SOD in tutti i tessuti tranne il rene (Pisoschi, et al., 2015).

#### **1.4 Effetti benefici di ROS e RNS**

I Radicali liberi svolgono importanti funzioni come messaggeri secondari in moltissime attività fisiologiche come la captazione del glucosio a livello muscolare, la secrezione di insulina glucosio indotta e sullo sviluppo fetale. (*Figura 4*).

Le cellule di un organismo comunicano tra loro e rispondono a stimoli attraverso meccanismi biologici di trasduzione del segnale (Poli, et al., 2004), i quali possono indurre varie attività biologiche come la contrazione muscolare, la crescita cellulare, la trasmissione nervosa e l'espressione genica (Thannickal, et al., 2000). Nonostante i ROS vengano spesso etichettati come dannosi per gli organismi, in realtà hanno importanti funzioni fisiologici nella segnalazione cellulare e nella regolazione intercellulare (Droge, 2002).

Nella maggior parte di cellule basse concentrazioni di ROS vengono generate in presenza di fattori di crescita, ormoni e citochine (Thannickal, et al., 2000), di conseguenza si è capito come i ROS riescano ad agire da messaggeri secondari in diversi livelli della cascata di trasduzione del segnale (Valko, et al., 2007).

Tantissime citochine e fattori di crescita sono noti per generare ROS nel momento in cui si legano al recettore specifico (Valko, et al., 2007), i recettori dei fattori di crescita sono recettori Tirocin-chinasici (RTK) che hanno ruolo fondamentale nella trasmissione dei messaggi sia a livello citoplasmatico che a livello nucleare (Neufeld, et al., 1999). I recettori delle citochine appartengono a differenti classi di recettori che agiscono su canali ionici o su G-Protein. TNF- $\alpha$ , IL-1 e IFN- $\gamma$  sono state fra le prime sostanze scoperte a generare ROS nelle cellule non fagocitiche (Chapple, 1997) con lo scopo di mediare importanti funzioni cellulari come la proliferazione o la morte programmata (Valko, et al., 2007).

L'ossido nitrico viene generato dall'ossido nitrico sintasi (NOS) presente in tre isoforme:

- NOS neuronale
- NOS Inducibile
- NOS endoteliale

Mentre l'isoforma neuronale e l'endoteliale sono presenti in forma costitutiva e vengono regolati dalla concentrazione a livello intracellulare di calcio, l'inducibile viene espresso a livello macrofagico a seguito di stimolazione da parte dei lipopolisaccaridi, delle citochine e di altri agenti.

Lo scoppio ossidativo è caratterizzato da una massiccia produzione di ROS in un contesto infiammatorio da parte di cellule come neutrofili e macrofagi attivati, con lo scopo di difesa dagli agenti patogeni. In particolare, in ambiente infiammatorio queste cellule producono un'enorme quantità di ROS grazie all'enzima macrofagico NAD(P)H ossidasi (Keisari, et al., 1983) il quale è talmente efficace da produrre perossido di idrogeno fino ad un valore di 10-100 M. queste cellule, in oltre, se stimolati sono in grado di produrre anche ossigeno singoletto da reazioni che coinvolgono sia la NAD(P)H ossidasi che la mieloperossidasi (Valko, et al., 2007).

Oltre a quelle citate prima, anche altre cellule come fibroblasti, cellule della muscolatura liscia vasale e miociti cardiaci, producono ROS a partire dall'enzima NAD(P)H ossidasi con lo scopo di regolare la cascata di segnalazione intercellulare (Jones, et al., 1996) (Thannickal, et al., 1995). A differenza dei neutrofili queste cellule producono un terzo di ROS e principalmente per via intracellulare (Valko, et al., 2007).

Per quanto riguarda le cellule cardiache e vascolari, su stimolazione di fattori di crescita, producono ROS con lo scopo di attivare le vie intracellulari multiple di segnalazione; di conseguenza i ROS hanno ruolo di regolazione del funzionamento di queste cellule (Greindling, et al., 2000). L'angiotensina II, trombina, TNF- $\alpha$  e PDGF stimolano e incrementano la formazione di superossido mediata da NAD(P)H nelle cellule lisce dei vasi sanguigni, inoltre angiotensina II, TNF- $\alpha$  e IL-1 stimolano la formazione del superossido all'interno dei fibroblasti (Valko, et al., 2007).

L'enzima Guanilato ciclasi, viene attivato sia da NO che da perossido di idrogeno (Ignarro, et al., 1985) (Wolin, et al., 1999), questo enzima catalizza la formazione del GMPc utilizzato come amplificatore intracellulare in moltissime risposte fisiologiche, in particolare modula la funzione delle chinasi proteiche, dei canali ionici, della regolazione del tono della muscolatura liscia vasale e dell'inibizione di adesione delle piastrine (Valko, et al., 2007).



Anche la risposta immunitaria, attivata dai patogeni ambientali, è regolata dai ROS, in particolare l'attivazione dei Linfociti T viene incrementata e migliorata dall'azione dei ROS, così come la produzione di IL-2 (Valko, et al., 2007).

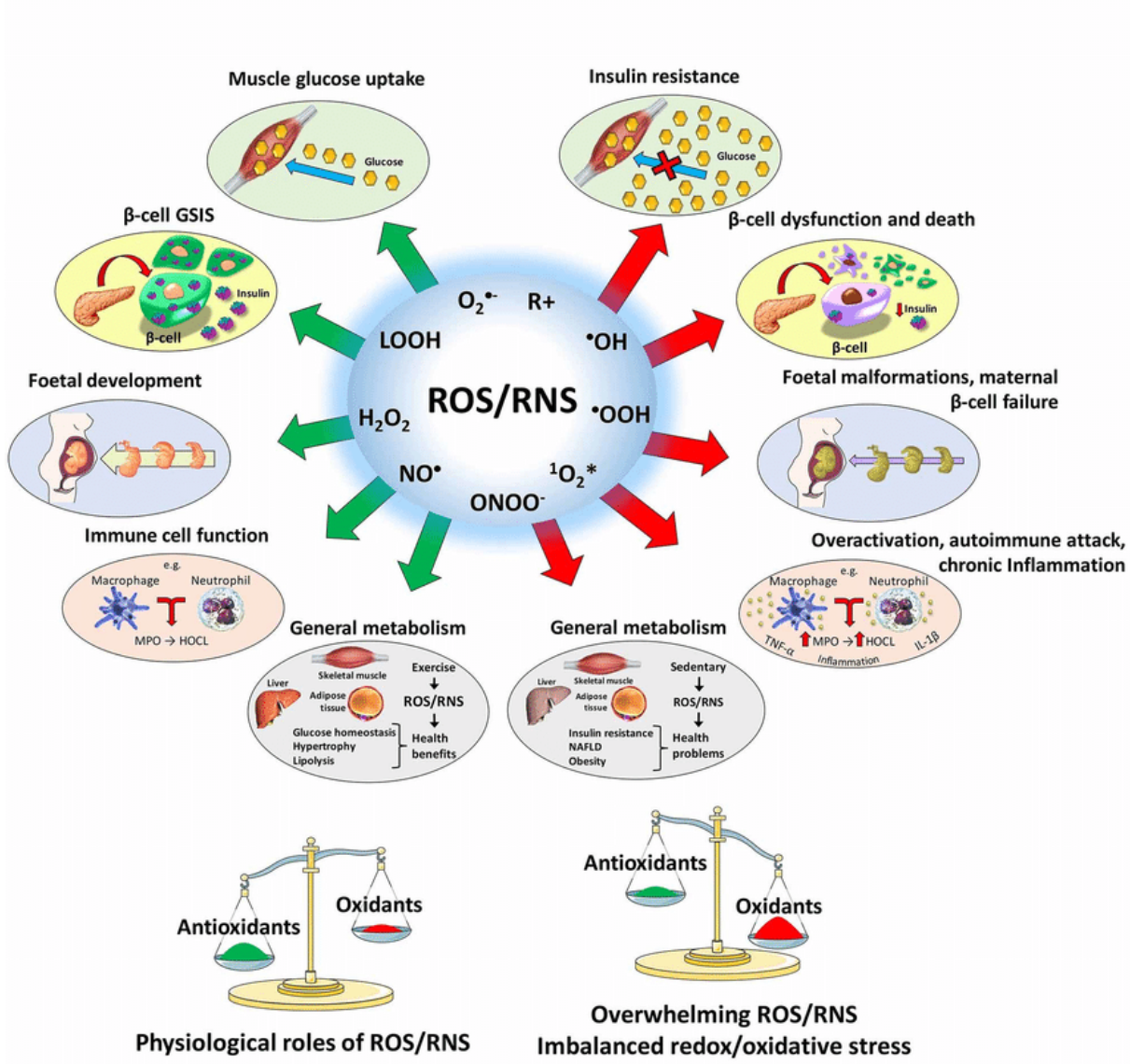


Figura 4. Immagine riassuntiva dei principali effetti dei radicali liberi (Newesholme, 2016)



## **2. Stress ossidativo e produzione di latte**

L'allevamento della capra da latte è uno dei più antichi che esistano, se ne trova traccia già in Persia attorno al 10000 a.C. dove gli animali venivano allevati per il latte, la carne e la pelle. Essendo un animale ben adattabile in varie condizioni, l'allevamento prese piede in Medio Oriente dove si diffuse fra Babilonesi, Assiri ed Egizi, arrivando in Africa e in Europa nel VII secolo a.C. Fra i Greci la capra era una risorsa fondamentale per i ceti meno abbienti, i Romani apprezzavano molto le loro carni e i loro latticini. Nel '700 l'allevamento della capra venne sostituito pian piano da quello bovino sia per l'enorme differenza produttiva sia per l'imposizione di divieto di pascolo per ovini e caprini nei boschi cedui vista la loro importanza (De Luca, 2007).

Nell'ultimo ventennio, l'allevamento della capra da latte a scopi produttivi sta prendendo sempre più piede. Attualmente esistono realtà molto diverse fra loro: da una parte abbiamo grandi allevamenti intensivi nati a partire dagli anni '70 e dall'altra abbiamo greggi di animali allevati in maniera estensiva sfruttando il più possibile il pascolo e la transumanza.

La modalità e le tecnologie di allevamento hanno preso spunto in gran parte dall'allevamento bovino da latte, sia per quanto riguarda l'organizzazione degli edifici e degli spazi, sia per la gestione e la mungitura degli animali. Negli anni si è capito che per alcuni aspetti capre e vacche hanno esigenze comuni, ma per altri hanno esigenze ben differenti ed è per questo che sono stati necessari alcuni cambiamenti che hanno permesso di aumentare il benessere animale e la produttività.

### **2.1 Cenni sull'allevamento delle capre da latte**

Analogamente alla vacca da latte, gli allevamenti caprini da latte possono essere di tipo intensivo, dove gli animali vengono allevati esclusivamente stabulati e a cui viene somministrata una razione bilanciata di fieni e concentrati, di tipo estensivo, dove gli animali vengono allevati esclusivamente all'aperto sfruttando i pascoli, e infine di tipo semi-intensivo, dove gli animali vengono stabulati la notte e nel periodo invernale e condotti al pascolo per una parte della giornata dalla primavera all'autunno così che possano usufruire dell'erba fresca (*Figura 5*).

Anche la vita produttiva della capra viene suddivisa in alcune fasi:

- Parto e prime cure ai neonati
- Svezamento

- Lattazione
- Gestione del periodo delle monte
- Gravidanza e asciutta



*Figura 5. Gregge di capre di razza Camosciata delle alpi al pascolo. (Foto personale)*

### **2.1.1 Parto e prime cure al neonato**

Fisiologicamente, i parti delle capre avvengono nel periodo gennaio-marzo. Il momento del parto per l'animale rappresenta un evento stressogeno per questo è indispensabile fare in modo che gli animali si trovino nelle condizioni ottimali. Il box parto deve essere progettato in un luogo tranquillo della stalla, ben illuminato, ventilato ma non esposto a correnti d'aria, deve essere ampio per consentire il corretto movimento della futura madre e con abbondante paglia pulita (Figura 6); (De Luca, 2007).



*Figura 6. Capra e capretti neonati nel box parto (Foto personale)*

Durante la fase dilatativa, la capra inizia a mostrarsi più irrequieta, a scavare con gli anteriori nella paglia come a crearsi una sorta di nido, la vulva si presenta edematosa e la mammella si fa più turgida e aumentata di volume. A questa segue la fase espulsiva in cui si ha la rottura delle acque con la comparsa del sacco amniotico, che ha la funzione di lubrificare il canale del parto, e successivamente del sacco contenente il capretto. Terminata la fase espulsiva, è fondamentale controllare che il capretto respiri e sia vitale e che si nutra del colostro, inoltre, entro sei ore dal parto deve completarsi il secondamento, cioè l'espulsione della placenta e degli invogli fetali.

### 2.1.2 Allevamento della rimonta: svezzamento



Figura 7. Capretti in box collettivo post-svezzamento (Foto personale)

Lo svezzamento rappresenta una fase molto delicata in quanto influenza la vita adulta e la produttività futura dell'animale. Vengono selezionate le femmine e i maschi migliori da tenere come riproduttori (*Figura 7*), questa fase mi porterà ad avere a sei mesi di vita animali con uno sviluppo corporeo tale da renderli in grado di riprodursi e di portare a termine una gravidanza.

Dal punto di vista pratico, lo svezzamento avviene in maniera graduale introducendo il mangime e il fieno insieme alla dieta lattea per poi arrivare a sostituire completamente quest'ultima quando i capretti si alimentano correttamente con la dieta proposta.

### 2.1.3 Lattazione

Questa fase inizia dal momento del parto e si protrae per circa 8-10 mesi fino a quando l'animale, ormai gravido di 3 mesi, viene messo in asciutta in preparazione al parto successivo.

Nei primi 6 giorni post partum il secreto prodotto dalla ghiandola mammaria non è latte ma bensì colostro, che, come abbiamo già detto in precedenza, è fondamentale per i neonati, i quali nascono privi di sistema immunitario.

Così come nella bovina, anche nella capra la curva di lattazione si comporta in maniera simile. Abbiamo una prima fase di crescita dove la quantità di latte prodotto aumenta ogni giorno fino ad arrivare al *picco di lattazione* che si aggira attorno al novantesimo giorno. Da questo momento in poi parte una fase di decrescita in cui la produzione cala a mano a mano fino ad arrivare alla messa in asciutta.

La mungitura viene effettuata due volte al giorno ad intervalli di tempo regolari, indicativamente fra le 10 e le 12 ore. Può essere effettuata manualmente o meccanicamente attraverso veri e propri impianti di mungitura simili in tutto e per tutto a quelli utilizzati nell'allevamento bovino. Una corretta routine di mungitura è fondamentale per avere una buona sanità della mammella ed evitare mastiti. Per prima cosa viene effettuato il "*Pre-dipping*" (*Figura 8*) dove le mammelle vengono deterse con prodotti disinfettanti e asciugate con carta assorbente, successivamente si eliminano i primi schizzi di latte, i quali hanno carica batterica elevata, si procede poi con l'attacco del gruppo di mungitura. A fine mungitura il gruppo viene staccato e viene effettuato il "*Post-dipping*" dove la mammella viene trattata con un prodotto disinfettante e filmante che consente al dotto di richiudersi correttamente ed evitare l'ingresso di patogeni.



*Figura 8. Procedura di pre-dipping (Foto personale)*

#### **2.1.4 Gestione delle monte**

Le capre vengono definiti animali poli-estrali stagionali a fotoperiodismo negativo. Hanno più manifestazioni estrali durante la loro stagione di monta, la quale è influenzata dalle riduzione delle ore di luce in una giornata e dell'aumento delle ore di buio; la stagione riproduttiva va quindi da agosto ad ottobre.

La rimonta raggiunge la pubertà attorno ai 6 mesi di vita ed è influenzata dall'alimentazione somministrata, generalmente le caprette vengono fatte ingravidare al raggiungimento dei 30-35 kg di peso corporeo o comunque al 60% del peso corporeo da adulto, in modo da consentire un completo sviluppo della struttura corporea dell'animale per supportare una gravidanza.

Le manifestazioni estrali sono generalmente ben evidenti. Il becco viene reintrodotta nel gregge verso la fine dell'estate dopo un periodo di separazione, esso rilascia ferormoni che stimolano nella femmina un picco di LH, il quale provoca l'ovulazione; questo fenomeno viene indicato con il termine "effetto becco".

La fecondazione può essere sia naturale che artificiale, per la prima si calcola un rapporto di un maschio ogni venti femmine. Per una corretta gestione del periodo dei parti, è fondamentale annotare la data di monta così da poter calcolare una presunta data di parto.

È bene ricontrollare periodicamente gli animali per verificare eventuali ritorni in estro, è consigliato inoltre effettuare diagnosi di gravidanza tramite ecografia trans-rettale a circa 30-35 giorni dall'accoppiamento, mentre per via trans-addominale a circa 60 giorni.

### **2.1.5 Gravidanza e asciutta**

La gravidanza nella capra ha una durata di 145-155 giorni, durante l'ultimo mese di gestazione si ha il maggior accrescimento dei feti, di conseguenza l'animale avrà un fabbisogno energetico più alto; notiamo inoltre ingrossamento delle mammelle.

Secondo letteratura l'asciutta ha una durata di 60 giorni prima e solitamente coincide con gli ultimi due mesi di gestazione. Questa fase è fondamentale per consentire all'organismo di recuperare le energie cedute durante la precedente lattazione e a formare riserve in vista della lattazione futura, inoltre consente una corretta rigenerazione del tessuto mammario. Per la messa in asciutta, oltre a ridurre il numero e la frequenza di mungitura, viene cambiata completamente l'alimentazione, andando a diminuire l'energia apportata riducendo i concentrati e somministrando fieno fibroso.

In asciutta vengono effettuati eventuali trattamenti anti parassitari ed eventuali richiami vaccinali.

## **2.2 Alimentazione nelle varie fasi produttive**

La specie caprina viene considerata intermedia fra erbivori pascolatori, che prediligono i foraggi voluminosi e grossolani, ed i selettori di concentrati che non tollerano elevati quantitativi di fibra e vanno naturalmente a selezionare le parti meno fibrose e più proteiche delle piante (Papachristou, 1994).

Anche i caprini sono ruminanti, hanno quindi 3 prestomaci, Reticolo, Rumine e Omaso, e uno stomaco ghiandolare, l'Abomaso.

Per una corretta gestione degli animali è fondamentale curare ogni singolo dettaglio dell'alimentazione ma soprattutto regolarla in base alla fase produttiva in cui si trova l'animale.

Partendo dalla femmina adulta, possiamo distinguere quattro momenti essenziali:

- Immediato Post-partum
- Picco di Lattazione
- Fine Lattazione
- Messa in asciutta



- Ultimo mese di gravidanza

Se durante la gravidanza è stata somministrata un'alimentazione corretta, l'animale avrà una condizione corporea che le consentirà di arrivare al parto e all'inizio lattazione con un BCS adeguato al periodo. Il BCS è un indice che mi consente di valutare lo stato di ingrassamento corporeo, al parto deve essere attorno ai 2,25-2,50 per diventare poi da 1,5 -1,75 nell'immediato post partum (De Luca, 2007).

Per quanto riguarda l'alimentazione si parte somministrando fieno di primo taglio di buona qualità ad libitum. Dobbiamo somministrare una buona quota di proteine che mi consentiranno una buona montata latte, queste posso somministrarle in parte con fieno di Erba medica e in parte con concentrati con livello proteico attorno al 16%. La quantità di concentrati da somministrare varia in base alla produzione latte e va da 500g/capo/giorno a 1 kg/capo giorno per animali con produzioni superiori ai 3 litri; se non è compresa nel mangime scelto è bene somministrare una corretta integrazione vitaminico-minerale.

Dal picco di lattazione a fine lattazione la razione rimane stabile, è possibile integrare erba fresca sfalciata o tramite il pascolo (*Figura 9*), durante la stagione estiva per fronteggiare lo stress da caldo esistono formulazioni contenenti lieviti.

Dal mese precedente alla stagione delle monte, per favorire un aumento del tasso ovulatorio, viene effettuato il cosiddetto *Flushing*, che consiste nell'aumentare la quota energetica della razione, aggiungendo ad esempio avena intera; questo favorirà inoltre l'aumento del tasso di concepimento ed è bene effettuarlo anche sul becco.

All'inizio della messa in asciutta degli animali si deve ridurre la quota proteica e l'apporto energetico e si deve somministrare fieno di graminacee fibroso facilitando il fisiologico calo di produzione. Durante la fase di asciutta si segue un'alimentazione di mantenimento che consente agli animali di non perdere peso ed un'integrazione vitaminico minerale con dose doppia rispetto alla lattazione per fare in modo che gli animali arrivino all'ultimo mese di gravidanza con buone riserve per la formazione del colostro e per il feto.

Nell'ultimo mese di gravidanza i fabbisogni degli animali aumentano notevolmente, in quanto i feti in questo periodo crescono in maniera esponenziale, è anche vero però che crescendo così tanto diminuiscono la capacità di ingestione materna, motivo per cui gli alimenti in questa fase devono essere di ottima qualità. Dai quindici ai venti giorni prima del parto, attraverso lo “*Steaming-up*”, si riabituva il ruminante della capra all'alimentazione che dovrà assumere in lattazione attraverso la reintroduzione graduale dei concentrati.



*Figura 9. Capra al pascolo (Foto personale)*

## 2.3 Stress ossidativo e Mastiti

### 2.3.1 Introduzione

La mastite è una delle principali patologie degli allevamenti da latte che provoca ogni anno enormi perdite economiche nel settore lattiero caseario Bovino e Ovi-caprino.

Con il termine mastite si intende l'infiammazione della ghiandola mammaria, questa patologia può presentarsi in forma:

- **Clinica:** in cui è presente la manifestazione clinica della patologia, la mammella è fortemente infiammata con quarti edematosi, caldi e dolenti e con secreto alterato e con coaguli di fibrina. A sua volta può presentarsi in forma:
  - **Acuta:** manifestazioni cliniche locali e sistemiche con febbre, anoressia, ottundimento del sensorio, forte dolore e secreto mammario fortemente alterato.

- **Cronica:** la vacca apparentemente è sana ma il quarto/ i quarti colpiti sono atrofici con secreto fortemente alterato e in quantità ridotta.
- **Sub-clinica:** in cui non sono presenti alterazioni della clinica dell'animale e apparentemente nemmeno del secreto se non per un aumento del numero delle cellule somatiche.

Le mastiti sono causate dall'azione di alcuni batteri che possiamo raggruppare in due classi:

- **Batteri Mastitogeni:** batteri che vivono bene nella mammella e sono responsabili delle cosiddette **Mastiti Contagiose**.
- **Batteri non Mastitogeni:** batteri che normalmente non vivono nella mammella ma nel momento in cui riescono ad entrare sono responsabili delle **Mastiti Ambientali**.

In corso di mastite si parla di aumento del numero di cellule somatiche nel latte. Questo parametro è di fondamentale importanza tanto che nel regolamento europeo 853/2004 viene stabilito per il latte vaccino un tenore di cellule somatiche al di sotto del quale deve stare il latte per poter essere considerato idoneo al consumo di alimenti.

Per quanto riguarda il latte caprino, nel corso degli anni si è tentato di stabilire una soglia ma data la fisiologia della ghiandola mammaria è stato impossibile (Barth, et al., 2010).

La ghiandola mammaria nella capra ha secrezione apocrina, per questo motivo è fisiologico trovare particelle citoplasmatiche che provengono dalla porzione apicale delle cellule secernenti, le quali hanno dimensioni simili alle cellule somatiche. È fisiologico, quindi che nel latte ovi-caprino sano siano presenti un numero più elevato di cellule somatiche rispetto al latte bovino (Novac, et al., 2020).

Nel latte caprino proveniente da una mammella sana, si riscontra una percentuale di neutrofili che varia dal 45 al 74 % delle cellule somatiche del latte, inoltre dal 9 al 20 % è rappresentato dai linfociti e dal 15 al 41 % dai macrofagi; nelle mammelle infette i neutrofili aumentano, mentre i linfociti e i macrofagi si riducono (Paape M.J., et al., 2001). Grazie a queste caratteristiche si pensa che gli animali con un numero elevato di cellule somatiche nel latte siano più resistenti alle patologie mammarie rispetto a quelli che le hanno più basse, questo grazie all'azione protettiva dei neutrofili sulla mammella.

Sulla scorta queste considerazioni, l'aumento delle cellule somatiche nel latte caprino può essere influenzato sia da fattori infettivi, ad esempio mastiti batteriche, che da fattori non infettivi i quali si dividono in intrinseci, dipendono dallo stadio di lattazione, dalla razza e dal tempo di mungitura, e fattori estrinseci che dipendono dal tipo di mungitura, dalla stagione e dalle condizioni di allevamento (Jiménez-Granado, et al., 2014).

### **2.3.2 Mastite e produzione di latte**

La mastite ha conseguenze negative sulla produzione di latte sia per quanto riguarda la quantità prodotta, che per la qualità, la quale influisce sulla caseificazione. Questa patologia provoca lesioni al parenchima mammario, la cui gravità dipende dal decorso e dall'insorgenza della patologia, oltre che dall'agente patogeno che causa l'infezione stessa. (Novac, et al., 2020).

Parlando più nel dettaglio degli effetti che la mastite ha sulla quantità di latte prodotto, dobbiamo evidenziare che, nonostante le mastiti cliniche provochino riduzione del consumo di mangime, disturbi della digestione e riduzione della quantità di sangue che arriva alla mammella, non hanno maggior influenza sulla quantità rispetto a quelle sub-cliniche.

Spesso si pensa che il calo produttivo sia dovuto esclusivamente alla distruzione delle cellule dell'alveolo mammario, in realtà non è l'unica causa, bensì l'accumulo di neutrofili all'interno dei dotti mammari, provoca ipertrofia dell'epitelio e marcata espressione del tessuto connettivo, di conseguenza si ha restringimento del lume dei dotti, il quale provoca blocco del flusso del latte.

### **2.3.3 Effetti sui parametri qualitativi**

È noto che, in corso di mastite, nel latte aumentano le concentrazioni di siero proteine, di albumine e di IgG; aumenta inoltre la concentrazione della lattoferrina, proteina con spiccata attività batteriostatica (Leitner, et al., 2004) (Le Maréchal, et al., 2011).

In condizioni fisiologiche, nel latte caprino abbiamo una concentrazione di caseine che varia dai 16 ai 26 g/L e quella presente in maggior quantità è la  $\beta$ -caseina (Park, et al., 2007).

È noto che le infezioni batteriche provochino modificazioni profonde nella struttura delle micelle di caseina, le quali possono subire dei processi di proteolisi da parte di enzimi endogeni ed esogeni (Gideon, et al., 2011) (Gideon, et al., 2013). In corso di mastite, l'azione degli enzimi del sangue aumenta, in particolare aumenta l'attività della Plasmina,

responsabile della degradazione della fibrina e di vari componenti della matrice extracellulare. A livello mammario la Plasmina provoca idrolisi delle caseine, in particolar modo idrolizza la  $\beta$ -caseina, scindendola in vari sottotipi di  $\gamma$ -caseine, proteasi e peptoni, i quali a loro volta determinano diminuzione della curva di lattazione;  $\alpha$  e  $\kappa$  caseine non sono influenzate da questo fenomeno.

Associati alla degradazione di questi composti, abbiamo anche un elevato numero di cellule somatiche e un aumento del numero di neutrofili. Questi ultimi sono la principale fonte di enzimi proteolitici come la plasmina, l'elastasi o la catepsina B responsabili dell'idrolisi delle caseine (Olumee-Shabon, et al., 2013).

Alcuni batteri, in particolare *E.Coli*, *Str. Uberis* e *Str. Agalactiae*, inducono apoptosi cellulare e necrosi dell'epitelio mammario specialmente se causano mastite grave. *E.Coli*, inoltre, produce un elevato numero di enzimi proteolitici, i quali contribuiscono alla degradazione della matrice extracellulare (Zhao, et al., 2008).

Fra i carboidrati presenti nel latte, il principale è il lattosio con un contenuto medio nel latte caprino del 4,16% (più basso rispetto al latte vaccino). Contiene inoltre, oligosaccaridi, i quali svolgono ruolo prebiotico stimolando la moltiplicazione della flora intestinale (Ranadheera, et al., 2019) (Silanikove, et al., 2010), glicopeptidi e glicoproteine. In corso di mastite sub-clinica, a causa dell'attività della Plasmina, si ha riduzione del contenuto di lattosio in tutti i ruminanti da latte (Novac, et al., 2020).

I Lipidi rappresentano la componente più importante, in quanto conferiscono sapori specifici sia al latte stesso che ai prodotti lattiero caseari, in particolar modo per il latte di capra. Sono presenti sotto forma di globuli di grasso che, nel caso specifico del latte caprino, sono di dimensioni inferiori rispetto a quello vaccino (Park, et al., 2007) rendendolo più digeribile e adatto a pazienti con intolleranze alimentari o particolari allergie (Haenlein, 2004). Il latte di capra ha un contenuto medio di lipidi che si aggira attorno al 4,5% ed è influenzato dalla razza, dallo stadio di lattazione, dalla stagione e dall'alimentazione degli animali; caratteristico della specie caprino è l'elevata percentuale di acidi grassi a catena corta e media (Silanikove, et al., 2010) (Yadav Kuvar, et al., 2016). Per quanto riguarda gli effetti che la mastite ha su questi componenti, sussistono pareri contrastanti. Uno studio dimostra che nella capra in corso di mastite il tenore lipidico diminuisce (Goetsch, et al., 2011), un'altra ricerca mette in evidenza che la quantità di lipidi non differisce significativamente dal latte di una mammella sana (Leitner, et al.,

2004) (Min, et al., 2007) (Kumar, et al., 2019); nell'interpretare questi risultati occorre tuttavia considerare lo stadio di lattazione in cui si trovano gli animali, in quanto è fisiologico un aumento del tenore lipidico a fine lattazione (Goetsch, et al., 2011) (Leitner, et al., 2004).

#### **2.3.4 Effetti sugli enzimi**

Nel latte sono presenti circa sessanta enzimi che svolgono un ruolo importante nella regolazione della lattogenesi e nella difesa antiossidante e immunitaria della mammella (Andrei, et al., 2016). Il latte è formato da diverse componenti miscelate fra loro, in particolare: siero del latte, micelle di caseina, globuli di grasso e cellule di sfaldamento dell'epitelio (Silanikove, et al., 2006). Associate a queste componenti si riscontrano specifici gruppi di enzimi la cui distribuzione è strettamente legata alla modalità di secrezione di essi.

Come già precedentemente accennato la mastite provoca cambiamenti all'interno della ghiandola mammaria, specie nel trasporto ionico, ed incremento degli enzimi plasmatici che aumentando la permeabilità si concentrano nella mammella e invasione da parte dei fagociti (Novac, et al., 2020). Nel momento in cui si instaura la patologia, l'attività di alcuni enzimi endogeni aumenta, mentre l'attività degli enzimi coinvolti nella lattogenesi diminuisce (Pyörälä, 2003).

In corso di mastite, si osserva un aumento della produzione di cellule polimorfonucleate e aumento di cellule somatiche; le prime in particolare secernono enzimi idrolitici.

Gli enzimi possono essere lisosomiali, come la  $\beta$ -galattosidasi, N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasi e la  $\beta$ -glucuronidasi, oppure non lisosomiali come la lattato deidrogenasi.

La lattato deidrogenasi ha il compito di mediare la connessione ossidativa/riduttiva tra piruvato e acido lattico (Larsen, 2005). In corso di mastite, questo enzima subisce un aumento significativo nel latte (Chagunda, et al., 2006) (Batavani, et al., 2007) ed è correlato alla distruzione dell'epitelio mammario. L'aumento di questo enzima si ha anche nell'immediato post partum e aumenta con l'aumentare delle lattazioni, inoltre anche l'attività di batteri fortemente patogeni, portano ad un marcato aumento dell'LDH (Stuhr, et al., 2013). Nei piccoli ruminanti, tenendo conto del numero di lattazioni e della fase di lattazione in cui si trovano gli animali, può essere utilizzato a scopo diagnostico misurandolo attraverso sistemi di spettrofotometria a fluorescenza (Novac, et al., 2020).

N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasi aumenta la sua concentrazione una volta che il processo infiammatorio è iniziato, origina dai macrofagi e dai neutrofili a seguito di lisi cellulare. Ha effetto battericida in quanto catalizza reazioni cellulari fondamentale in aiuto al sistema immunitario. Anche questo enzima può essere utilizzato a fini diagnostici e viene anch'esso rilevato tramite spettrofotometria (Stuhr, et al., 2013).

L'enzima  $\beta$ -glucuronidasi è un importante indicatore di infiammazione della mammella specie se correlato al tenore di cellule somatiche e al risultato del Californian Mastitis Test (CMT) (Oliszewski, et al., 2002). La sua azione non è correlata allo stadio di lattazione ma sembra essere influenzata positivamente dall'attività sinergica con altri enzimi (Novac, et al., 2020).

### **2.3.5 Stress ossidativo e mastite**

In corso di mastite abbiamo un'accentuata perossidazione lipidica che porta ad un calo dei sistemi antiossidanti sia nel sangue che nel latte con insorgenza di stress ossidativo.

Più nel dettaglio le mastiti, sia cliniche che sub-cliniche, sono associate non solo allo stress ossidativo ma anche a quello nitrossidativo, inoltre le infezioni mediate da batteri portano ad un marcato aumento di NO, nitriti e nitrati sia nel sangue che nel latte (Andrei, et al., 2016).

Durante le infezioni le cellule immunitarie generano ROS con attività antibatterica, dobbiamo considerare però che i microrganismi patogeni utilizzano dei loro sistemi antiossidanti che gli consentono di resistere in condizioni di stress ossidativo (Andrei, et al., 2011).

Nel latte abbiamo sistemi antiossidanti che hanno un ruolo di prevenzione soprattutto nei confronti della perossidazione lipidica e nel mantenimento della sua qualità. Questi sistemi sono composti da enzimi come la lattoperossidasi, la glutatione perossidasi e la xantina ossidasi e da composti non enzimatici come vitamine e provitamine (Novac, et al., 2020).

Le infezioni mammarie sono caratterizzate da una riduzione dell'attività antiossidante (Silanikove, et al., 2014) (Celi, 2010), fra gli enzimi ricordiamo anche la presenza della catalasi, la quale si occupa di degradare il perossido di idrogeno e l'ossido nitrico e la cui attività dipende da diversi fattori come la dieta dell'animale, l'allattamento e la presenza di mastiti. Nel latte crudo vaccino l'attività della catalasi è pari a 1,96 U/ml; nella capra è stato dimostrato che il valore fisiologico della catalasi nel latte è pari a 3,8 U/ml

(Silanikove, et al., 2014). La funzione della catalasi sull'ossido nitrico è fondamentale nel periodo che intercorre fra una mungitura e l'altra quando il latte staziona all'interno della cisterna mammaria (Silanikove, et al., 2009).

La lattoperossidasi ha attività batteriostatica e battericida ed è considerata parte del sistema immunitario della mammella, insieme alla xantina ossidasi ha azione importante di prevenzione delle infezioni mammarie (Silanikove, et al., 2005) (Silanikove, et al., 2006). Questo enzima aumenta lo stress ossidativo e nel latte di capra aumenta per l'elevato numero di cellule somatiche e neutrofili. LPX può quindi essere utilizzata a scopo diagnostico per rilevare le mastiti sub-cliniche nelle capre, anche se l'interpretazione dei dati ottenuti va correlata alle quantità fisiologiche di cellule somatiche e di conseguenza di LPX delle capre. Questo enzima è stabile termicamente quindi può essere ricercato e trovato anche nel latte pastorizzato (Novac, et al., 2020).

La glutatione perossidasi è un altro enzima che ha la funzione di proteggere le cellule dagli effetti dei composti ossidanti. Il sito attivo dell'enzima contiene selenio-cisteina, questa particolarità ci consente di distinguere due tipi di GPx: dipendente dal Selenio, con capacità di degradare il perossido di idrogeno, e indipendente dal Selenio. Anche nel latte di capra come in quello vaccino i livelli di questo enzima aumentano così come per gli altri visti in precedenza (Novac, et al., 2020).

La xantina ossidoreduttasi è presente in due forme: xantina deidrogenasi (XDH) e xantina ossidasi (XO). XO è considerato parte del sistema immunitario della mammella insieme a LPX e NO, in quanto si occupa di convertire nitrato in nitrito e aumentare di conseguenza l'ossido nitrico (Novac, et al., 2020).

Anche la superossido dismutasi nel latte è fondamentale per il mantenimento dell'equilibrio antiossidante. Nelle capre il periodo post-partum influenza l'attività del SOD nel latte, in particolare nelle prime tre settimane di lattazione i livelli di questo enzima sono bassi in quanto non abbiamo una forte attività ossidante. A partire da un mese di lattazione, i livelli di sostanze ossidanti iniziano ad aumentare e di conseguenza anche la SOD (Novac, et al., 2020).

Quelle citate in precedenza appartengono alla classe delle sostanze antiossidanti enzimatiche, esistono tuttavia anche sostanze antiossidanti non enzimatiche.

Fra queste abbiamo l'acido ascorbico o Vitamina C, il quale viene sintetizzato dalle piante e dalla maggior parte degli animali. Nel latte di capra è presente in quantità maggiore



rispetto al latte vaccino e la quantità si aggira attorno a 1,29 mg/100g (Park, et al., 2007). La quantità di questa sostanza diminuisce durante i processi patologici in quanto viene consumata durante i processi ossidativi (Andrei, et al., 2016). In media nel tessuto mammario di una capra sana il valore è superiore di circa il 36% rispetto ad una mammella affetta da mastite (Silanikove, et al., 2014).

Il latte di capra contiene inoltre 0,04 mg/100g di Vitamina E, la cui concentrazione dipende dalla dieta, dalla stagione e dalla fase di allattamento (Park, et al., 2007), anch'essa ha un ruolo essenziale nella difesa antiossidante, in particolare l'integrazione di questa (Valko, et al., 2007) sostanza nella razione sembra essere un'importante forma di prevenzione delle patologie mammarie.

La vitamina A è una vitamina liposolubile che troviamo negli organismi in tre forme: retinolo, acido retinico e acido retinoico. Il latte di capra ha un contenuto di questa sostanza pari a 185 UI/100g (Park, et al., 2007). Fra queste sostanze, i carotenoidi in particolare hanno funzione antiossidante e immunostimolante e durante le infezioni mammarie diminuiscono (Novac, et al., 2020).

Per valutare l'attività delle sostanze antiossidanti, sono stati sviluppati dei protocolli che misurano la capacità antiossidante totale (TAC) e lo status antiossidante totale (TAS).

Il TAC viene determinato attraverso due modalità:

1. Trasferimento di Idrogeno
2. Trasferimento di elettroni

In condizioni fisiologiche, il TAC nel latte caprino è più elevato rispetto ai valori nel latte sano di altri mammiferi come il bovino, la pecora, l'asino e il bisonte. Abbiamo già visto che è influenzato dalla stagione, dalla razza e dalla dieta. Nel latte di vacche affette da mastite il valore del TAC è decisamente più basso rispetto alle condizioni fisiologiche, questo porta ad accumulo di ROS e all'insorgenza di stress ossidativo; stessa considerazione è stata fatta sulle capre (Novac, et al., 2020).

## **2.4 Stress ossidativo e periparto**

Il periparto, o periodo di transizione, è il periodo che va da ventuno giorni prima a ventuno giorni post-partum. In questo delicato momento, gli animali da latte passano da una fase in cui il metabolismo lavora in mantenimento ad una fase in cui si ha una rapida richiesta energetica da parte dell'organismo per la crescita dei feti prima e per la produzione di

latte poi, nello stesso momento l'ingestione di alimento si riduce per l'ingombro creato dall'utero gravido e per la fluttuazione dell'appetito stesso e i cambiamenti che si verificano a livello ormonale e mammario.

Questo aumento del fabbisogno associato ad una ridotta ingestione porta ad una condizione di bilancio energetico negativo. L'organismo mobilita le riserve adipose per produrre energia, il fegato però non è in grado di far fronte alle richieste e per questo motivo aumenta l'incidenza di patologie metaboliche (Miller, et al., 1993) come la steatosi epatica o la chetosi.

In questo periodo, abbiamo livelli variabili di stress ossidativo (Bernabucci, et al., 2005), influenzato anche dalla stagione e dall'alimentazione somministrata (Bernabucci, et al., 2002). Nella bovina da latte, razioni con elevati livelli di amido, sembrano essere responsabili di questa condizione probabilmente a causa di cambiamenti cellulari legati alla fosforilazione ossidativa (Gabai, et al., 2004).

Parlando nello specifico dei caprini, l'adozione di metodi di allevamento di tipo intensivo per avere maggiori produzioni di latte, ha reso gli animali più suscettibili alle malattie metaboliche (Rubino, et al., 1995). Sulla base di studi condotti sulla bovina (Bernabucci, et al., 2005) (Sordillo, et al., 2007), anche nella capra il cambiamento del substrato metabolico, dovuto alla mobilitazione delle riserve, e l'attivazione del metabolismo, a seguito dell'aumento della richiesta di energia, aumentano i livelli di stress ossidativo (Celi, et al., 2010).

L'omeostasi viene mantenuta grazie all'equilibrio fra sistemi antiossidanti e fattori ossidanti, di conseguenza se aumentano i radicali liberi dovrebbero aumentare anche i sistemi di difesa endogena. Quello che invece si verifica durante il periodo di transizione, è un aumento della concentrazione di sostanze pro-ossidanti e una diminuzione dei sistemi di difesa (Celi, et al., 2010).

Nel dettaglio, in questo periodo aumentano le concentrazioni di ROM, considerati indicatori della produzione di radicali liberi (Miller, et al., 1993), e diminuisce l'attività di SOD, il quale dipende dalla quantità di perossido prodotto, GPx, catalasi oltre che dalla disponibilità di glutathione (Frei, 1994) e dei gruppi SH. Questi derivano dalle albumine e grazie alle loro proprietà riducenti svolgono un ruolo fondamentale come sistema antiossidante; anch'essi si riducono notevolmente durante il periparto a causa delle precarie condizioni epatiche.

## 2.5 Stress ossidativo e stress da caldo

Il cambiamento climatico, caratterizzato dalla sommatoria dell'effetto serra antropico con l'effetto serra naturale, rappresenta una delle sfide principali di questo secolo con evidenti ripercussioni negli animali zootecnici. Le condizioni ambientali sono difatti in grado di influenzare direttamente ed indirettamente non solo lo stato di salute e la sopravvivenza degli animali, ma anche la loro attività produttiva e riproduttiva (Quintavalla, et al., 1991).

Il verificarsi di temperature ambientali massime al di sopra dei c.d. valori soglia sono sempre state riscontrate in determinate aree del bacino del Mediterraneo (p.e. Spagna, Italia) che tendevano ad esaurirsi nel volgere di 5-6 giorni, e riconosciute come vere e proprie ondate di calore (Bernabucci, et al., 2014) (Ramon-Moragues, et al., 2021).

Questi episodi, alla luce dei recenti riscontri, sono aumentati sia di frequenza che di durata, estendendosi in un arco temporale che oramai spazia da maggio a settembre. Ne consegue che nelle aziende zootecniche se inizialmente si poteva registrare qualche occasionale episodio acuto di "colpo di calore" nella mandria (la temperatura corporea risulta di 3-4 °C superiore alla temperatura corporea normale), oggi il rischio è aumentato coinvolgendo un numero maggiore di capi e con effetti cronici indotti dalle elevate temperature ambientali.

Fra le specie produttive più colpite abbiamo suini, pollame e ruminanti a causa della produzione di calore derivante dall'intensa attività metabolica per le elevate produzioni (Gonzalez-Rivas, et al., 2020). Tutti gli animali hanno una specifica zona termoneutra, cioè uno specifico range di temperatura all'interno del quale non è necessaria ulteriore energia per la termoregolazione (Yousef, 1984). Se le condizioni ambientali portano ad uno sfioramento della zona termoneutra, aumenta la temperatura corporea dell'animale e di conseguenza si ha stress da caldo (Gonzalez-Rivas, et al., 2020)

L'organismo animale tende a mantenere l'omeotermia accrescendo la dispersione del calore e riducendo la termogenesi al fine di mantenere una zona di comfort termico o di termoneutralità secondo lo stato fisiologico in cui si trova. Quando i fattori ambientali (temperatura ambiente, tasso di umidità, velocità e qualità dell'aria, irradiazione solare, elementi legati al macro e microclima) si combinano tra loro e raggiungono valori in grado di oltrepassare la soglia superiore della zona termica inevitabilmente i ruminanti manifestano una condizione di stress termico che si appalesa con depressione dell'attività metabolica, aumento della evaporazione dell'acqua dalla superficie corporea

tramite la sudorazione, la polipnea termica ed anche con l'aumento dell'attività secretoria delle ghiandole salivari con la comparsa di scialorrea, oltre ad un aumento dell'assunzione di acqua di bevanda. A fronte della situazione metabolica si innesca un rallentamento dell'assunzione di alimento e della funzione ruminale (irruminazione e/o atonia ruminale) con coinvolgimento anche di altri tratti dell'apparato gastroenterico, ed in particolare della topografia abomasale con il rischio di paratopie abomasale sinistra e l'insorgenza di stipsi. Tali effetti conseguono alla compromissione dei centri termoregolatori ipotalamici che mediano, attraverso connessioni neuroendocrine, una inibizione della secrezione insulinica e IGF-1, riduzione del GnRH e dell'estradiolo, degli ormoni tiroidei (T4 e T3), dell'ormone della crescita (GH) e NEFA, delle catecolamine e più tardivamente dei glucocorticoidi (Quintavalla, et al., 1991) (De Rensis, et al., 2003).

Queste risposte portano a modifiche del metabolismo e delle performance produttive e riproduttive delle bovine da latte con evidenti ripercussioni sul benessere animale che possono perpetuarsi per periodi più o meno lunghi anche allo scomparire delle elevate temperature ambientali riscontrabili in stalla.

Lo stress termico provoca difatti inevitabili ripercussioni sullo stato di salute e sul comportamento delle bovine (Polsky, et al., 2017) (Ramon-Moragues, et al., 2021). La sudorazione intensa, accumulata dall'aumento della frequenza degli atti respiratori, comporta una considerevole perdita di liquidi e di sali minerali, specialmente  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . La deplezione ionica non viene compensata né dall'attività endocrina né dall'apporto alimentare, peraltro impedito dall'instaurarsi dell'iporessia-anoressia e dal conseguente calo ponderale, con aggravamento di una eventuale preesistente acidosi ruminale. A livello intestinale si può verificare una alterazione dell'integrità della parete intestinale, con riflessi sulla permeabilità intestinale che possono favorire l'insorgenza di una endotossiemia, ed alterazioni del flusso ematico con ripercussioni sullo stato redox dell'animale. Inoltre, il perdurare di situazioni stressanti coinvolge inevitabilmente la risposta immunitaria cellulo-mediata (Bagath, et al., 2019) incrementando il rischio di contrarre malattie infettive/infestive. Lo stress termico induce anche un impatto negativo sulla efficienza riproduttiva della bovina da latte per la maggior incidenza di calori silenti e cisti ovariche ed una minor durata della fase estrale. Ma certamente un impatto maggiore è riscontrabile sulla produzione lattea dove, ad un quasi scontato calo della produzione, si registra una ripercussione sulla qualità del latte in termini di contenuto proteico, percentuale ed indice di caseina, e cellule somatiche.

Per esprimere il disagio causato da condizioni climatiche sfavorevoli sono stati sviluppati diversi indici bioclimatici. Quello più utilizzato è il THI (*Temperature Humidity Index*) che può essere calcolato applicando la seguente formula:

$$\text{THI (}^{\circ}\text{C)} = \text{Ta} - (0.55 - 0.55 \times \text{UR}) \times (\text{Ta} - 58)$$

Dove: Ta = temperatura dell'aria ( $^{\circ}\text{C}$ ) =  $[(1.8 \times T \text{ }^{\circ}\text{C}) + 32]$  e UR= umidità relativa (%).

Il THI consente di classificare lo stress da caldo nelle bovine da latte in quattro classi di rischio (termoneutralità, rischio minimo, allerta ed emergenza) e permette quindi di intervenire anticipatamente sia in ambiente che direttamente sull'animale, riducendo così il tasso di eliminazione forzata delle bovine in allevamento. (Vitali, et al., 2009) hanno osservato che valori di 80 e 70 devono essere considerati il valore massimo e minimo del THI al di sopra del quale il rischio di morte inizia a salire significativamente.

L'iperventilazione porta ad una condizione di alcalosi respiratoria (Cottrell, et al., 2015) (Odongo, et al., 2006) (West, 2003) che viene compensata tramite l'escrezione urinaria di bicarbonati con riduzione del pH sanguigno che porta ad una condizione di acidosi metabolica (Wang, et al., 2017) (Gholamreza, et al., 2019).

È noto come lo stress da caldo sia in grado di indurre stress ossidativo, in quanto aumenta la produzione di ROS e diminuisce la capacità dei sistemi antiossidanti di contrastare questo fenomeno (Gonzalez-Rivas, et al., 2020). Lo stress ossidativo e l'acidosi indotta portano a fenomeni di citotossicità, all'ossidazione di lipidi e proteine alla reazione a catena innescata dai ROS e di conseguenza ad una compromissione dello stato di salute degli animali e alla produzione di prodotti con qualità e durata inferiore (Celi, et al., 2015) (Chauhan, et al., 2014) (Imik, et al., 2012).

Lo stress da caldo ha effetti dannosi anche sul sistema immunitario, rendendo gli animali più suscettibili alle patologie (Lacetera, et al., 2006) (Do Amaral, et al., 2009), in particolare determina aumento della secrezione di glucocorticoidi, i quali inibiscono le citochine pro-infiammatorie come TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8.



### **3. Effetti dello stress ossidativo nella capra da latte**

Nel corso degli anni sono stati effettuati numerosi studi riguardo lo stress ossidativo nella bovina da latte mentre negli ovi-caprini in letteratura ad oggi è particolarmente scarsa. Lo scopo di questa tesi è di valutare lo stress ossidativo nelle varie fasi della lattazione nelle capre da latte, estendendo lo studio anche sul ruolo dello stress da caldo.

#### **3.1 Materiali e metodi**

##### **3.1.1 Selezione dei soggetti**

I campionamenti sono stati effettuati esclusivamente su soggetti di sesso femminile, provenienti da un allevamento semi-intensivo situato nel comune di Terenzo (PR) ad una altitudine di 541 m s.l.m. Gli animali vengono ricoverati in stalla durante la notte per tutto l'anno e nel periodo invernale anche durante il giorno. Le stalle sono dotate di impianto di ventilazione a soffitto che viene utilizzato nel periodo estivo. Alimentate per l'80% con fieno di primo taglio e il restante 20 % con mangime concentrato, durante il periodo primaverile ed estivo gli animali vengono condotti al pascolo dove, oltre al fieno e al mangime, hanno la possibilità di assumere piante spontanee e foraggiere.

Ciascun animale arruolato è stato sottoposto a tre prelievi ematici in diverse fasi produttive. Ad ogni animale è stato assegnato un numero identificativo che lo ha accompagnato per tutti i prelievi effettuati, al quale abbiamo aggiunto due lettere, una per indicare il siero e una per il plasma, anch'esse differenti e progressive nei vari campioni prelevati (*Tabella 1*).

In particolare, il primo prelievo è stato eseguito nell'ultimo mese di gestazione su capre gravide in asciutta.

Il secondo prelievo è stato eseguito su capre che avevano partorito e che si trovavano in fase di metà lattazione.

Il terzo prelievo è stato effettuato su animali sia in lattazione che non durante il periodo estivo allo scopo di valutare gli effetti dello stress da caldo sullo stress ossidativo. Gli animali appartenenti a questo gruppo avevano età differenti e comprendevano animali che non avevano mai partorito.

In particolare, questi ultimi prelievi sono stati effettuati nel periodo compreso tra i mesi di giugno e agosto quando le temperature medie si aggiravano sui 30°C.

Tabella 1. Schematizzazione della raccolta dati e identificazione dei campioni

|         |           | 31/01/2023 |        | 09/07/2023            |        | 06/08/2023   |        |
|---------|-----------|------------|--------|-----------------------|--------|--------------|--------|
|         |           | Asciutta   |        | Metà Lattazione       |        | Stress Caldo |        |
| Capra   | Matricola | Siero      | Plasma | Siero                 | Plasma | Siero        | Plasma |
| Pepita  | 62355     | 1A         | 1B     | 1C                    | 1D     | 1E           | 1F     |
| Diana   | 62356     | 2A         | 2B     | 2C                    | 2D     | 2E           | 2F     |
| Banana  | 62357     | 3A         | 3B     | <b>Morta 5/2/2023</b> |        |              |        |
| Mimi    | 62358     | 4A         | 4B     | 4C                    | 4D     | 4E           | 4F     |
| Mirella | 62365     | 5A         | 5B     | 5C                    | 5D     | 5E           | 5F     |
| Peggy   | 65737     | 6A         | 6B     | /                     | /      | 6E           | 6F     |
| Avana   | 65739     | 7A         | 7B     | 7C                    | 7D     | 7E           | 7F     |
| Ringo   | 65740     | 8A         | 8B     | 8C                    | 8D     | 8E           | 8F     |
| Zucca   | 65743     | 9A         | 9B     | 9C                    | 9D     | 9E           | 9F     |
| Bionda  | 71716     | 10A        | 10B    | 10C                   | 10D    | 10E          | 10F    |
| Bella   | 71717     | 11A        | 11B    | /                     | /      | 11E          | 11F    |
| Heidi   | 71718     | 12A        | 12B    | /                     | /      | 12E          | 12F    |
| Amy     | 71719     | 13A        | 13B    | 13C                   | 13D    | 13E          | 13F    |
| Brizz   | 117934    | 14A        | 14B    | 14C                   | 14D    | 14E          | 14F    |
| Nera    | 119065    | 15A        | 15B    | 15C                   | 15D    | 15E          | 15F    |
| Nancy   | 124474    | 16A        | 16B    | 16C                   | 16D    | 16E          | 16F    |
| Aida    | 73319     | /          | /      | 17C                   | 17D    | 17E          | 17F    |
| Petunia | 71703     | /          | /      | 18C                   | 18D    | 18E          | 18F    |
| Flora   | 73320     | /          | /      | /                     | /      | 19E          | 19F    |
| Gilda   | 73318     | /          | /      | /                     | /      | 20E          | 20F    |
| Tosca   | 71732     | /          | /      | /                     | /      | 21E          | 21F    |

|                           |  |
|---------------------------|--|
| <b>Morta</b>              | Prelievo solo asciutta.                  |
| <b>No Lattazione</b>      | Prelievo solo stress caldo e asciutta.   |
| <b>Parto non previsto</b> | Prelievo solo lattazione e stress caldo. |
| <b>Novelle</b>            | Prelievo solo stress caldo.              |



### 3.1.2 Prelievi ematici e stoccaggio dei campioni

Ad ogni capra è stato eseguito un prelievo ematico dalla vena giugulare utilizzando un kit con sistema Vacutainer costituito da campana e ago da 18 G, alla quale venivano innestate una provetta da siero contenente un attivatore della coagulazione e una provetta trattata con Litio Eparina per ottenere plasma. I campioni sono stati lasciati a temperatura ambiente per circa 3 ore, successivamente sono stati centrifugati alla velocità di 3000 giri/minuto per 10 minuti. È stato quindi estratto il siero e il plasma a loro volta divisi in 1 aliquota di siero e 1 aliquota di plasma di circa 2 ml ciascuna stoccate in congelatore a -18°C all'interno di provette Eppendorf in attesa delle analisi (*Figura 10*).



*Figura 10. Campioni di Plasma caprino in attesa dei test (Foto personale)*

### 3.1.3 Analisi dei campioni

Sui campioni ematici raccolti sono stati titolati tre parametri di attacco degli agenti ossidanti (#) e due parametri di difesa dei sistemi antiossidanti (\*), in particolare:

- d-ROMs (Derived reactive oxygen metabolites) #
- NO (Ossido nitrico) #
- WST (Anione superossido) #
- SOD (Superossido dismutasi) \*
- FRAP (Ferric reducing ability of plasma) \*

I vari test sono stati eseguiti esclusivamente su plasma caprino scongelato al momento.

Il siero è stato mantenuto in congelatore a -18°C per eventuali analisi successive.

### 3.1.4 d-ROMs (Derived Reactive Oxygen metabolites)

Con il termine dROMs, si intendono i metaboliti reattivi dell'ossigeno che si generano a partire dai radicali liberi che reagiscono con molecole organiche; questi essendo più stabili dei radicali stessi sono facilmente quantificabili.

Per titolare questi prodotti è stato utilizzato un apposito kit che sfrutta una reazione cromogena, in particolare i ROM tramite la reazione di Fenton, reagiscono con il ferro producendo radicali alcossilici e perossilici, i quali ossidando un'ammina aromatica la trasformano in un derivato di colore rosa. Il kit utilizzato per questo parametro è fornito dalla ditta DIACRON International (Grosseto, Italia) e contiene:

- Reagente R1 → miscela cromogena
- Reagente R2 → tampone acetato
- Calibratore

### *Procedura analitica*

Prima di procedere, seguendo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice del kit, si prepara un calibratore a titolo noto che ci consentirà di tarare le successive analisi che verranno effettuate.

Nel frattempo, si tolgono anche i reagenti R1 e R2 dal frigorifero e si mantengono a temperatura ambiente al riparo dalla luce per far sì che siano alla temperatura corretta nel momento in cui verranno utilizzati.

Questo kit è stato studiato per due diverse procedure:

- **Procedura cinetica:** la quale prevede una lettura a 5, 30, 60 e 90 minuti
- **Procedura end-point:** in cui si esegue direttamente la lettura dopo 90 minuti dall'inizio dell'incubazione.

In questo caso si è scelta la procedura end-point, di conseguenza in ogni pozzetto sono stati caricati:

**2 µL di R1 + 200 µL di R2 + 2 µL di Plasma Caprino**

ogni campione è stato eseguito in doppio e ogni copia di pozzetti è stata contrassegnata con un numero progressivo da 1 a 50 a cui sono stati aggiunti una copia di pozzetti in cui è stato inserito il calibratore e una copia in cui è stato inserito il bianco; il tutto è stato posto in incubazione a 37°C per 90 minuti (*Figura 11*).

Terminata l'incubazione, le piastre sono state sottoposte a lettura tramite spettrofotometro Victor NIVO® dell'azienda Perkin Elmer Misurando l'assorbanza a 540 nm. I risultati che ci fornisce lo strumento vanno convertiti nell'unità di misura **U CARR** (Unità Caratelli) utilizzando l'apposita formula:

**U CARR:** (Ass campione/ Ass calibratore) \*[calibratore]

Dove:

- Ass campione e Ass calibratore sono i valori di assorbanza che ci fornisce, lo strumento
- [calibratore] è la concentrazione del calibratore preparato in precedenza stabilito dal produttore

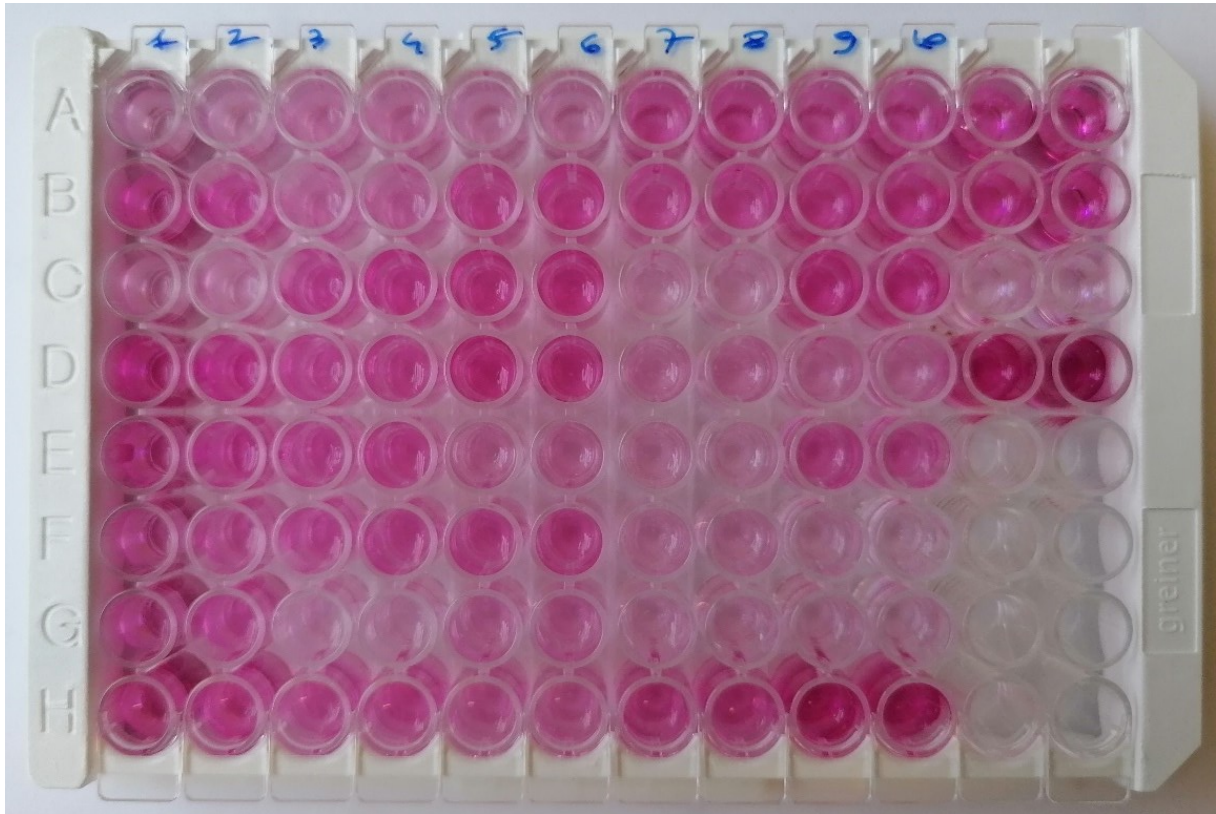
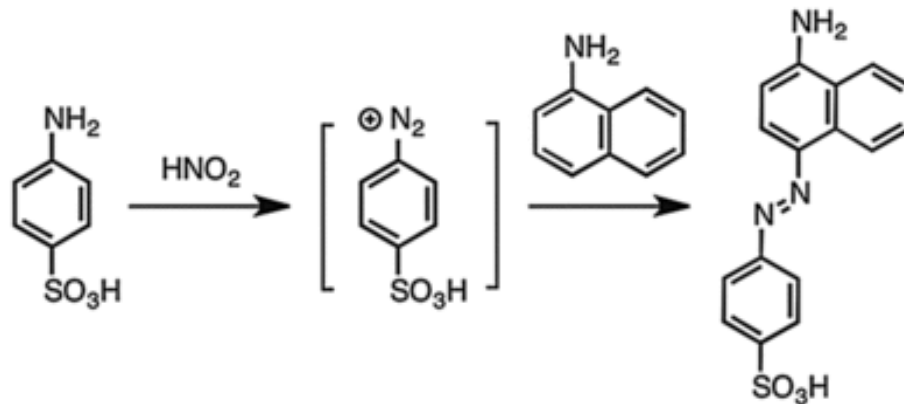


Figura 11. Piastra di valutazione dei dROMs trascorsi i 90 minuti a 37°C (Foto personale)

### 3.1.5 NO (Ossido nitrico)

Il test per titolare l'ossido nitrico sfrutta la reazione di Griess (*Figura 12*) e ha lo scopo di rilevare la presenza di nitriti e misurarne la concentrazione tramite spettrofotometria.



*Figura 12. Reazione di Griess*

Creando ambiente acido tramite il reagente di Griess, il nitrito tende a formare acido nitroso, il quale reagendo con l'acido solfanilico contenuto nel reagente, produce un sale di diazonio che reagendo a sua volta con l'1-naftilammina (anch'essa contenuta nel reagente) produce un colorante viola che ha un picco di assorbenza alla lunghezza d'onda di 540 nm.

#### *Procedura operativa*

Per prima cosa si preparano i reagenti, in particolare abbiamo:

- **Soluzione A:** si uniscono 5882  $\mu\text{L}$  di acido fosforico all'85% con 1 g di solfanilammide e successivamente aggiungere 100 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata.
- **Soluzione B:** si sciolgono 100g di naftiletilendiammina a 100 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata.
- **Standard:** si sciolgono 34 mg di Nitrito di sodio 10 mM in 50 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata.

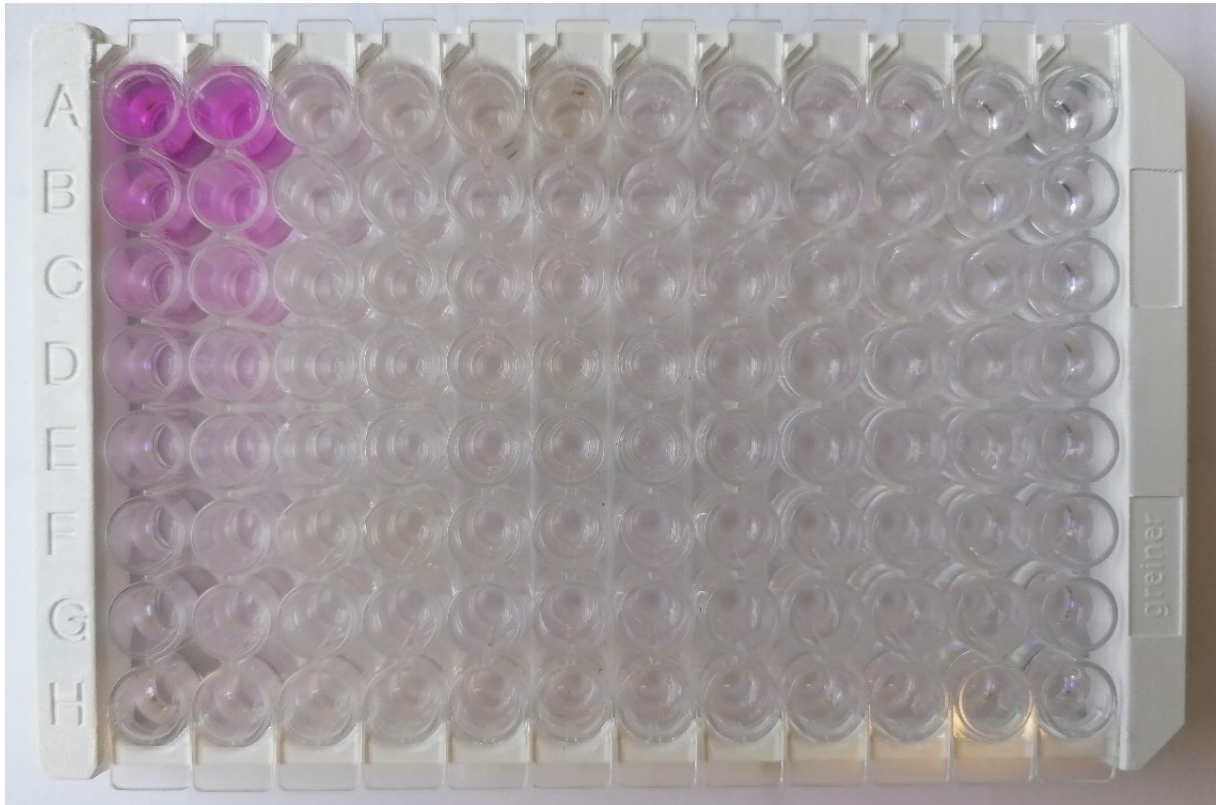
Con la soluzione standard si crea il primo punto di curva 25  $\mu\text{M}$  aggiungendo 5  $\mu\text{L}$  di Standard a 1995  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata, successivamente effettuando diluizione scalari 1:2 creiamo i successivi punti di curva fino ad arrivare a 0  $\mu\text{M}$  che indica il punto zero della curva; sono state caricate in doppio nelle prime due file di pozzetti della piastra e hanno lo scopo di consentire allo strumento di creare la curva con cui confrontare i risultati dei campioni (*Figura 13*).

A questo punto sono stati caricati i 50 campioni in doppio nei pozzetti unendo:

- 40  $\mu\text{L}$  di plasma caprino
- 60  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata

- 100  $\mu$ L di reagente: ottenuto unendo 50 % di Soluzione A e 50% di soluzione B.

I campioni sono stati poi incubati 12 minuti a temperatura ambiente e successivamente sottoposti a lettura tramite spettrofotometro Victor NIVO® dell'azienda Perkin Elmer, in cui è già pre-impostato un protocollo per la lettura del NO.



*Figura 13. Piastra per il test di Griess, nelle prime due colonne abbiamo la curva di taratura e successivamente abbiamo i campioni nei vari pozzetti (Foto personale)*

### 3.1.6 WST (Anione superossido)

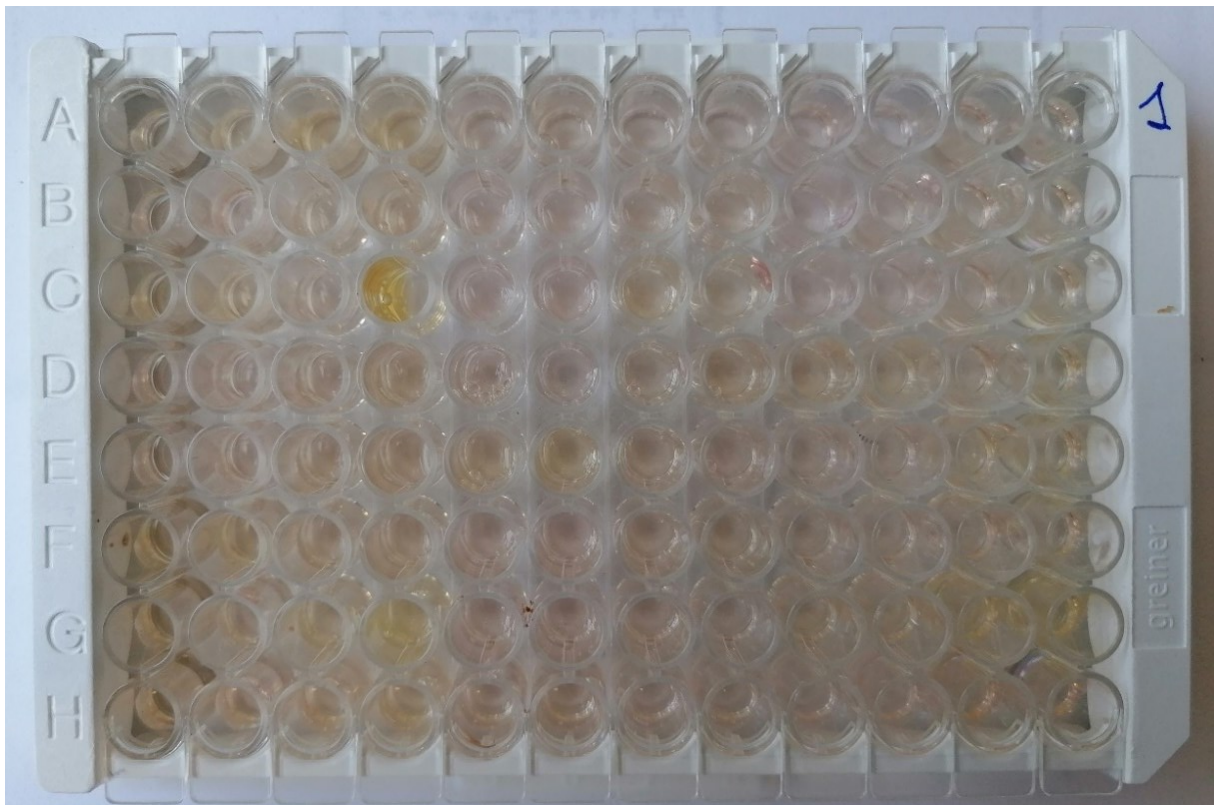
Per quantificare i livelli di anione superossido è stato utilizzato il reagente WST test prodotto dall'azienda Roche utilizzando plasma caprino.

#### *Procedura analitica*

Anche questo test è stato eseguito su piastre da 96 pozzetti caricando sempre i campioni in doppio, in ogni pozzetto vengono caricati:

- 25  $\mu$ L di Plasma caprino
- 75  $\mu$ L PBS
- 10  $\mu$ L WST

Le piastre (*Figura 14*) sono state incubate a 37°C per 4 ore. Al termine la lettura viene effettuata tramite spettrofotometro Victor NIVO® dell'azienda Perkin Elmer ad una lunghezza di 450 nm e 620 nm.



*Figura 14. Piastra per la titolazione dell'anione superossido (Foto personale)*

### 3.1.7 SOD (Enzima Superossido dismutasi)

La Superossido dismutasi è un enzima che si occupa di convertire l'anione superossido in perossido di idrogeno e ossigeno.

Per determinare la quantità di SOD presente nei campioni è stato utilizzato un kit che utilizza sale di tetrazolio, denominato WST-1, il quale quando reagisce in ambiente acquoso con l'anione superossido provoca reazione cromogena.

#### *Procedura analitica*

Il kit utilizzato viene prodotto dall'azienda Sigma-Aldrich ed è denominato SOD determination kit, il quale è composto da:

- *WST solution*
- *Enzyme solution*
- *Buffer solution*
- *Dilution buffer*
- *SOD solution*

Prima di iniziare la procedura sono stati preparati i reagenti, in particolare:

- **WST working solution:** aggiungere 1 ml di WST solution a 19 ml di Buffer solution.
- **Enzyme solution:** centrifugare per 5 secondi il contenitore dell'Enzyme solution, mescolare e diluire 15 µL di Enzyme solution con 2,5 ml di Dilution buffer.
- **SOD solution:** diluire la SOD solution con il Dilution buffer per preparare la curva standard come segue:
  - **200 U/ml**
  - **100 U/ml**
  - **50 U/ml**
  - **20 U/ml**
  - **10 U/ml**
  - **5 U/ml**
  - **1 U/ml**
  - **0,1 U/ml**

Successivamente è stata allestita la piastra (*Figura 15*) secondo il seguente ordine:



1. **Curva standard:** caricare in doppio le varie diluizioni della curva standard nelle prime due colonne della piastra.
2. **Campioni:** a partire dalla terza colonna caricare i singoli campioni in doppio come segue:
  - a. 20  $\mu$ l di plasma Caprino
  - b. 200  $\mu$ l WS
  - c. 20  $\mu$ l ES
3. **“Bianco”:** negli ultimi due pozzetti rimasti caricare un campione utilizzando acqua distillata.

Una volta allestite le piastre si incubano i campioni a 37°C per 20 minuti e successivamente si leggono i risultati tramite spettrofotometro Victor NIVO® dell'azienda Perkin Elmer ad una lunghezza d'onda di 450nm.

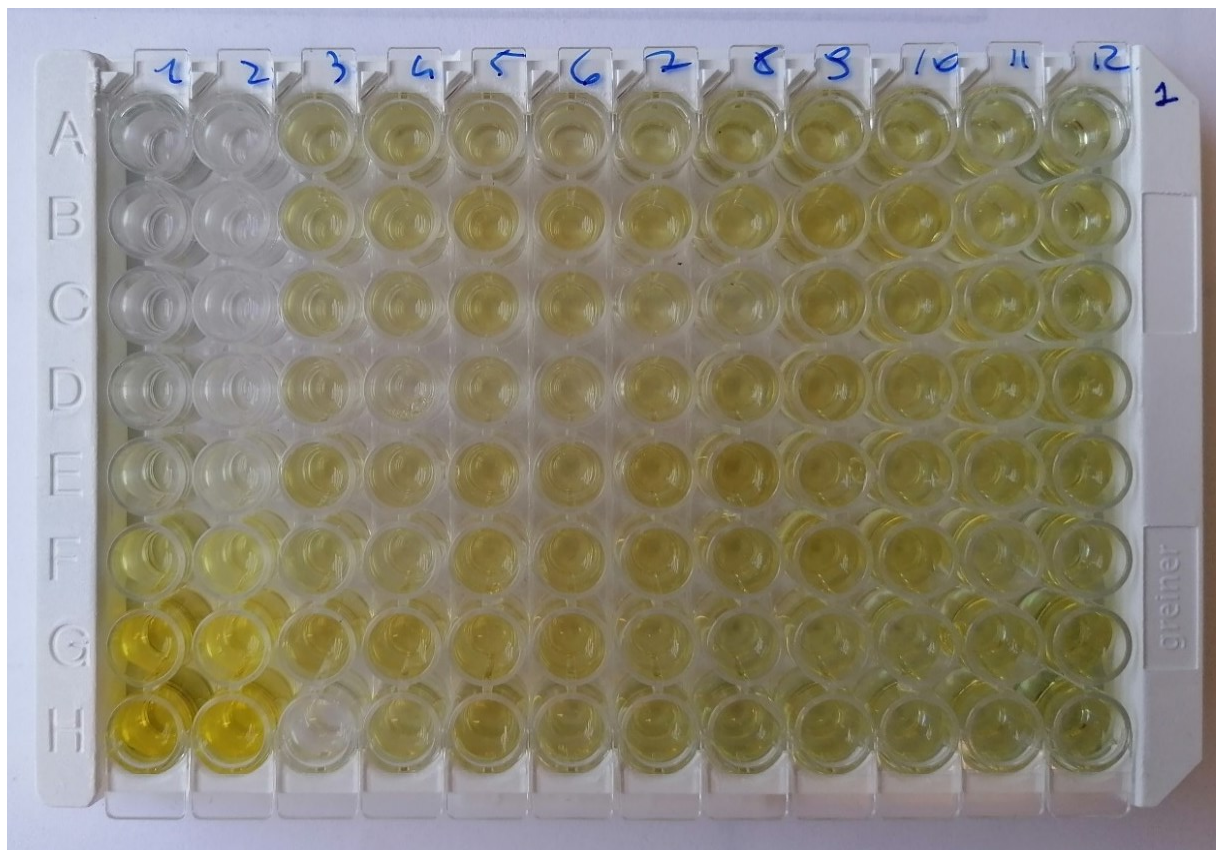


Figura 15. Piastra allestita per la determinazione della SOD (Foto personale)

### 3.1.8 FRAP (Ferric reducing ability of plasma)

Il FRAP ci indica la capacità degli antiossidanti presenti nel campione da testare, di ridurre il complesso  $\text{Fe}^{+++}$ /trifiridiltriazina in ambiente acido. La reazione che si viene a creare è una reazione colorimetrica leggibile ad una lunghezza d'onda di 593 nm tramite spettrofotometro, in particolare si passa da un colore di partenza giallo ad un colore finale blu.

#### *Procedura analitica*

Come di consueto sono stati preparati i reagenti come segue:

1. **Curva Standard:** soluzione madre 1 mM ottenuta sciogliendo 0,0278 g di  $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  in 100 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata; da questa si ottengono poi le varie diluizioni che formeranno la curva, in particolare:
  - a. **750  $\mu\text{M}$ :** 750  $\mu\text{l}$  di madre in 1 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata
  - b. **500  $\mu\text{M}$ :** 500  $\mu\text{l}$  di madre in 1 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata
  - c. **250  $\mu\text{M}$ :** 250  $\mu\text{l}$  di madre in 1 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata
  - d. **100  $\mu\text{M}$ :** 100  $\mu\text{l}$  di madre in 1 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata
2. **TPTZ:** ottenuta sciogliendo 0,0062 g di TPTZ in 20 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata.
3.  **$\text{FeCl}_3$ :** in 100 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata si sciolgono 0,541g di  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .
4. **Tampone acetato:** in 16 ml di acido acetico si sciolgono 3,1 g di acetato di sodio triidrato portati a volume con  $\text{H}_2\text{O}$  distillata.

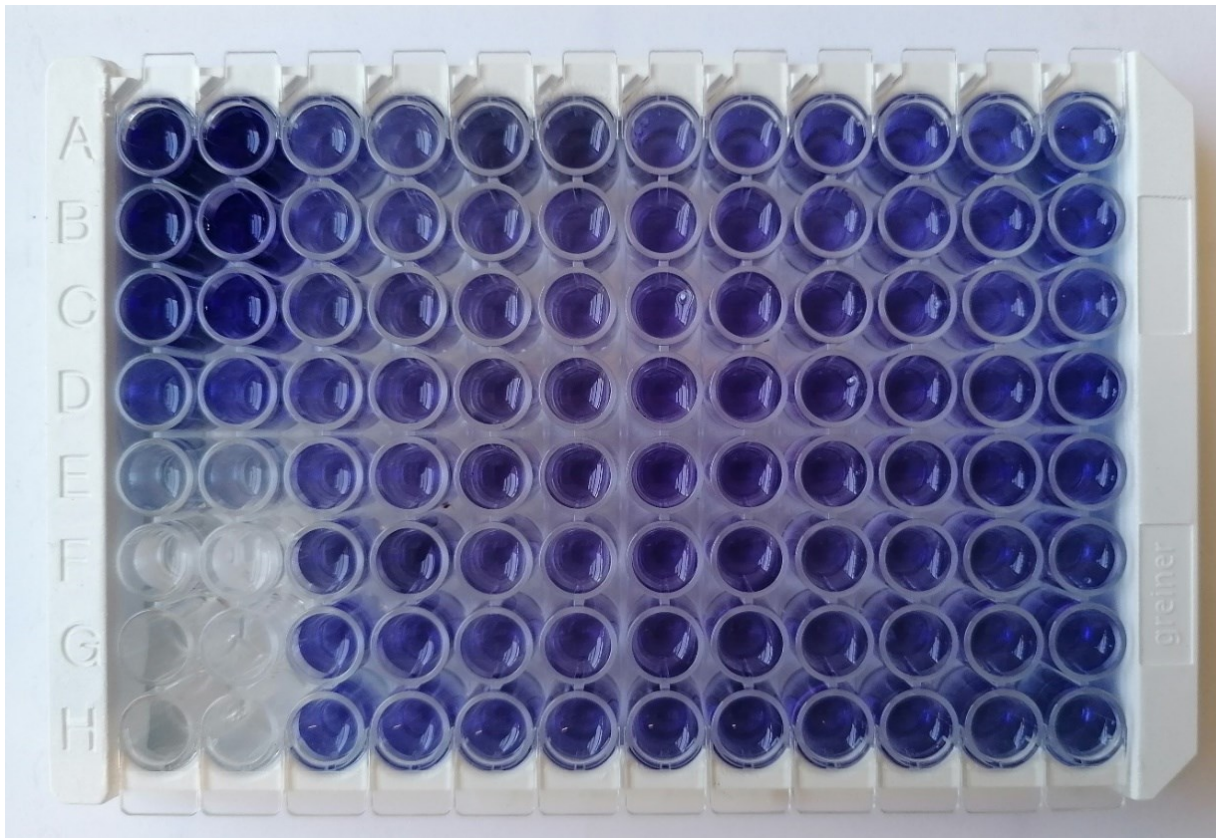
Successivamente è stato preparato il tampone FRAP:

26 ml di tampone acetato + 2,6 ml di TPTZ + 2,6 ml di  $\text{FeCl}_3$

È stata allestita la piastra (*Figura 16*) partendo dalla curva standard, in doppio sulle prime due colonne. In seguito, sono stati caricati i singoli campioni nei pozzetti inserendo in ciascuno:

- 40  $\mu\text{l}$  di Plasma caprino
- 260  $\mu\text{l}$  di reagente FRAP

Il tutto è stato incubato a 37° C per 30 minuti e sottoposto poi a lettura tramite spettrofotometro Victor NIVO® dell'azienda Perkin Elmer ad una lunghezza d'onda di 593 nm.



*Figura 16. Piastra per la valutazione del FRAP passati i 20 minuti di incubazione (Foto personale)*



## 4. Risultati

Nella Tabella 2 sono riportati i dati riassuntivi dei prelievi effettuati.

Tabella 2. Tabella riassuntiva dei prelievi effettuati

| 31/01/2023 |        | 09/07/2023      |        | 06/08/2023   |        | TOT |
|------------|--------|-----------------|--------|--------------|--------|-----|
| Asciutta   |        | Metà Lattazione |        | Stress Caldo |        |     |
| Siero      | Plasma | Siero           | Plasma | Siero        | Plasma |     |
| 16         | 16     | 14              | 14     | 20           | 20     | 50  |

L'animale deceduto successivamente al primo prelievo, identificato con il numero 3, non è stato considerato nello studio, così come gli animali numero 6,9,11,12,13,17,18,19,20 e 21 in quanto non sono stati effettuati tutti i prelievi previsti. Nelle successive tabelle sono riportati tutti i dati ottenuti ma gli animali citati in precedenza non sono poi stati considerati nello studio.

I risultati dei test effettuati sono riportati di seguito nelle rispettive tabelle:

- **Tabella 3.** Risultati dei test effettuati per i dROMs
- **Tabella 4.** Risultati relativi all'Ossido Nitrico
- **Tabella 5.** Risultati dei test effettuati per l'Anione superossido
- **Tabella 7.** Risultati dei test effettuati per il FRAP
- **Tabella 6.** Risultati dei test effettuati per l'Enzima Superossido dismutasi

Tabella 3. Risultati dei test effettuati per i dROMs

| <b>Risultati dROMs (UCARR)</b> |                   |                        |                        |
|--------------------------------|-------------------|------------------------|------------------------|
|                                | <b>Asciutta</b>   | <b>Metà lattazione</b> | <b>Stress da caldo</b> |
|                                | <b>31/01/2023</b> | <b>09/07/2023</b>      | <b>06/08/2023</b>      |
| <b>1</b>                       | 27,91             | 19,91                  | 9,76                   |
| <b>2</b>                       | 103,26            | 91,35                  | 87,45                  |
| <b>4</b>                       | 130,78            | 111,07                 | 72,42                  |
| <b>5</b>                       | 95,65             | 113,02                 | 98,96                  |
| <b>7</b>                       | 82,18             | 23,42                  | 24,40                  |
| <b>8</b>                       | 99,94             | 65,00                  | 68,12                  |
| <b>10</b>                      | 68,90             | 53,48                  | 6,25                   |
| <b>14</b>                      | 71,44             | 88,23                  | 48,02                  |
| <b>15</b>                      | 24,20             | 16,01                  | 5,86                   |
| <b>16</b>                      | 75,15             | 38,26                  | 11,91                  |

Rapportando i risultati dei vari periodi fra loro otteniamo:

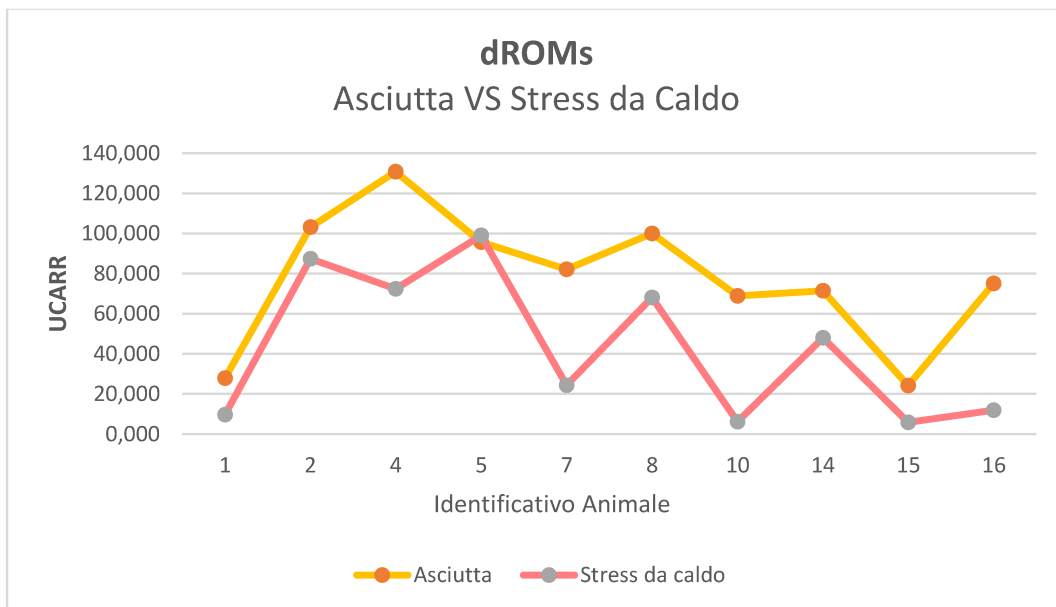


Figura 17. Grafico che mostra i valori relativi ai dROMs in asciutta e durante lo stress da caldo

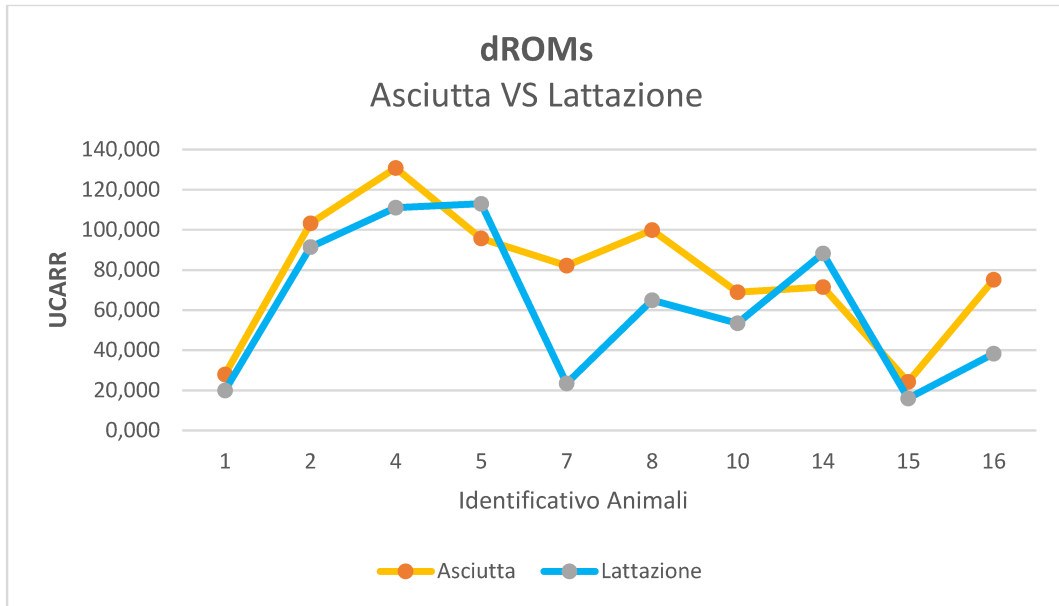


Figura 18. Grafico che mostra i valori relativi ai dROMs in asciutta e in lattazione

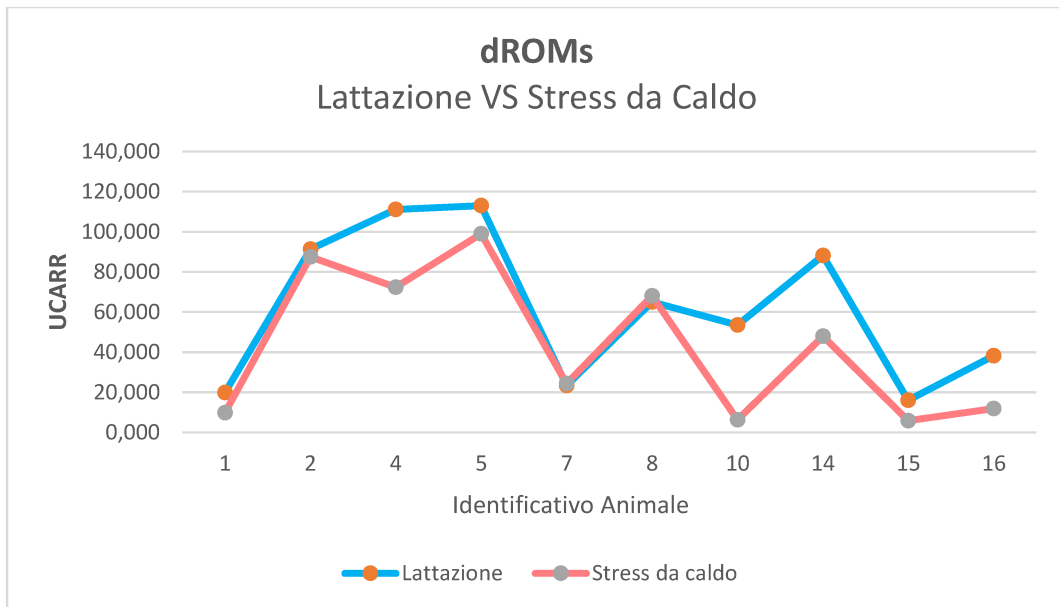


Figura 19. Grafico che mostra i valori relativi ai dROMs in lattazione e durante stress da caldo

Tabella 4. Risultati relativi all'Ossido Nitrico

| <b>Risultati NO (<math>\mu\text{M}</math>)</b> |                   |                        |                        |
|--|-------------------|------------------------|------------------------|
|  | <b>Asciutta</b>   | <b>Metà lattazione</b> | <b>Stress da caldo</b> |
|  | <b>31/01/2023</b> | <b>09/07/2023</b>      | <b>06/08/2023</b>      |
| <b>1</b>                                       | 8,24              | 3,69                   | 2,63                   |
| <b>2</b>                                       | 0,60              | 2,06                   | 2,88                   |
| <b>4</b>                                       | 4,09              | 3,53                   | 3,28                   |
| <b>5</b>                                       | 1,01              | 3,04                   | 1,09                   |
| <b>7</b>                                       | 1,33              | 1,90                   | 0,84                   |
| <b>8</b>                                       | 1,01              | 0,60                   | 0,60                   |
| <b>10</b>                                      | 0,44              | 1,41                   | 1,09                   |
| <b>14</b>                                      | 2,63              | 1,66                   | 2,67                   |
| <b>15</b>                                      | 3,85              | 0,93                   | 8,13                   |
| <b>16</b>                                      | 1,17              | 0,76                   | 3,72                   |

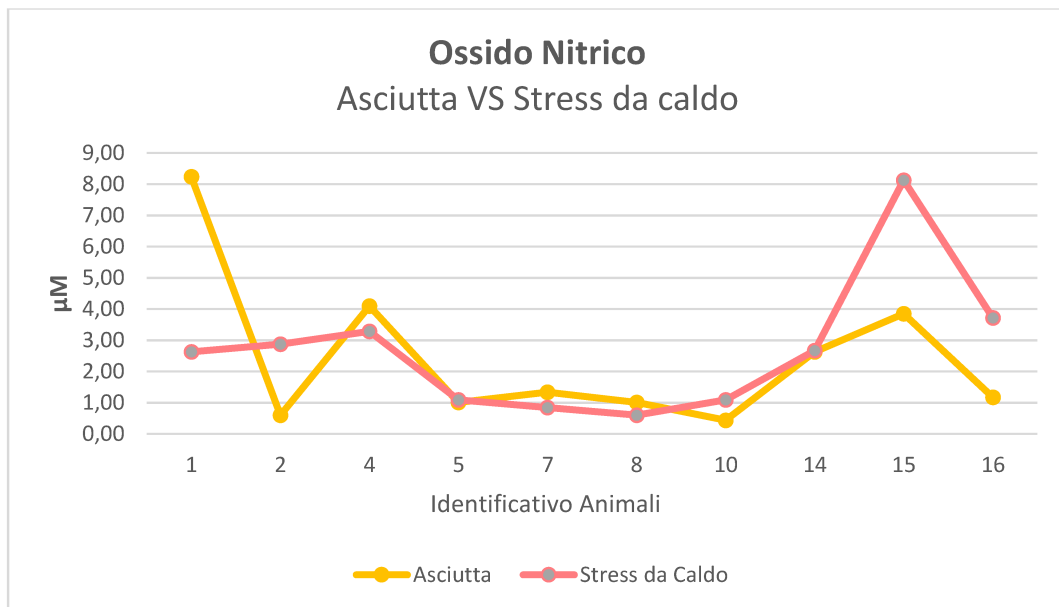


Figura 20. Grafico che mostra a confronto i valori dell'Ossido Nitrico in asciutta e durante stress da caldo



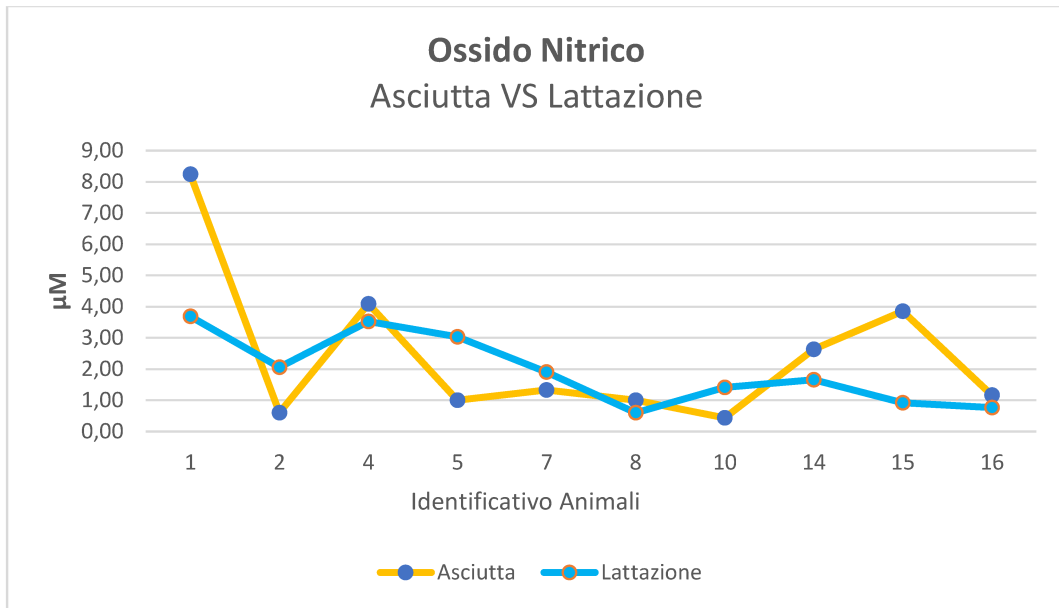


Figura 21. Grafico che mostra a confronto i valori dell'Ossido Nitrico in asciutta e durante la lattazione

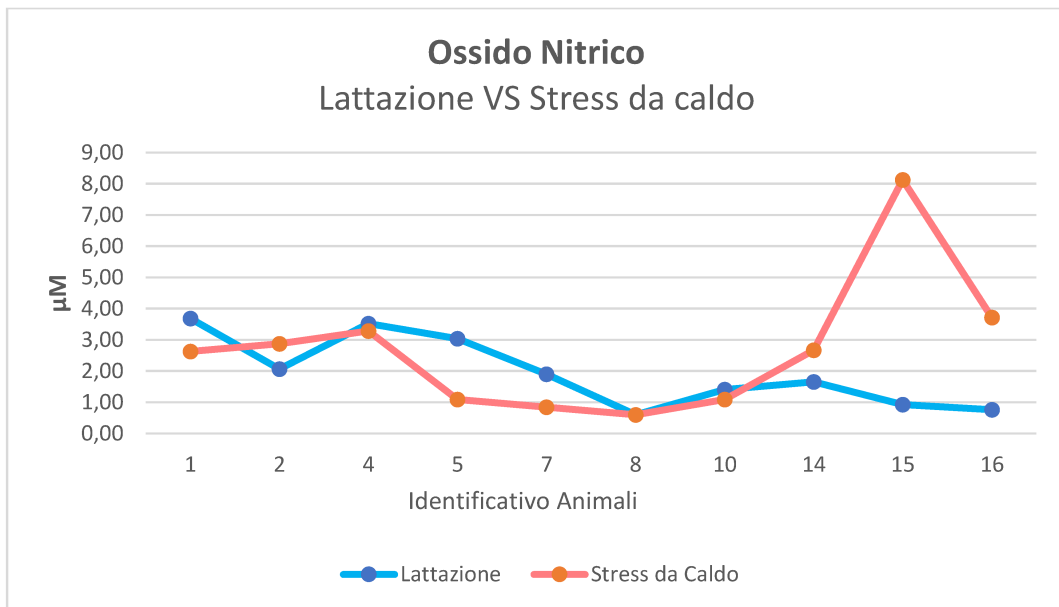


Figura 22. Grafico che mostra a confronto i valori dell'Ossido nitrico in lattazione e durante stress da caldo

Tabella 5. Risultati dei test effettuati per l'Anione superossido

| <b>Risultati WST (Ass)</b> |                   |                        |                        |
|----------------------------|-------------------|------------------------|------------------------|
|                            | <b>Asciutta</b>   | <b>Metà lattazione</b> | <b>Stress da caldo</b> |
|                            | <b>31/01/2023</b> | <b>09/07/2023</b>      | <b>06/08/2023</b>      |
| <b>1</b>                   | 0,08              | 0,07                   | 0,06                   |
| <b>2</b>                   | 0,07              | 0,07                   | 0,06                   |
| <b>4</b>                   | 0,07              | 0,06                   | 0,05                   |
| <b>5</b>                   | 0,07              | 0,06                   | 0,06                   |
| <b>7</b>                   | 0,09              | 0,11                   | 0,10                   |
| <b>8</b>                   | 0,09              | 0,07                   | 0,06                   |
| <b>10</b>                  | 0,09              | 0,07                   | 0,09                   |
| <b>14</b>                  | 0,09              | 0,07                   | 0,09                   |
| <b>15</b>                  | 0,12              | 0,08                   | 0,09                   |
| <b>16</b>                  | 0,10              | 0,08                   | 0,10                   |

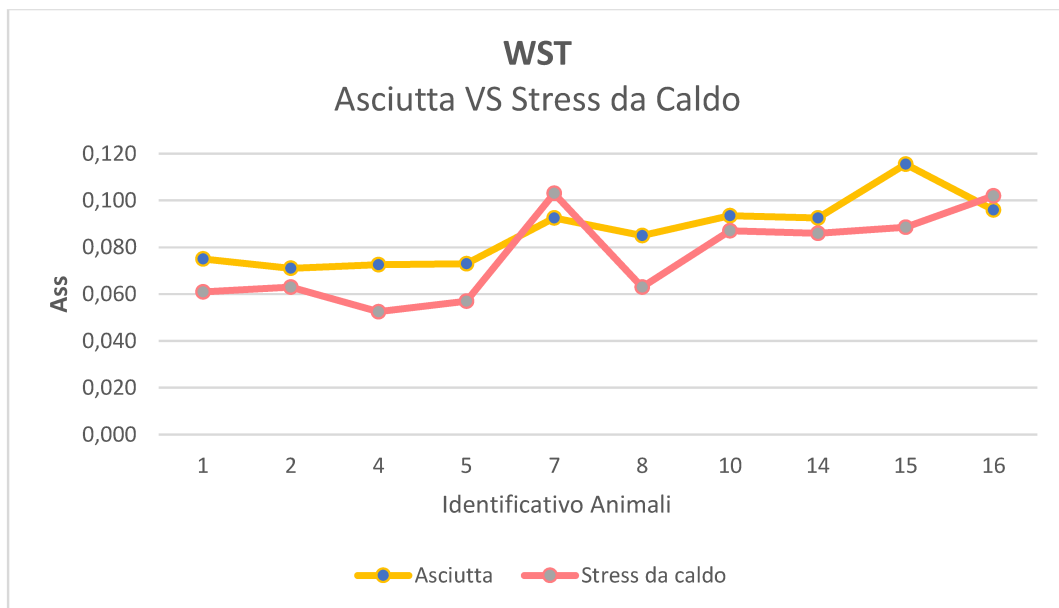


Figura 23. Grafico che mostra i valori dell'Anione superossido in Asciutta e durante stress da caldo

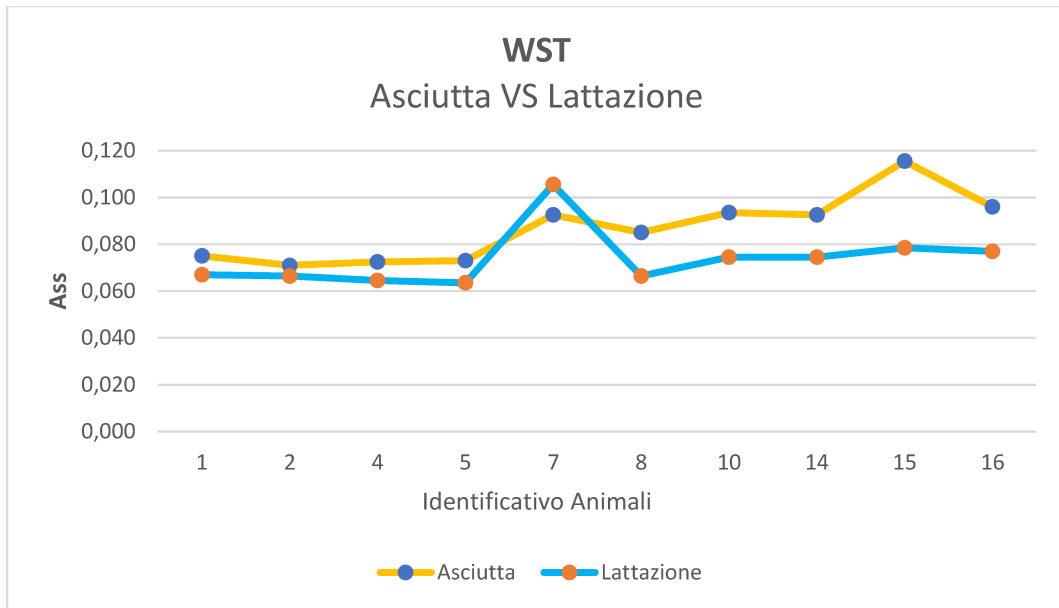


Figura 24. Grafico che mostra i valori dell'Anione superossido in asciutta e in lattazione

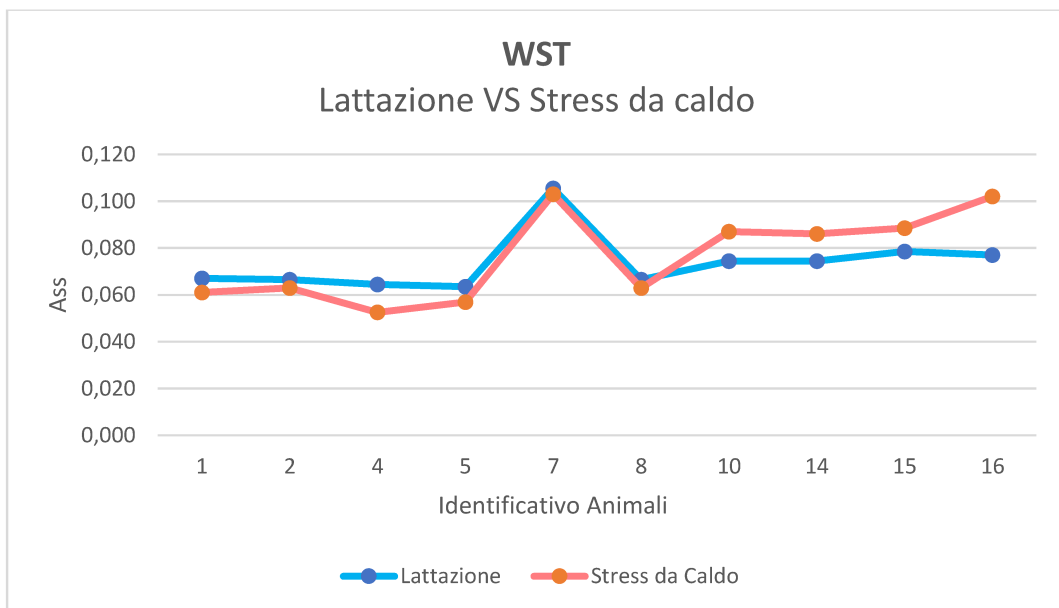


Figura 25. Grafico che mostra i valori dell'Anione superossido in lattazione e durante stress da caldo

Tabella 6. Risultati dei test effettuati per l'Enzima Superossido dismutasi

| <b>Risultati SOD (U/ml)</b> |                   |                        |                        |
|-----------------------------|-------------------|------------------------|------------------------|
|                             | <b>Asciutta</b>   | <b>Metà lattazione</b> | <b>Stress da caldo</b> |
|                             | <b>31/01/2023</b> | <b>09/07/2023</b>      | <b>06/08/2023</b>      |
| <b>1</b>                    | 2,52              | 3,25                   | 4,45                   |
| <b>2</b>                    | 3,28              | 2,35                   | 3,66                   |
| <b>4</b>                    | 8,30              | 6,93                   | 4,97                   |
| <b>5</b>                    | 2,04              | 2,50                   | 2,58                   |
| <b>7</b>                    | 0,68              | 1,34                   | 1,44                   |
| <b>8</b>                    | 2,81              | 1,77                   | 2,28                   |
| <b>10</b>                   | 1,63              | 1,95                   | 1,87                   |
| <b>14</b>                   | 2,18              | 0,92                   | 1,76                   |
| <b>15</b>                   | 1,86              | 1,55                   | 6,11                   |
| <b>16</b>                   | 2,23              | 1,85                   | 2,88                   |

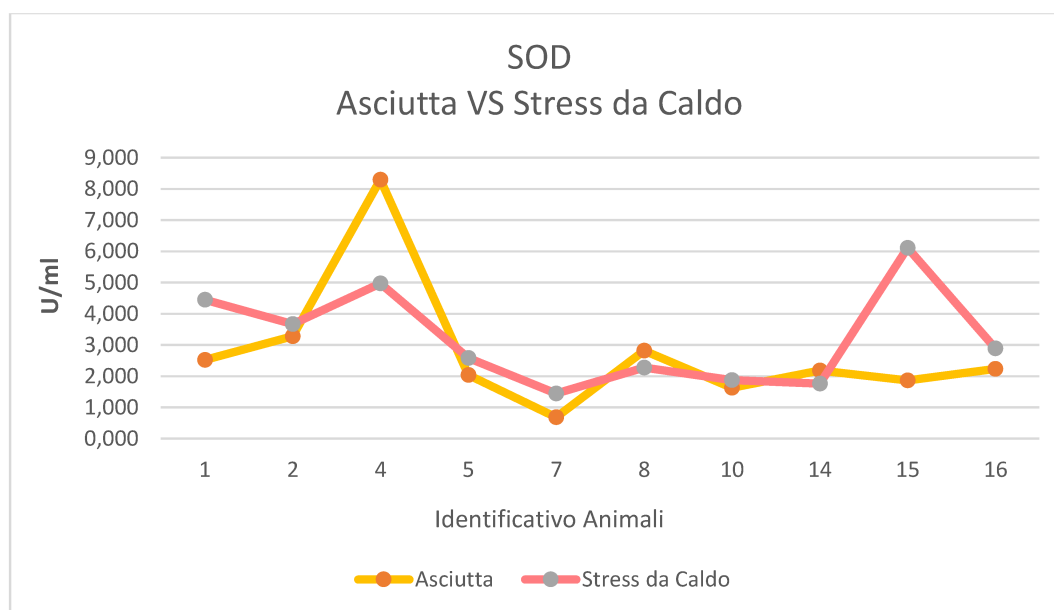


Figura 26. Grafico che mostra i valori di SOD in asciutta e durante stress da caldo

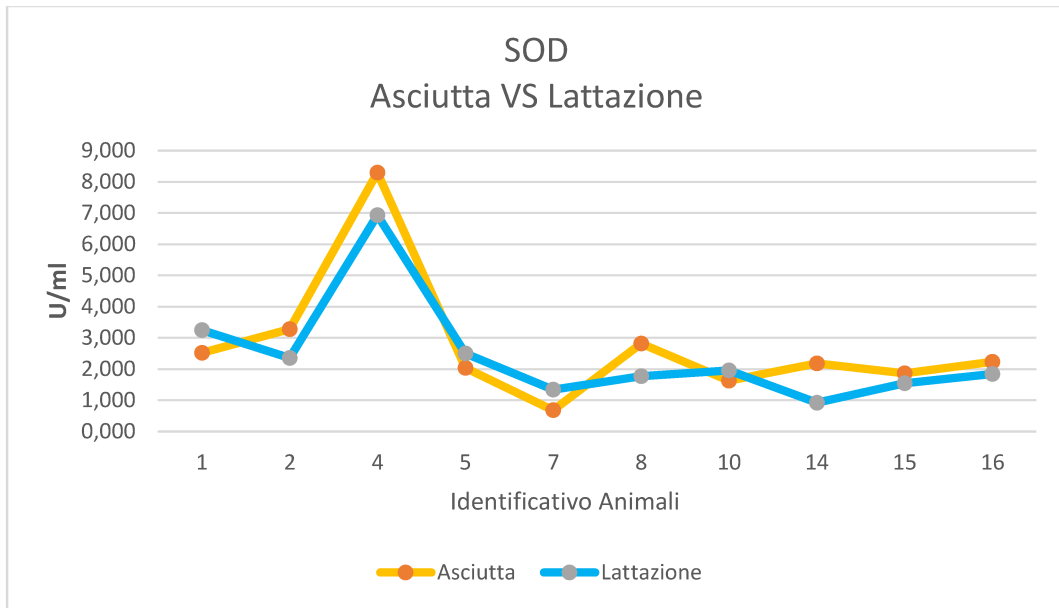


Figura 27. Grafico che mostra i valori di SOD in asciutta e in lattazione

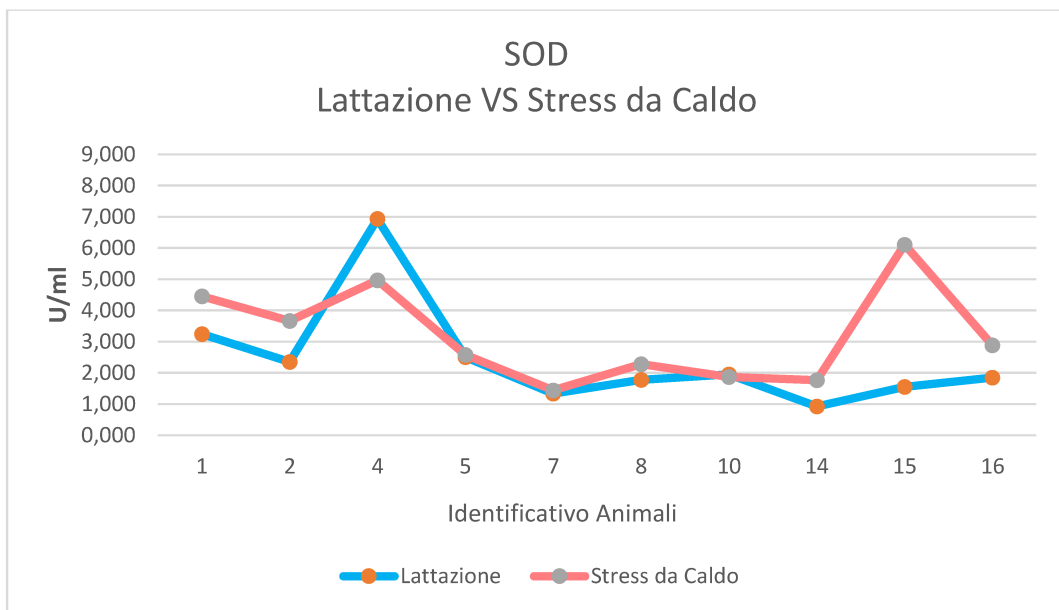


Figura 28. Grafico che mostra i valori di SOD in lattazione e durante stress da caldo

Tabella 7. Risultati dei test effettuati per il FRAP

| <b>Risultati FRAP (<math>\mu\text{M}</math>)</b> |                   |                            |                            |
|--|-------------------|----------------------------|----------------------------|
|  | <b>Asciutta</b>   | <b>Metà<br/>lattazione</b> | <b>Stress da<br/>caldo</b> |
|  | <b>31/01/2023</b> | <b>09/07/2023</b>          | <b>06/08/2023</b>          |
| <b>1</b>   | 236,83            | 222,86                     | 216,65                     |
| <b>2</b>   | 193,38            | 253,90                     | 236,83                     |
| <b>4</b>   | 212,00            | 268,48                     | 253,58                     |
| <b>5</b>   | 200,82            | 249,86                     | 260,41                     |
| <b>7</b>   | 227,20            | 264,45                     | 283,38                     |
| <b>8</b>   | 221,62            | 240,55                     | 257,62                     |
| <b>10</b>  | 206,72            | 251,10                     | 228,14                     |
| <b>14</b>  | 217,89            | 237,76                     | 249,30                     |
| <b>15</b>  | 231,86            | 253,58                     | 243,37                     |
| <b>16</b>  | 227,82            | 255,14                     | 276,16                     |

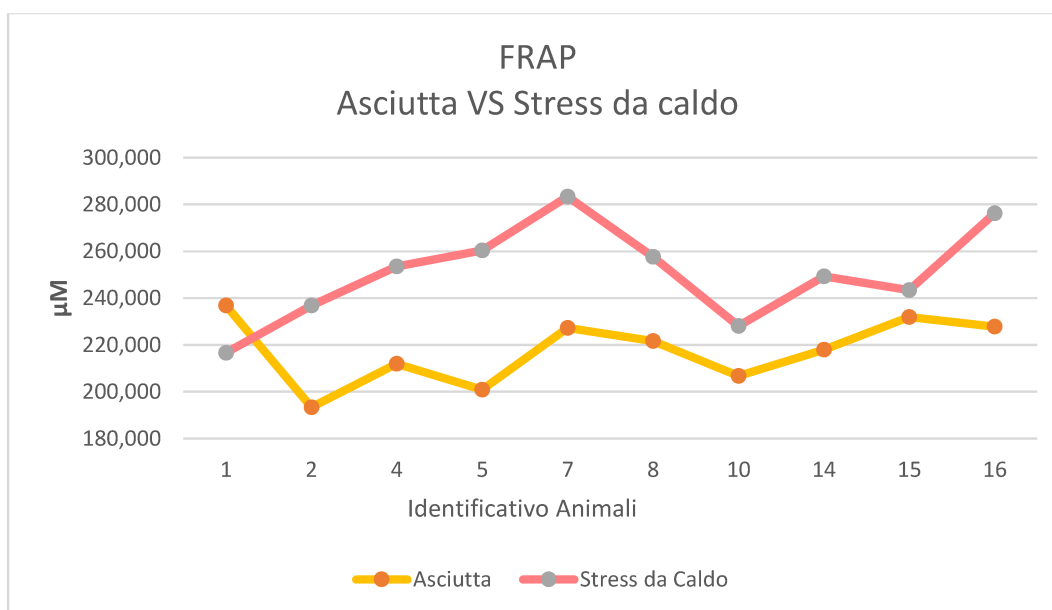


Figura 29. Grafico che mostra i valori del FRAP in asciutta e durante stress da caldo

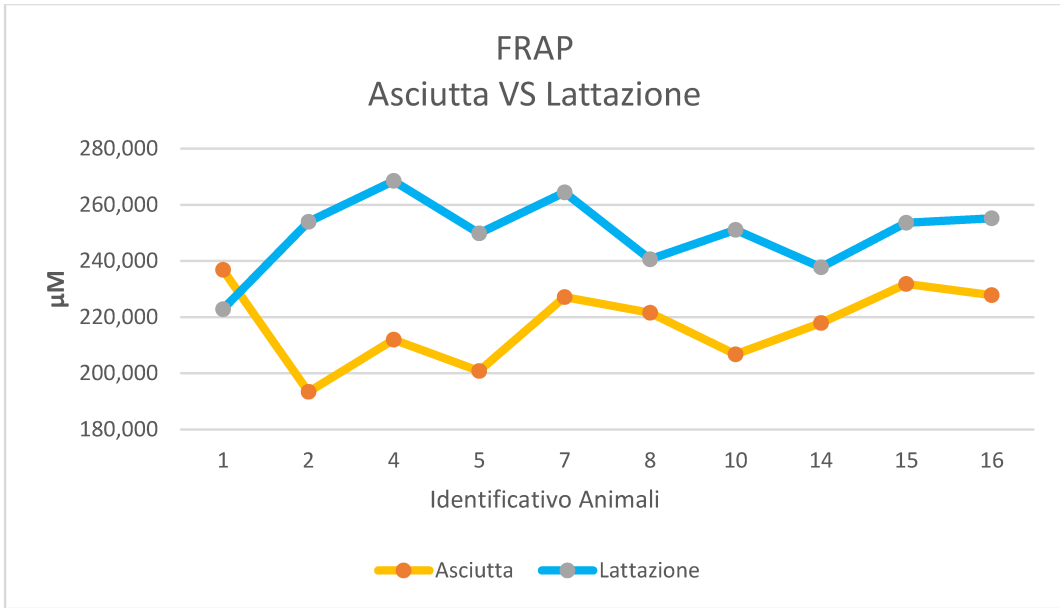


Figura 30. Grafico che mostra i valori del FRAP in asciutta e durante la lattazione

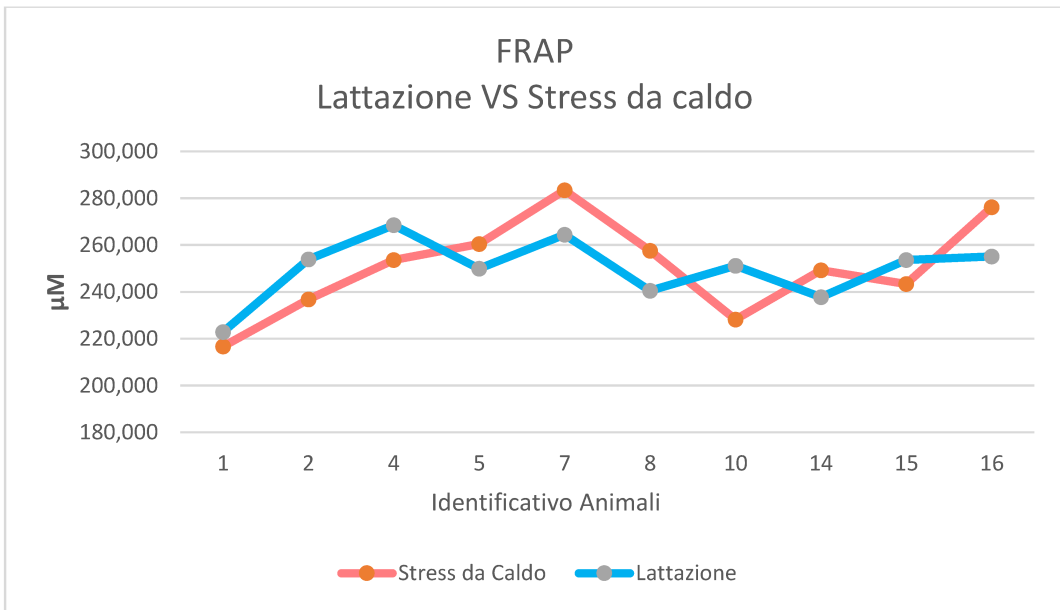


Figura 31. Grafico che mostra i valori del FRAP in lattazione e durante stress da caldo





## 5. Discussione

Analizzando i risultati ottenuti si possono trarre alcune considerazioni, fermo restando che in letteratura studi sullo stress ossidativo nelle capre sono particolarmente scarsi e pertanto la discussione si limita sulla discussione dei dati riscontrati e al confronto con le esperienze riportate dai pochi Autori.

### 5.1 Asciutta vs Lattazione

Confrontando i valori ottenuti durante l'asciutta e la lattazione nei vari animali (Figura 18, Figura 24, **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**, Figura 30, Figura 32), si nota che dall'asciutta alla lattazione si riscontra un aumento del FRAP nel 90% degli animali, accompagnato a diminuzione di Ossido nitrico e SOD nel 60% degli animali, riduzione dei dROMs nell'80% degli animali e riduzione dell'anione superossido nel 90% degli animali.

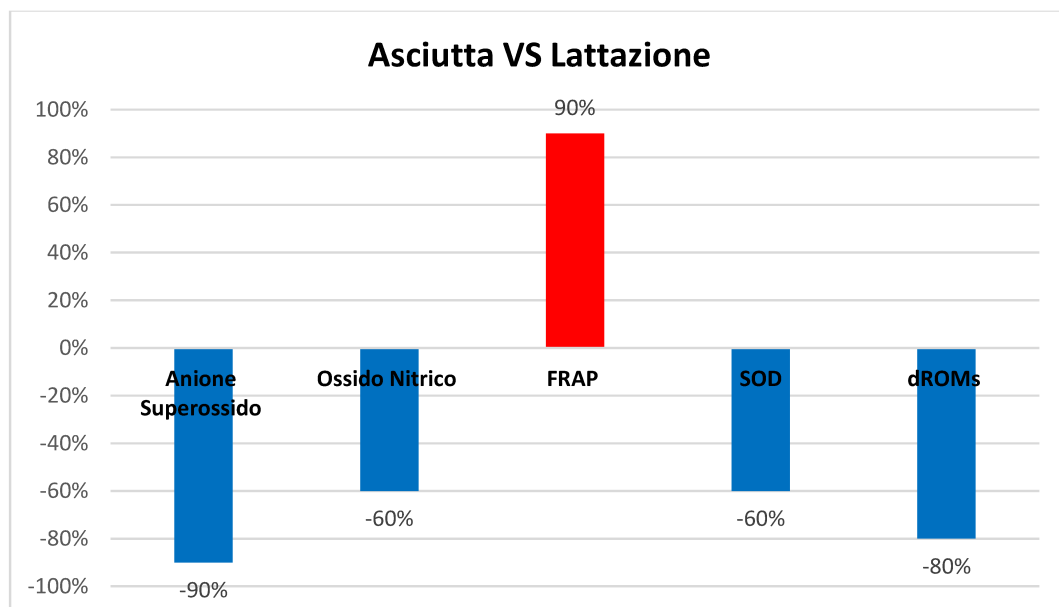


Figura 32. Grafico che evidenzia le principali differenze fra asciutta e lattazione dei vari parametri

Secondo quanto riportato in letteratura durante l'asciutta si ha innalzamento delle sostanze pro-ossidanti e diminuzione dei sistemi di difesa (Celi, et al., 2010), in accordo con questo studio anche nei soggetti. La diminuzione che si verifica fra asciutta e lattazione è probabilmente dovuta al fatto che a metà lattazione il metabolismo degli animali si è stabilizzato in base all'alimentazione somministrata e di conseguenza l'organismo riesce a compensare correttamente. Vale la pena ricordare che gli animali testati per questa tesi vengono condotti al pascolo nella stagione primaverile

alimentandosi di erba fresca, è quindi probabile che riescano a ricostituire le riserve di vitamine, considerate fra i sistemi antiossidanti non enzimatici (Pisoschi, et al., 2015).

## 5.2 Asciutta VS Stress da caldo

Il confronto fra Asciutta e stress da caldo è riportato nelle tabelle successive ( Figura 17, Figura 20, Figura 23, Figura 26). Occorre ricordare che nel periodo in cui sono stati fatti i prelievi ematici il picco delle temperature ambientali era superiore ai valori medi stagionali rilevati negli anni precedenti.

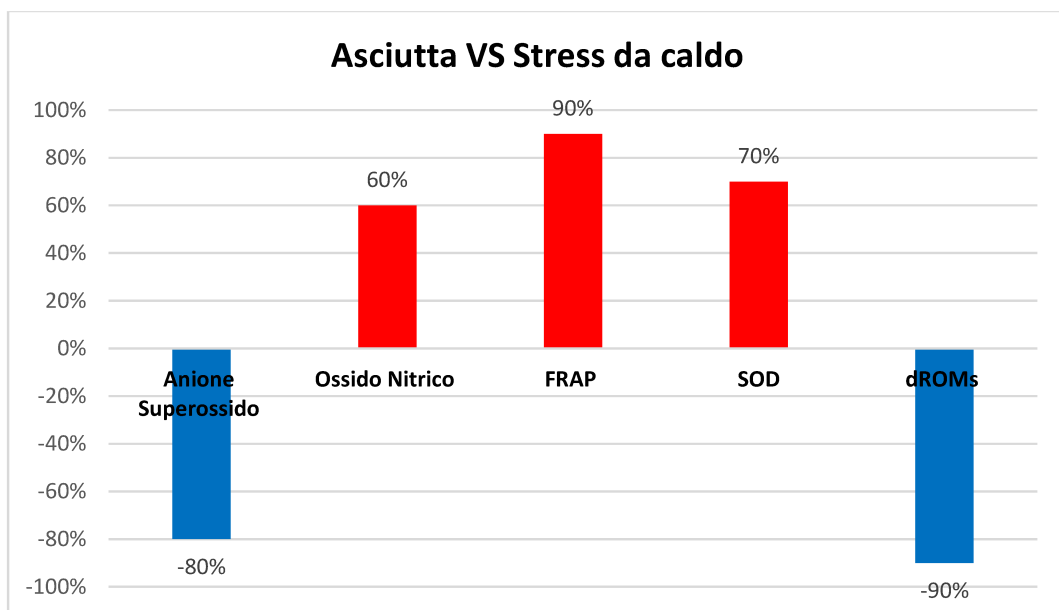


Figura 33. Grafico che evidenzia le principali differenze fra asciutta e lo stress da caldo dei vari parametri

Secondo Gonzales -Rivas et al (2020), l'esposizione degli animali a periodi di caldo intenso porta a stress da caldo il quale induce l'aumento di composti ossidanti e la minor efficienza dei sistemi di difesa e di conseguenza porta a stress ossidativo.

Nel nostro studio, invece, si nota che, rispetto alla fase di asciutta, durante lo stress da caldo aumentano i sistemi di difesa antiossidante (SOD aumenta nel 70%, FRAP nel 90%) e di conseguenza si riducono gli agenti ossidanti (WST riduce nel 80% e dROMs nel 90%), eccezione fatta per l'ossido nitrico il quale però ha anche molteplici funzioni come messaggero secondario e di conseguenza non è possibile stabilire quale sia il suo ruolo specifico. Anche in questo caso, è possibile che siano le riserve vitaminiche degli animali, accumulate adeguatamente al pascolo durante il periodo primaverile, che hanno consentito di far fronte a questa evenienza. Inoltre, si evidenzia che in questo allevamento

sono installati sistemi di ventilazione azionati nelle giornate più calde contribuendo a mitigare la tollerabilità allo stress termico.

### 5.3 Lattazione vs Stress da caldo

Infine, il terzo confronto è stato fatto fra Lattazione e Stress da caldo (Figura 19, Figura 25, Figura 22, Figura 31, Figura 34):

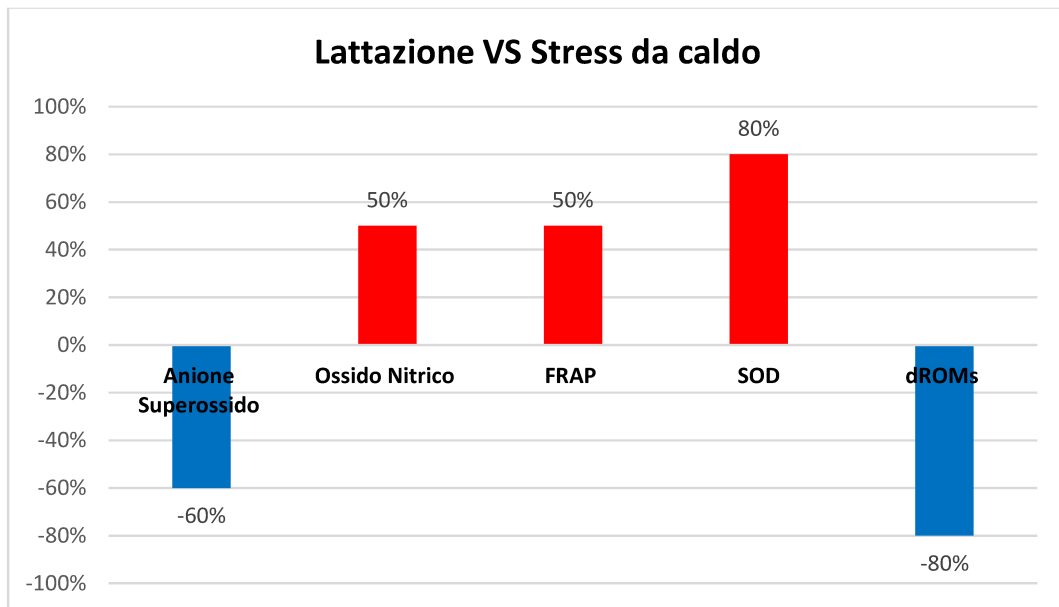


Figura 34. Grafico che evidenzia le principali differenze fra lattazione e lo stress da caldo dei vari parametri

Mentre negli altri confronti effettuati, la differenza fra le tendenze era netta, in questo caso abbiamo Ossido nitrico e FRAP che si riducono nella metà dei soggetti (e di conseguenza si alzano nell'altra metà), mentre aumenta SOD nell'80% dei soggetti e di conseguenza l'anione superossido si riduce (nel 60% degli animali), infine i dROMs scendono nell'80% degli animali.

Durante la lattazione gli animali hanno intensa attività metabolica per far fronte alle richieste energetiche da parte della mammella per la produzione di latte e di conseguenza questa intensa attività cellulare porta inevitabilmente a stress ossidativo (Gabai, et al., 2004). Gli animali oggetto di questo studio ancora una volta rispondono diversamente rispetto agli studi precedenti riferiti alla lattazione (Gabai, et al., 2004) probabilmente anche in questo caso è dovuto alla tipologia di allevamento e al pascolo, motivo per cui i valori non si discostano così tanto da quelli ottenuti durante lo stress da caldo.



## 6. Conclusioni

In conclusione, le diverse fasi di allevamento sembrano condizionare lo stato redox nelle capre.

Tuttavia, non si può uniformare questo concetto in quanto è necessario considerare che ogni animale risponde in maniera differente in base alle condizioni corporee, alla capacità di ingestione dell'alimento, alla produttività e allo stato di salute in cui si trova.

Gli studi presenti in letteratura evidenziavano come lo stato redox venga influenzato negativamente dalla fase di Asciutta, in cui il metabolismo è molto elevato per far fronte alla crescita dei feti e alle esigenze dell'organismo, ma anche in corso di Lattazione e Stress da caldo.

In questo studio è stato confermato come in asciutta lo stato redox degli animali viene influenzato negativamente in quanto composti ossidanti sono molto elevati e i sistemi di difesa antiossidante non sono sufficienti a contrastare l'attacco.

A differenza dei precedenti studi invece, è emerso che in lattazione e durante stress da caldo i sistemi antiossidanti rispondono in maniera efficiente e di conseguenza le tendenze sono meno elevate rispetto all'asciutta.

Il ruolo del pascolo primaverile evidentemente riesce a ripristinare le riserve vitaminiche e minerali e di conseguenza sono in grado di fronteggiare al meglio l'attacco dei radicali liberi. Certamente questa ipotesi necessiterà di una ulteriore conferma.

Partendo dal presupposto che in letteratura esistono pochi studi effettuati in materia sugli ovi-caprini, sarebbe opportuno effettuare ulteriori ricerche per approfondire questo argomento e valutare se esiste correlazione fra la clinica, la produttività e il comportamento del singolo animale e lo stato redox, oltre che valutare quali effetti possano avere i vari sistemi di allevamento e l'alimentazione somministrata, incentrandosi in particolare sull'utilizzo del pascolo.



## Bibliografia

- Andrei, S., et al. 2011.** Glutathione peroxidase activity and its relationship with somatic cell count, number of colony forming units and protein content in subclinical mastitis in cow's milk. *Romanian Biotechnological Letters*. 2011, Vol. 16.
- Andrei, S., et al. 2016.** Interrelationships between the content of oxidative markers, antioxidative status, and somatic cell count in cow's milk. *Czech Journal of Animal Science*. 2016, Vol. 61.
- Bagath, M., et al. 2019.** The impact of heat stress on the immune system in dairy cattle: a review. *Research in veterinary*. 2019, Vol. 126.
- Barbagallo, M. 2005.** *Stress Ossidativo ed Invecchiamento Cardiovascolare*. Palermo : s.n., 2005. p. 22.
- Barth, K., et al. 2010.** Somatic cell count, lactoferrin and NAGase activity in milk of infected and non-infected udder halves of dairy goats. *Small Ruminant Research*. 2010, Vol. 94.
- Batavani, R.A., Asri, S. e Naebzadeh, H. 2007.** The effect of subclinical mastitis on milk composition in dairy cows. *IJVR*. 2007, Vol. 8, 20.
- Bernabucci, U., et al. 2005.** Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2005, Vol. 88.
- **2002.** Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *Journal of Dairy Science*. 2002, Vol. 85.
- Bernabucci, U., et al. 2014.** The effects of heat stress in Italian Holstein dairy cattle. *Journal of dairy science*. 2014, Vol. 97.
- Bystrom , L.M., Guzman , M.L. e Rivella, S. 2014.** Iron and Reactive Oxygen Species: Friends or Foes of Cancer Cells? *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*. 2014, Vol. 20, 12.
- Calabresi, P. 2008.** *Enciclopedia della scienza e della tecnica*. s.l. : Treccani Editore, 2008.

- Celi, P. e Gabai, G. 2015.** Oxidant/antioxidant balance in animal nutrition and health: The role of protein oxidation. *Frontiers in veterinary science*. 2015, Vol. 2, 48.
- Celi, P. 2010.** The role of oxidative stress in small ruminants' health and production. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2010, Vol. 39.
- Celi, P., Di Trana, A. e Claps, S. 2010.** Effects of plane of nutrition on oxidative stress in goats during the peripartum period. *The Veterinary Journal*. 2010, Vol. 184.
- Chagunda, M., et al. 2006.** L-lactate dehydrogenase and N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase activities in bovine milk as indicators of non-specific mastitis. *Journal of Dairy Research*. 2006, Vol. 73.
- Chapple, I.L. 1997.** Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *Journal of clinical Periodontology*. 1997, 24.
- Chauhan, S.S., et al. 2014.** Antioxidant dynamics in the live animal and implications for ruminant health and product (meat/milk) quality: Role of vitamin E and selenium. *Animal production science*. 2014, 54.
- Cottrell, J.J., et al. 2015.** Nutritional strategies to alleviate heat stress in pigs. *Animal production science*. 2015, 55.
- De Luca, G. 2007.** *L'allevamento della capra*. Milano : Edagricole, 2007.
- De Rensis, F. e Scaramuzzi, R.J. 2003.** Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow - a review. *Theriogenology*. 2003, Vol. 60.
- Do Amaral, B.C., et al. 2009.** Heat-stress abatement during the dry period: does cooling improve transition into lactation? *Journal of Dairy science*. 2009, 92.
- Dreamstime.** Dreamstime. *Dreamstime*. [Online] [Riportato: 21 Agosto 2023.] <https://it.dreamstime.com/>.
- Droge, W. 2002.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. 2002, 82.
- Frei, B. 1994.** Natural Antioxidants in Human Health and Disease. *Academic press*. 1994.
- Gabai, G., et al. 2004.** Oxidative stress in primiparous cows in relation to dietary starch and the progress of lactation. *Animal Science*. 2004, Vol. 79.



**Gholamreza, Z., et al. 2019.** How can heat stress affect chicken meat quality? A review. *Poultry science*. 2019, 98.

**Gideon, Fleminger, et al. 2011.** Chemical and structural characterization of bacterially-derived casein peptides that impair milk clotting. *International Dairy Journal*. 2011, Vol. 21.

—. **2013.** Low molecular mass peptides generated by hydrolysis of casein impair rennet coagulation of milk. *International dairy Journal*. 2013, Vol. 30.

**Goetsch, A.L, Zeng, S.S e Gipson, T.A. 2011.** Factors affecting goat milk production and quality. *Small ruminants research*. 2011, Vol. 101.

**Gonzalez-Rivas, Paula A., et al. 2020.** Effects of heat stress on animal physiology, metabolism, and meat quality: A review. *Meat science*. 2020, Vol. 162.

**Greindling, K.K., et al. 2000.** Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2000, 20.

**Haenlein, G.F.W. 2004.** Goat milk in human nutrition. *Small ruminant Research*. 2004, Vol. 51.

**Herrera, E. e Barbas, C. 2001.** Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *j Physiol Biochem*. 2001.

**Ignarro, L.J. e Kadowitz, P.J.: 1985.** The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Ann. Pharmacology and Toxicology*. 1985, 25.

**Imik, H., et al. 2012.** Meat quality of heat stress exposed broilers and effect of protein and vitamin E. *British Poultry science*. 2012, 53.

**Imlay, James A. 2003.** Pathways of Oxidative Damage. *Annu Rev Microbiology*. 2003, 57.

**Jiménez-Granado, R., et al. 2014.** Factors affecting somatic cell count in dairy goats: a review. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2014, Vol. 12.

- Jones, S.A., et al. 1996.** Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *American journal of Physiology Heart Circ, Physiology.* 1996, 271.
- Keisari, Y., Braun, L. e Flescher, E. 1983.** The oxidative burst and related phenomena in mouse macrophages elicited by different sterile inflammatory stimuli. *Immunobiology.* 1983, 165.
- Kumar, R., et al. 2019.** Alterations in udder health indicators in goats with intramammary infection. *Indian journal of veterinary medicine.* 2019, Vol. 39.
- Lacetera, N., et al. 2006.** Heat stress elicits different responses in peripheral blood mononuclear cells from Brown Swiss and Holstein cows. *Journal of Dairy science.* 2006, 89.
- Larsen, T. 2005.** Determination of lactate dehydrogenase (LDH) activity in milk by a fluorometric assay. *Journal of Dairy Research.* 2005, Vol. 72.
- Le Maréchal, C., Thiéry, R. e Vautor, E. 2011.** Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review. *Dairy Science & Technol.* 2011, Vol. 91.
- Leitner, G., et al. 2004.** Factors influencing milk quantity and quality in Assaf sheep and goat crossbreds. *South African journal of animal science.* 2004, Vol. 34.
- Leitner, G., Merin, U. e Silanikove, N. 2004.** Changes in Milk Composition as Affected by Subclinical Mastitis in Goats. *Journal of dairy science.* 2004, Vol. 87.
- Miller, J.K., Brzezinska-Slebodzinska, E. e Madsen, F.C. 1993.** Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of Dairy Science.* 1993, Vol. 76.
- Min, B., Tomita, G. e Hart, S. 2007.** Effect of subclinical intramammary infection on somatic cell counts and chemical composition of goats' milk. *Journal of Dairy Research.* 2007, Vol. 74.
- Neufeld, G., et al. 1999.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB Journal.* 1999, 13.
- Newesholme, Philip and Cruzat, Vinicius and Keane, Kevin and Carlessi, Rodrigo and Homem de Bittencourt Jr, Paulo. 2016.** Molecular mechanism of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochemical Journal.* 12, 2016, Vol. 473.

**Novac, C.S. e Andrei, S. 2020.** The Impact of Mastitis on the Biochemical Parameters, Oxidative and Nitrosative Stress Markers in Goat's milk: a review. *Pathogens*. 2020, Vol. 9, 882.

**Odongo, N.E., et al. 2006.** Effects of mild heat stress and grain challenge on balance and rumen tissue histology in lambs. *Journal of animal science*. 2006, 84.

**Oliszewski, R., et al. 2002.** Assessment of  $\beta$ -Glucuronidase Levels in Goat's Milk as an Indicator of Mastitis: Comparison with Other Mastitis Detection Methods. *Journal of food protection*. 2002, Vol. 65.

**Olumee-Shabon, Z., et al. 2013.** Proteomic analysis of differentially expressed proteins in caprine milk during experimentally induced endotoxin mastitis. *Journal of Dairy science*. 2013, Vol. 96.

**Paape M.J., et al. 2001.** Milk Somatic Cells and Lactation in Small Ruminants. *Journal of dairy science*. 2001, Vol. 84.

**Padayatty, SJ, et al. 2003.** Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr*. 22 Febbraio 2003.

**Papachristou, T. 1994.** *Foraging behaviour and nutrition of goats grazing on shrublands of Greece*. 1994.

**Park, Y. W., et al. 2007.** Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminants Research*. 2007, Vol. 68.

**Pisoschi, A.M. e Pop, A. 2015.** The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015, 97.

**Poli, G, et al. 2004.** Oxidative stress and cell signalling. *Current medicinal Chemistry*. 2004, 11.

**Polsky, L. e Von Keyserlingk, M.A.G. 2017.** Invited review: Effects of heat stress on dairy cattle welfare. *Journal of dairy science*. 2017, Vol. 100.

**Pyörälä, Satu. 2003.** Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary research*. 2003, Vol. 5, 34.

**Quintavalla, F., Martelli, P. e Franzoni, F. 1991.** Aspetti clinici e metabolici nello stress termico nella vacca da latte. *Atti della società Italiana di Buiatria*. 1991, Vol. 23.

- Ramon-Moragues, A., et al. 2021.** Dairy cows activity under heat stress: a case study in Spain. *Animals*. 2021, Vol. 11.
- Ranadheera, C.S., et al. 2019.** Probiotics in Goat Milk Products: Delivery Capacity and Ability to Improve Sensory Attributes. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2019, Vol. 18.
- Rubino, R., et al. 1995.** Milk production of goats grazing native pasture under different supplementation regimes in southern Italy. *Small Ruminants research*. 1995, Vol. 17.
- Sies, Helmut. 1995.** Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Physiological society symposium*. 1995, Vol. -.
- Silanikove, N., et al. 2009.** Hydrogen Peroxide-Dependent Conversion of Nitrite to Nitrate as a Crucial Feature of Bovine Milk Catalase. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 2009, Vol. 57.
- Silanikove, N., et al. 2010.** Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. *Small Ruminants Reserach*. 2010, Vol. 89.
- Silanikove, N., et al. 2005.** Role of xanthine oxidase, lactoperoxidase, and NO in the innate immune system of mammary secretion during active involution in dairy cows: manipulation with casein hydrolyzates. *Free radic Biol med*. 2005, Vol. 38.
- Silanikove, N., et al. 2014.** Subclinical mastitis in goats is associated with upregulation of nitric oxide-derived oxidative stress that causes reduction of milk antioxidative properties and impairment of its quality. *Journal of Dairy Science*. 2014, Vol. 97.
- Silanikove, N., Merin, U. e Leitner, G. 2006.** Physiological role of indigenous milk enzymes: An overview of an evolving picture. *International Dairy Journal*. 2006, Vol. 16.
- Smirnoff, N. 2001.** L-ascorbic acid biosynthesis. *Vitamins & Hormons*. 2001, Vol. 61.
- Sordillo, L.M., et al. 2007.** Shifts in thioredoxin reductase activity and oxidant status in mononuclear cells obtained from transition dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 2007, Vol. 90.
- Stuhr, T., et al. 2013.** Influence of udder infection status on milk enzyme activities and somatic cell count throughout early lactation in goats. *Small Ruminant Research*. 2013, Vol. 111.

- Thannickal, V.J. e Fanburg, B.L. 1995.** Activation of an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1. *American journal of Physiology Lung Cell. Mol. Physiology.* 1995, 279.
- **2000.** Reactive oxygen species in cell signaling. *American journal of Physiology-Lung cellulare and molecular Physiology.* 2000, 279.
- Valko, M., et al. 2007.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2007, 39.
- Valko, M., et al. 2006.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions.* 2006, 160.
- Vitali, A., et al. 2009.** Seasonal pattern of mortality and relationships between mortality and temperature humidity index in dairy cows. *Journal of dairy science.* 2009, Vol. 92.
- Wang, R.H., et al. 2017.** Effect of acute heat stress and slaughter processing on poultry meat quality and postmortem carbohydrate metabolism. *Poultry science.* 2017, 96.
- West, J.W. 2003.** Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *Journal of dairy production.* 2003, 86.
- Wolin, M.S., Burke-Wolin, T.M. e Mohazzab-H, K.M. 1999.** Roles of NADPH oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms. *Respir. Physiol.* 1999, 115.
- Yadav Kuvar, A., Singh, J. e Yadar Kumar, S. 2016.** Composition, nutritional and therapeutic values of goat milk: A review. *Asian Journal of Dairy and Food Research.* 2016, Vol. 35.
- Yousef, M.K. 1984.** Thermoneutral zone. *Stress Physiology in livestock: Basic principles.* 1984, 1.
- Zhao, X. e Lacasse, P. 2008.** Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *Journal of animal science.* 2008, Vol. 86.