

## Progetto IMMA (D.M. 16850/7303/2016)

### “Identificazione di marcatori immunologici per lo studio del benessere animale”

#### Introduzione

Il progetto si inserisce nell’ambito della linea di ricerca sulla resistenza alle malattie e lo studio del sistema immunitario. Nell’ambito di questa tematica, il progetto IMMA ha assunto un carattere di novità, in quanto per lo studio del sistema immunitario è stata utilizzata una mandria sperimentale del Centro Zootecnia e Acquacoltura del CREAdi Monterotondo, che è il frutto dell’incrocio tra due razze da latte, la Frisona Italiana e la Pezzata Rossa Italiana. Questa mandria è stata costituita in un precedente progetto, il progetto REDBOV, nell’ambito di un filone di ricerca sulla longevità delle vacche, allo scopo di verificare se l’utilizzo dell’incrocio tra razze da latte, potesse dare animali più longevi. In effetti, rispetto alla Frisona, la Pezzata Rossa, oltre a presentare caratteristiche superiori nella produzione di carne e nella qualità del latte, è una razza meno soggetta a malattie (mastiti, patologie dell’apparato locomotore) e a ipofecondità, ed è anche considerata una razza più longeva.

#### Stato dell’arte

La selezione genetica delle bovine da latte per la produzione ha portato inevitabilmente a problemi di consanguineità e con questo ad un indebolimento del sistema immunitario. Infatti, la depressione da *inbreeding* riduce la resistenza alle malattie; le vacche nel post-parto risultano più suscettibili alle infezioni quali mastiti, endometriti e zoppie e ciò porta di conseguenza ad una riduzione della fertilità e della produttività e ad un inevitabile aumento dei costi per la gestione degli animali e dell’azienda.

Per quanto riguarda lo stato di salute O’Brien and Everman (1988) hanno suggerito che il sistema immunitario può essere compromesso nelle popolazioni con elevato *inbreeding* derivante dalla riduzione della variabilità genetica.

Cartwright et al., (2011) hanno dimostrato che i vitelli di razza pura Holstein hanno ridotta produzione di anticorpi rispetto ai vitelli frutto di incrocio Norwegian Red vs Holstein.

Mendoca e collaboratori (2010;2013) hanno osservato che le bovine di razza pura Holstein hanno più probabilità di sviluppare infezioni intrauterine nel post-partum, una ridotta capacità fagocitaria

al giorno del parto e una ridotta espressione della molecola CD18 durante il periparto rispetto all'incrocio con la razza Montbeliarde.

Inoltre, studi recenti riportano l'identificazione di parametri immunologici correlati a caratteri produttivi, riproduttivi e di salute nelle bovine da latte (Banos et al., 2013).

La conoscenza di parametri per valutare le caratteristiche della risposta immunitaria sia innata che adattativa negli animali da incrocio è ancora molto limitata.

L'opportunità di avere a disposizione non solo due razze pure ma anche il prodotto del loro incrocio è stato particolarmente utile in questo progetto per stimare e valutare l'effetto dell'eterosi sulle meticce, dei parametri immunologici, produttivi, riproduttivi, di salute e di longevità.

Negli ultimi anni è cresciuto l'interesse per la pratica dell'incrocio fra razze specializzate da latte, che viene visto anche come un uovo approccio alla sostenibilità delle produzioni animali nei sistemi zootecnici. Questo sistema riproduttivo, da tempo consolidato nelle produzioni avicole e suinicole, ha l'obiettivo di poter sfruttare l'effetto dell'eterosi per migliorare l'efficienza produttiva, riproduttiva e la resistenza alle malattie. Infatti, l'incrocio viene utilizzato con l'intento di migliorare caratteristiche fenotipiche come salute, fertilità, longevità, attraverso i benefici dell'eterosi. Questo effetto si verifica perché l'incrocio azzerava la consanguineità. Generalmente, l'eterosi esercita maggiori effetti positivi sulla resistenza alle malattie, la rusticità e sulle "caratteristiche vitali" dei soggetti meticci, ovvero su caratteri a bassa ereditabilità.

L'eterosi viene definita come la deviazione (positiva o negativa) della media fenotipica dei soggetti meticci rispetto alla media fenotipica delle razze parentali per il carattere considerato.

L'utilizzo dell'incrocio, tuttavia, non esclude la necessità di svolgere un'attività di selezione per migliorare le razze in purezza affinché si possa beneficiare di effetti positivi nelle generazioni dell'incrocio.

Lo studio dei componenti del sistema immunitario tra razza pure e incrocio è un approccio valido per esaminare l'effetto dell'eterosi sui parametri immunitari nelle bovine da latte.

L'immunità innata svolge un ruolo fondamentale sulla salute delle vacche da latte durante il periodo di transizione, le 3 settimane prima e le 3 dopo il parto. Durante questo periodo la funzionalità e l'attività dei neutrofili è di particolare importanza perché queste cellule sono coinvolte nell'espulsione della placenta dopo il parto e perché il neutrofilo è la prima linea di difesa dell'utero contro i patogeni invasori. Inoltre, la funzionalità di questi leucociti è influenzata anche dallo squilibrio energetico del periparto.

È sempre più evidente che la suscettibilità alle malattie negli animali in produzione zootecnica occupa un ruolo importante nelle priorità dei settori della ricerca. Il benessere e la salute dell'animale costituiscono un pilastro della politica comunitaria per la salute pubblica e la sicurezza alimentare. Un aspetto importante che bisogna considerare è il concetto "One-Health" che sintetizza come la salute animale, la salubrità dei prodotti e la salute dell'uomo siano strettamente inter-

connessi. Secondo questa visione è necessario riguadagnare la fiducia dei consumatori, che desiderano da un lato il benessere animale e dall'altro avere prodotti di qualità. Pertanto, il miglioramento delle condizioni di benessere animale viene visto dal cittadino come una indicazione di un sistema di allevamento sostenibile e di buona qualità del prodotto.

La sfida del futuro, non solo per l'allevamento dei bovini da latte, ma per tutti gli animali in allevamento zootecnico, sarà cercare di bilanciare alti livelli di produzione con il mantenimento di uno stato di buona salute e di benessere dell'animale. In aggiunta, l'allevamento animale dovrebbe tener conto dell'obiettivo di selezionare animali più robusti e resistenti nel tempo; perciò è importante identificare i tratti più idonei (cioè quelli che meglio ci permettono di valutare il fenotipo degli animali). Per fare questo bisogna adottare un approccio animal-based, cioè il monitoraggio degli animali a livello individuale, attraverso la valutazione di un certo numero di parametri, solubili e cellulari ma anche genetici. In accordo ai più recenti orientamenti scientifici infatti, la Commissione Europea (<http://www.efsa.europa.eu/it/topic/animalwelfare.htm>) reputa necessaria l'elaborazione di indici misurabili del benessere animale.

Ad oggi sono pochi gli studi immunologici effettuati sugli animali meticcii, in particolare, tra Frisona italiana e Pezzata Rossa italiana. Pertanto, l'obiettivo degli studi effettuati nel progetto IMMA è stato quello di verificare se gli animali dell'incrocio avesse una migliore risposta immunitaria innata e adattativa durante il periodo del parto rispetto alle razze pure.

### **Metodologia**

Per lo studio dei parametri immunitari è stata utilizzata la citofluorimetria, una tecnologia avanzata che ha un grande potere informativo. Questa metodologia consente di effettuare una valutazione multiparametrica per ogni campione grazie alla possibilità di sviluppare metodiche di marcatura multi-color rilevando contemporaneamente più marcatori cellulari.

La citofluorimetria sta raggiungendo una fase di grande sviluppo in ambito clinico e di ricerca, poiché sono stati messi a punto metodi robusti e ad elevate prestazioni che consentono di effettuare misurazioni altamente riproducibili su larga scala riducendone i costi (Maecker et al., 2010; Wilkerson et al., 2012).

Considerando questo approccio metodologico, il progetto IMMA ha carattere di novità in quanto queste tecniche citofluorimetriche utilizzate in medicina umana non hanno ancora trovato ampia applicazione in zootecnia.

Per la determinazione dei parametri metabolici è stata utilizzata la strumentazione ILAB; per la quantificazione delle citochine è stata utilizzata la tecnologia ELISA; infine per la determinazione delle molecole dello stress ossidativo e della capacità antiossidante sono stati utilizzati kit colorimetrici.

### **Piano sperimentale**

Il campionamento ha avuto la durata di 11 mesi, da gennaio 2018 a dicembre 2018.

Sono state arruolate nella prova 40 bovine di cui 10 Frisone di, 10 Pezzate Rosse, 20 meticce frutto dell'incrocio di prima generazione (Madre di razza Frisone e padre di razza Pezzata Rossa).

Gli animali sono stati seguiti nel periparto da -30 a +60 gg dopo il parto, con prelievi ogni 15 giorni.

### **Obiettivi del progetto**

L'obiettivo generale del progetto era l'individuazione di un pannello di marcatori immunologici e metabolici indicatori di benessere animale.

Questo obiettivo principale è stato perseguito attraverso una serie di obiettivi specifici:

- 1) Individuare e studiare parametri indicatori di una maggiore capacità di risposta immunitaria a situazioni di stress come il periparto.
- 2) Verificare l'effetto dell'eterosi per mezzo di fenotipi di tipo immunologico.
- 3) Individuare fenotipi da utilizzare per l'identificazione di animali più «robusti e longevi con potenziate capacità di risposta immunitaria e quindi più idonei per sistemi produttivi di tipo intensivo.
- 4) Tutto ciò con obiettivo finale di migliorare e perfezionare il servizio di assistenza agli allevatori della bovina da latte.

### **Immunofenotipizzazione**

La caratterizzazione del sistema immunitario innato e adattativo è stata effettuata mediante la determinazione dell'andamento dei principali subset leucocitari (linfociti T e i loro subset, linfociti B, monociti, neutrofili, eosinofili, cellule Natural Killer) e del rapporto CD4/CD8.

La letteratura ha messo in evidenza come molti di questi parametri immunologici sembrano avere una significativa variabilità individuale e quindi possono venire alterati dalla selezione (Banos et al., 2013).

I risultati del nostro studio hanno messo in evidenza i seguenti risultati:

- 1) Gli animali meticci e quelli da razza Pezzata Rossa hanno valori medi di neutrofili e monociti al parto significativamente più bassi rispetto alle Frisone;
- 2) Le Pezzate Rosse hanno valori medi di Linfociti T al parto significativamente più alti delle Meticce e delle Frisone;
- 3) Le Meticce hanno valori medi di Linfociti B ed NK al parto più alti delle Frisone e delle Pezzate Rosse;
- 4) In tutte e tre le razze si osserva una diminuzione dei valori medi dei Linfociti CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>.

Dalla valutazione dell'eterosi, intesa come condizione per cui i prodotti dell'accoppiamento di individui appartenenti a determinate linee sono superiori alla media delle popolazioni parentali, ha evidenziato in modo significativo come parametri immunitari hanno caratteristiche di miglioramento nell'incrocio rispetto alle razze parentali.

## **Analisi quantitativa del CD62L e del CD11b**

Oltre all'immunofenotipo, è stata valutata anche la risposta immunitaria innata attraverso lo studio di molecole di adesione presenti sulla membrana dei neutrofili.

E' stata quantificata l'espressione dell'L-selectina (CD62L) e della  $\beta$ -integrina (CD11b), due indicatori della capacità di risposta di queste cellule all'aggressione da patogeni.

In particolare, L-selectina è una molecola di adesione che media il contatto dei neutrofili circolanti con l'endotelio vascolare consentendo il flusso veloce delle cellule, il contatto e il rotolamento lungo la parete del vaso sanguigno, allo scopo di catturare i segnali di infezione che arrivano attraverso le citochine, in tal caso il neutrofilo perde la L-selectina e per diapedesi passa dal circolo ai tessuti. Le molecole di L-selectina presenti sui neutrofili sono di fondamentale importanza per il successo della risposta infiammatoria che porta all'eliminazione del patogeno dai siti di infezione.

Nelle vacche da latte è stato visto che in corrispondenza di un innalzamento di cortisolo al parto corrisponde una diminuzione dei livelli di L-selectina, pertanto i neutrofili hanno ridotta capacità di migrare dal sangue nei tessuti.

La diminuzione dell'espressione della L-selectina sui neutrofili è associata ad una de-regolazione del sistema immunitario delle bovine dopo il parto.

Il CD11b è una proteina di membrana dei leucociti, anch'essa coinvolta nella migrazione delle cellule dal sangue ai tessuti.

La letteratura riporta che in seguito a stimoli infiammatori (LPS, IL1, citochine pro-infiammatorie) che l'espressione quantitativa di questa molecola aumenta sulla superficie del neutrofilo, mentre l'espressione del CD62 diminuisce.

La molecola del CD11b e del CD62L sono importanti per il mantenimento di uno stato di salute dell'animale e una loro disfunzione potrebbe portare a infezioni e stati di malattia cronica, come è stato osservato nell'uomo.

In IMMA sono state studiate queste molecole allo scopo di vedere eventuali differenze di espressione nelle 3 razze nel momento del parto (evento stressogeno per la bovina da latte).

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che i livelli di espressione del CD62, in valore assoluto, sono più alti nella Pezzata Rossa rispetto alla Frisona; inoltre è stato visto come l'espressione di questa molecola nella razza Frisona abbia una elevata variabilità individuale, in particolare al momento del parto.

Interessante è stata l'osservazione che gli animali di razza meticciana hanno una minore variabilità individuale rispetto alle razze pure.

L'analisi quantitativa del CD11b ha evidenziato, in accordo con la letteratura, che al parto l'espressione di questa molecola sui neutrofili aumenta significativamente nelle 3 razze e che l'espressione risulta più bassa nella pezzata Rossa rispetto alla Frisona e alla meticciana.

Questo dato potrebbe far pensare che la Pezzata Rossa possa, al momento del parto, compensare meglio l'immunodepressione mostrando migliori condizioni di resistenza ad un evento stressogeno. Poiché la L-selectina e la  $\beta$ -integrina sono molecole la cui espressione viene regolata da fattori stressogeni, è importante valutarne l'espressione mediante analisi quantitative.

### **Parametri metabolici e di stress**

Per avere un quadro completo dello stato metabolico e di salute delle bovine, sono stati valutati anche i principali parametri metabolici in particolare: gli indici epatici e di sofferenza muscolare, (Bilirubina totale, AST, ALT, ALP CK).

È stato valutato il metabolismo energetico con la determinazione delle concentrazioni di glucosio e degli acidi grassi non esterificati liberati dal tessuto adiposo (NEFA). Inoltre, è stata valutata la concentrazione plasmatica di chetoni in circolo tramite la rilevazione del  $\beta$ -Idrossibutirrato (BHB). È stato valutato anche il metabolismo proteico attraverso la quantificazione delle proteine totali, dell'urea, e della Creatinina

Poiché la letteratura evidenzia come lo stress ossidativo sia coinvolto in diverse malattie e disordini metabolici, sono stati considerati i profili plasmatici di bio-marcatori di stress ossidativo come le proteine della fase acuta (APP) sia quelle positive che quelle negative. Queste proteine plasmatiche, considerate componenti del sistema immunitario innato, sono influenzate da infiammazioni, traumi, stress e sono coinvolte nel ripristino dell'omeostasi prima che l'animale sviluppi una risposta immunitaria acquisita. Tra le APP positive sono state prese in considerazione l'aptoglobina (Hp) e la siero amiloide (SSA). Sono glicoproteine sintetizzate dalle cellule epatiche sotto stimolazione di citochine pro-infiammatorie poi riversate nel sangue. Tra le APP negative, l'albumina.

Sono state analizzate anche le citochine pro infiammatorie IL-6 e il fattore di necrosi tumorale (TNF-alfa).

Mediante test colorimetrici sono state misurate le concentrazioni dei metaboliti reattivi dell'ossigeno (d-ROM) e il potenziale biologico antiossidante (BAP).

### **Studi in vitro**

Infine, il progetto ha previsto degli studi in vitro. Sono state purificate le cellule monocucleate dal sangue periferico (PBMC) da un limitato numero di animali appartenente ai 3 gruppi genetici.

Sono state messe in coltura e poi stimulate o con estratti batterici (LPS) per valutarne lo stato di attivazione ( $CD4^+/CD25^+$ ) e con forti induttori di danno e stress cellulare, (PMA e  $H_2O_2$ ) allo scopo di valutare, nei 3 gruppi genetici, la risposta individuale a stimoli esogeni.

Nell'ambito degli studi in vitro, la citofluorimetria ha permesso di valutare anche l'attività di enzimi intra-citoplasmatici. È stata studiata l'attività degli enzimi coinvolti nei processi di apoptosi e di risposta al danno ossidativo come PARP1 e Caspasi-3. Questi studi rivestono carattere di assoluta novità in ambito veterinario. L'enzima PARP svolge un ruolo chiave nell'infiammazione, in quanto

si attiva in seguito a danno al DNA e quando è in atto un processo infiammatorio in cui le specie altamente reattive dell'ossigeno causano danni cellulari. Negli ultimi dieci anni, un gran numero di studi condotti sull'uomo ha verificato il ruolo dell'attivazione PARP-1 in un'ampia gamma di condizioni fisiopatologiche. Per la prima volta questo studio è stato applicato agli animali in produzione zootecnica e ha fornito nuove informazioni sul coinvolgimento di questi marcatori nelle malattie dei bovini.

### **Studio dell'attività dell'enzima PARP1**

Il progetto ha permesso di caratterizzare l'attività di PARP1 nella specie bovina.

PARP-1 è un enzima che catalizza la sintesi di polimeri ramificati di ADP ribosio (PAR) a partire dal NAD<sup>+</sup>. La poli(ADP)ribosilazione è una modificazione post-traslazionale di proteine cellulari e viene attivata in seguito al danno al DNA. Negli ultimi venti anni è cresciuta la letteratura che ha rivelato altri ruoli, oltre a quello di enzima del riparo. PARP è infatti coinvolta nel rimodellamento della cromatina, nella modulazione del profilo di metilazione e nella regolazione della trascrizione.

Numerosi studi inoltre, hanno dimostrato che PARP1 è coinvolta in diverse malattie infiammatorie incluso il cancro ed è stato osservato come PARP1 sia attiva durante l'infiammazione regolando numerosi eventi dei processi infiammatori.

Nel progetto IMMA, PARP1 è stato caratterizzato sia a livello di espressione della proteina e del gene che il livello di attivazione nella infiammazione da mastite.

I risultati dello studio hanno evidenziato un'espressione differenziale dell'enzima nei linfociti rispetto ai monociti ed interessanti evidenze sul suo coinvolgimento durante una infiammazione da mastite.

Studi di stimolazione in vitro hanno rivelato che c'è una differente risposta immunitaria tra razza Frisona e razza Pezzata Rossa per quanto riguarda la capacità di attivare PARP e di attivare il processo apoptotico. Questa evidenza potrebbe tradursi in una maggiore capacità della Pezzata Rossa di regolare le riserve di NAD<sup>+</sup> cellulari per il mantenimento delle principali attività della cellula. La capacità di una cellula di andare in apoptosi infatti offre un vantaggio. Lo stimolo stressogeno infatti tende ad attivare troppo la PARP e a consumare le riserve di NAD e ATP, con conseguente morte della cellula per necrosi. Se invece viene attivato il meccanismo dell'apoptosi i processi infiammatori, così come la produzione di citochine pro-infiammatorie, vengono contenuti.

In conclusione, lo studio su PARP ha apportato nuove e interessanti informazioni ed evidenze sul coinvolgimento di PARP nella risposta immunitaria nel bovino.

### **Studio dei polimorfismi del CD4**

Infine, nel corso dell'analisi dell'immunofenotipo degli animali della prova IMMA è stata osservata un fenomeno interessante: la mancanza di legame tra l'antigene CD4 e il clone anticorpale monoclonale CC8 utilizzato per riconoscere il CD4 bovino. Ad oggi la letteratura non ha riportato

nessun legame anomalo tra questo clone e l'antigene CD4. L'antigene CD4 ha un'importante funzione accessoria nell'interazione tra linfociti T e cellule presentanti l'antigene (APC).

Nel nostro studio l'analisi citofluorimetrica delle popolazioni leucocitarie ha rivelato che in 3 soggetti di razza Pezzata Rossa il clone CC8 non riconosce l'antigene normalmente espresso dai linfociti T. Lo studio è stato approfondito, sia a livello di trascritto che a livello genetico mediante il sequenziamento diretto per identificare eventuali polimorfismi causa di questa mancanza di legame tra antigene e anticorpo. Tra gli 8 nuovi SNPs identificati nelle sequenze codificanti ed introniche fiancheggianti, 2 sono risultati essere delle sostituzioni causative di cui uno è un possibile sito di glicosilazione.

Ulteriori studi sono in corso per verificare l'esistenza di aplotipi genetici che caratterizzano di una differente funzionalità dei linfociti CD4.

## **Conclusione**

Questo progetto è stato innovativo per due aspetti fondamentali:

### **1) Applicazione della citofluorimetria:**

- a) Sono stati messi a punto dei pannelli multi-color per l'analisi citofluorimetrica che potrebbero permettere una prosecuzione high-throughput per definire l'immunofenotipo (immunofenotipizzazione)
- b) Per la prima volta in ambito veterinario, abbiamo effettuato l'analisi quantitativa di molecole dell'immunità innata con metodica ABC (Antibody Binding Capacity), ad oggi applicata solo in ambito umano.
- c) Sono stati individuati e studiati dei marcatori intra-citoplasmatici indicatori di danno cellulare e stress ossidativo (studio di PARP).
- d) Infine, è stato messo in evidenza come la citofluorimetria può essere utilizzata per l'identificazione di polimorfismi genetici (studio del CD4).

### **2) Utilizzo della mandria sperimentale dell'incrocio**

- a) Sono stati valutati i parametri immunitari nel periparto dei 3 gruppi genetici ed è emerso che i parametri analizzati hanno una grande variabilità individuale.
- b) È stata valutata l'eterosi per i fenotipi immunologici ed è emerso come molti parametri immunitari hanno caratteristiche di miglioramento nell'incrocio rispetto alle razze parentali.

Nell'insieme questo studio ha apportato un notevole contributo alle conoscenze sui meccanismi di difesa immunitaria nella bovina da latte, utili per descrivere ed identificare meglio gli animali con potenziate capacità immunitarie, più resistenti e più adatti a condizioni di allevamento intensivo.

In conclusione, i fenotipi studiati, fornendo nuove informazioni sullo stato di salute e di benessere dell'animale, potrebbero, in futuro essere utilizzati nell'ambito di un servizio di assistenza agli



allevatori dei bovini da latte e in prospettiva come fenotipi da selezionare mediante appositi programmi di miglioramento genetico.