

Andamento del profilo plasmatico degli acidi grassi nel primo anno di vita in cani displasici e non: risultati preliminari

Plasmatic fatty acid profile during the first year in dogs with dysplasia or not: preliminary results

Tidu L, Bacciu N¹, Rucco G², Mellano L³, Pizzi C, Renaville B⁴

Centro Militare Veterinario, Grosseto; ¹agn Genetics GmbH, Davos; ²Comando Logistico dell'Esercito, Roma; ³Ospedale Militare Veterinario, Montelibretti; ⁴Dipartimento Scienze degli Alimenti, Udine.

SUMMARY

At the Military Veterinarian Center of Grosseto, where operative dogs from the Italian army are raised and trained up, more than 70% of the discharges for unfitness are due to articular pathologies like hip and elbow dysplasia. The aim was to study, with regards to the development of dysplasia, fatty acid metabolism of dogs during the growing phase and its modulation by a fish based diet. Unfortunately, only 2 out of the 20 subjects were affected by articular pathologies. Still, both subject had lower levels of arachidonic and docosahexaenoic acids. Moreover, we observed that the ratio of eicosapentaenoic to docosahexaenoic acids, indicator of the delta-6 desaturase activity, drops dramatically during the first year in German shepherd.

KEY WORDS

Dog, dysplasia, fatty acids

TRICHIASI

La displasia dell'anca e quella del gomito sono tra le più comuni malattie articolari nei cani di grande taglia e l'osteoartrosi che ne consegue provoca dolore e zoppia.⁽¹⁾ Lo sviluppo di queste patologie è su base genetica nonostante l'ambiente possa influenzarlo notevolmente.⁽²⁾ Tra i fattori ambientali, la nutrizione sembra essere uno dei più importanti. Per esempio si è visto che il grasso alimentare può interagire con il metabolismo osseo. Infatti, i lipidi alimentari influenzano il bilancio adipociti/osteoblasti e possono promuovere una neosintesi di grasso nel midollo. Melhus e coll.⁽³⁾ hanno dimostrato che il rischio di fratture in uomini anziani è strettamente correlato all'attività della Stearoyl-CoA desaturase (SCD). Altri studi hanno messo in evidenza come una dieta particolarmente ricca di acido palmitico provoca una riduzione della concentrazione di calcio nelle ossa. È noto anche che gli eicosanoidi, ormoni che agiscono generalmente a livello locale come sostanze proinfiammatorie, vengono sintetizzati a partire da un acido grasso della serie omega 6 come l'acido arachidonico (20:4 ω -6).

Tra gli eicosanoidi, la prostaglandina PGE₂, per esempio, è nota essere un mediatore importante della rimodulazione ossea inducendo la formazione degli osteoclasti e stimolando la sintesi di collagene e fibronectina da parte degli osteoblasti. Oltre all'acido arachidonico,

sono prodotti fisiologicamente attivi altri acidi grassi a lunga catena (LC-PUFA) come l'acido eicopentanoico EPA (20:5 ω -3) e l'acido decosaesanoico DHA (22:6 ω -3). Alcuni lavori sul metabolismo dei mediatori lipidici nella flogosi acuta, hanno rivelato, infatti, che esistono mediatori "omega-3 derivati" presenti negli essudati sotto forma di "E-series Resolvin" (Resolvin E1-RvE1) derivati dell' EPA, "D-series Resolvin" e fattori di protezione D1 derivati dal DHA.

La loro funzione sarebbe quella di risolvere il processo infiammatorio e di proteggere i tessuti colpiti mediante la rimozione delle chemokine proinfiammatorie veicolate dai neutrofili apoptotici e dalle cellule T.⁽¹²⁾

Altri lavori che riguardano l'efficacia in vitro di tre diversi acidi grassi della serie omega-3 PUFA: "acido alpha-linoleico", "EPA", "DHA"; hanno dimostrato che questi riducono l'RNA-messaggero per le proteinasi: "ADAMTS-4" e "ADAMTS-5", responsabili della degenerazione cartilaginea, e per le matrici-metalloproteinasi: "MMP-3" e "MMP-13", coinvolte nella mediazione del processo artrite/artrosico.

Gli omega-3, riducono inoltre i livelli di RNA-m per COX2 e per citokine infiammatorie, fattore di necrosi tumorale-alpha (TNF-alpha), interleukina-1alpha (IL-1alpha) e interleukina-1beta (IL-1beta). In particolare risulta che "EPA" sia, in questo senso, il più efficace degli Acidi Grassi testati.

È stato dimostrato, nelle stesse pubblicazioni, che

era anche possibile modificare l'olio di palma tramite un'esterificazione con "EPA" per ottenere un composto con proprietà antiinfiammatorie.⁽⁶⁾

Infatti, l'olio di palma EPA-arricchito è in grado di ridurre l'IL-1 che regola l'espressione di "ADAMTS-4", "COX-2", "TNF- α ", "IL-1 α " e "IL-1 β ".

I livelli e la composizione di LC-PUFA nell'organismo sono altamente dipendenti dalla loro introduzione con la dieta o dalla introduzione dei loro precursori. Un importante apporto di LC-PUFA è dato infatti dalla sintesi a partire dall'acido essenziale linoleico (18:2 ω -6) e di α -linoleico (18:3 ω -3) per conseguenti desaturazioni e allungamenti della catena. I più importanti enzimi che entrano in atto in questa reazione di trasformazione a cascata sono la Δ 5 o

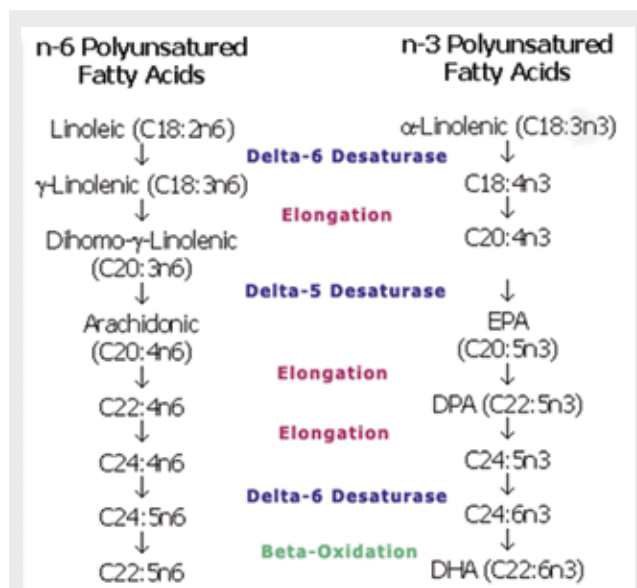


Fig. 1: la figura mostra le vie di sintesi di acido Arachidonico e di DHA a partire dai rispettivi precursori.

FADS1 e la Δ 6 o FADS2 desaturasi.

Alcuni studi condotti sui cani hanno dimostrato che l'aumento della concentrazione di acidi grassi polinsaturi nella dieta migliora le condizioni cliniche degli animali affetti da artrite/artrosi. In particolare Rush J. K. et al.⁽⁹⁾, in un lavoro del gennaio 2010, hanno studiato due gruppi di cani affetti da artrite e sottoposti a diete diverse: l'una standard, l'altra integrata con "acidi grassi ω -3 terminali". I cani sottoposti alla dieta integrata presentavano maggiori concentrazioni di "acidi grassi ω -3 terminali" nel sangue e manifestavano migliori performance nell'esecuzione del comando "resta" e nel gioco.

In uno studio contemporaneo, Fritch et al.,⁽¹⁰⁾ hanno somministrato un mangime addizionato di olio di pesce (3,5%) ricco di "acidi grassi ω -3" a un gruppo di cani affetti da osteoartrite. A distanza di 45 e 90 giorni dall'inizio della sperimentazione gli animali sono stati sottoposti ad una valutazione con metodo "force-plate analysis" che ha evidenziato il miglioramento delle condizioni delle loro articolazioni¹¹.

SCOPO DEL LAVORO

Dall'esperienza maturata al Centro Militare Veterinario di Grosseto, in cui si allevano e addestrano i cani operativi dell'Esercito Italiano, è emerso che oltre il 70% delle cause di riforma dal servizio attivo di cani operativi sono dovute a patologie articolari come la displasia dell'anca e la displasia del gomito.

Vista la loro alta incidenza nelle razze impiegate (Pastore Tedesco e Pastore Belga Malinois) e la non esistenza di terapie efficaci nella osteoartrite che ne consegue, in questo lavoro ci si è proposti di studiare il profilo plasmatico di LC-PUFA in cuccioli in accrescimento e di verificarne l'efficacia nella prevenzione delle patologie osteo-articolari tramite una loro integrazione con l'alimentazione.

MATERIALI E METODI

L'indagine si è svolta su 20 cuccioli di cani da lavoro dell'Esercito Italiano, nati e allevati presso le strutture del Centro Militare Veterinario di Grosseto. Sono state studiate una cucciolata di pastore belga (7 soggetti), tre di pastori tedeschi (6 soggetti) e una di meticci (7 soggetti). Ogni cucciolata è stata divisa in due gruppi. Un gruppo di soggetti è stato alimentato con un mangime il cui apporto proteico era dato esclusivamente dalle carni di pesce e in cui vi era l'aggiunta di olio di pesce (SANYpet A.F.S.TM), mentre l'altro gruppo era alimentato con un mangime commerciale tradizionale (Eukanuba, qualità Premium). Le diete distinte per i due gruppi sono state somministrate a partire dallo svezzamento fino al raggiungimento dell'anno di vita. All'età di cinque mesi e al compimento dell'anno di età sono state indagate le articolazioni del gomito e del bacino con uno studio radiografico utilizzando il MAXIVET® H.F. High Frequency (Multimage). Per l'analisi degli acidi grassi i campioni di sangue (5ml) sono stati raccolti a tre mesi, a cinque e a dodici mesi attraverso un prelievo dalla vena brachiale. Il plasma, ottenuto con separazione in centrifuga (ALC 4222 MKII®) a 4000g per 10 minuti, è stato stoccato a -18°C fino al momento dell'analisi. Gli acidi grassi sono stati estratti secondo la metodica di Bligh e Dyer⁽⁴⁾, in seguito metilati⁽⁵⁾ e il loro profilo è stato ottenuto tramite cromatografia gassosa. Sono state misurate le concentrazioni di acido palmitico (C16:0), palmitoleico (C16:1 ω 9), stearico (C18:0), oleico (C18:1 ω 9), vaccenico (C18:1 ω 11), linoleico (C18:2 ω 6), arachidonico (C20:4 ω 6), EPA (C20:5 ω 3), DPA (C22:5 ω 3) e DHA (C22:6 ω 3). Un'analisi di varianza multivariata su misure ripetute è stata condotta sulle percentuali relative degli acidi grassi tramite la procedura Proc MIXED (SAS, 2010) che consente di realizzare un'analisi multivariata (MANOVA) attraverso l'adozione di una scomposizione della matrice di varianza-covarianza. Il prodotto di Kronecker consente la scomposizione di tale matrice in due: una matrice permette di correlare le misure ripetute per un singolo acido grasso su un dato soggetto e una è di covarianza per tutti gli acidi grassi misurati su un dato soggetto ad un dato momento. Tutto ciò determina l'incorporazione delle osservazioni non complete nella stima della matrice.

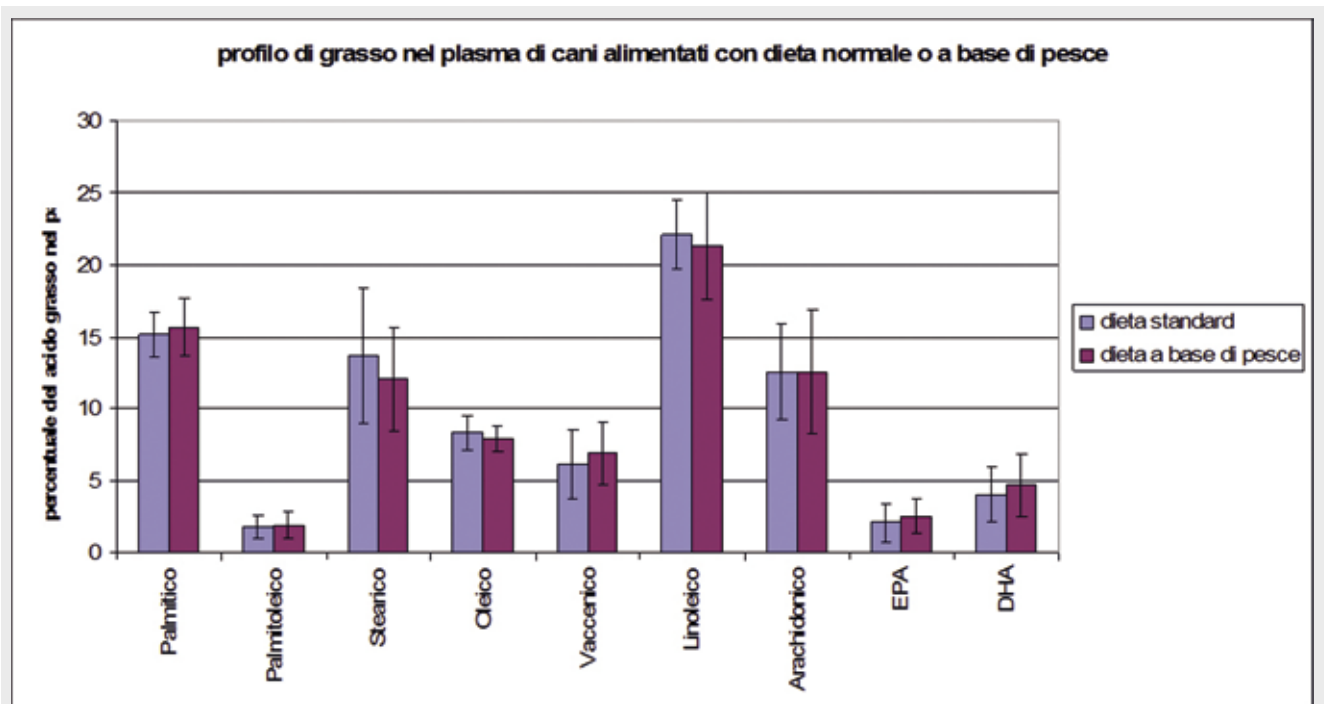


Fig. 2. Percentuale delle concentrazioni di singoli acidi grassi nel plasma prelevato sui cuccioli alimentati con una dieta standard (blu) o con una dieta a base di pesce (rosso).

RISULTATI

Il profilo delle concentrazioni plasmatiche di LC-PUFA negli animali alimentati con una dieta a base di pesce o una dieta standard non presenta differenze statisticamente significative (Fig. 2).

Solo 2 cani hanno palesato displasia dell'anca con segni di osteoartrosi all'indagine radiografica effettuata

a dodici mesi di età. Non si sono evidenziate differenze tra i due gruppi alimentati in modo differente in quanto i due soggetti displasici appartenevano a un gruppo sperimentale diverso.

È, invece, interessante l'osservazione che i cani ammalati, a prescindere dalla dieta, presentano concentrazioni inferiori di acido arachidonico e superiori di EPA e DHA (Fig. 3).

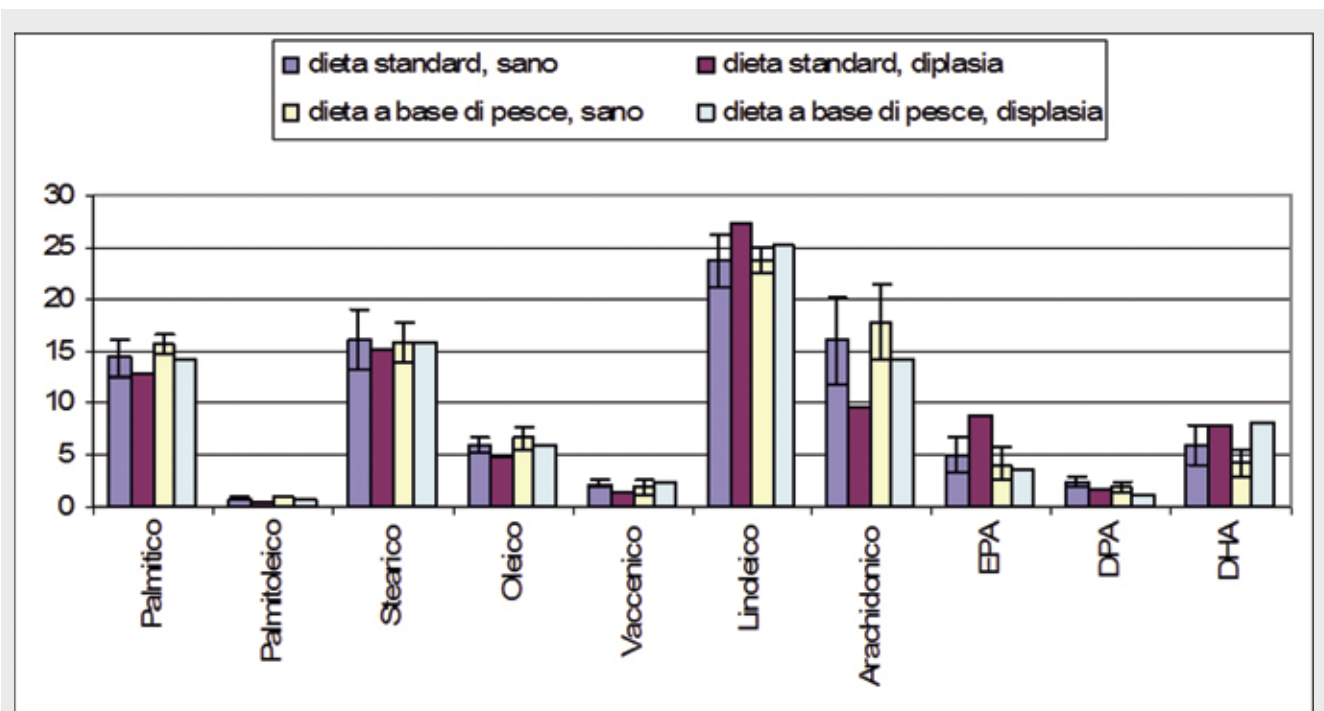


Fig. 3. Profilo di acidi grassi plasmatici in cani sani o che presentano segni di displasia a seconda dell'alimentazione ricevuta (standard o a base di pesce).

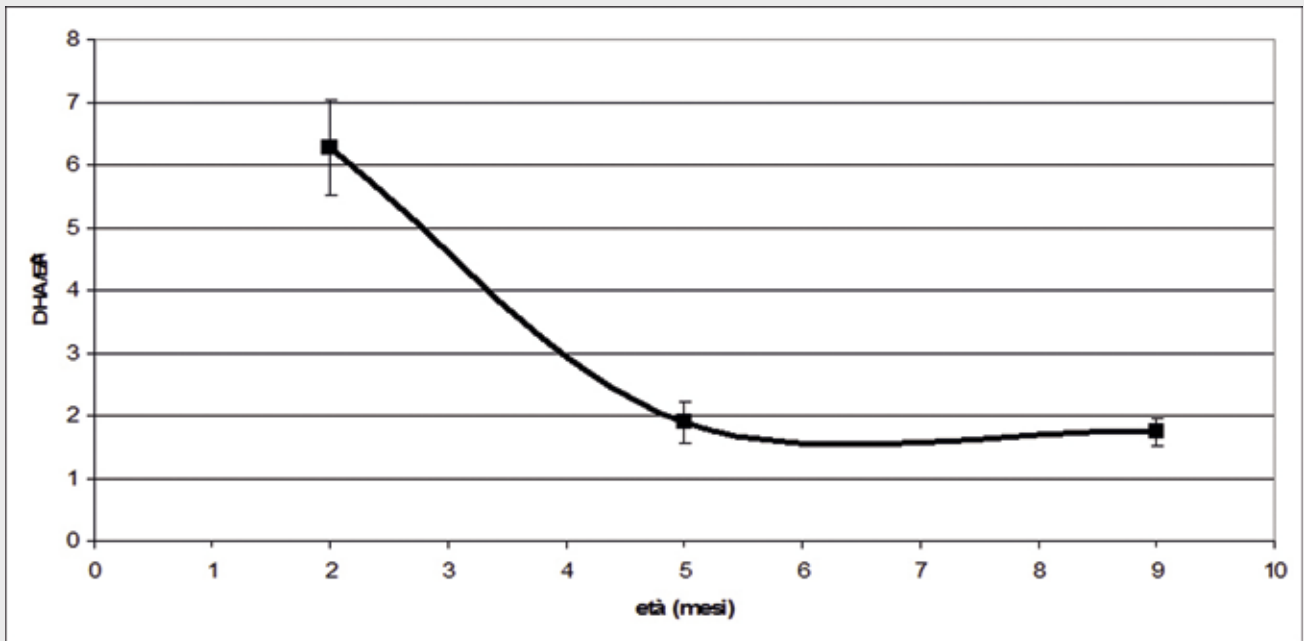


Fig. 4. Evoluzione nel tempo del rapporto tra gli acidi grassi DHA e EPA nei pastori tedeschi.

Un dato interessante che è emerso durante queste indagini è che il rapporto tra 2 acidi grassi omega 3, EPA e DHA, varia con l'età ($P < 0,01$) dei cuccioli e

questo andamento è soprattutto osservabile nei cani di razza Pastore Tedesco (Figg. 4 e 5).

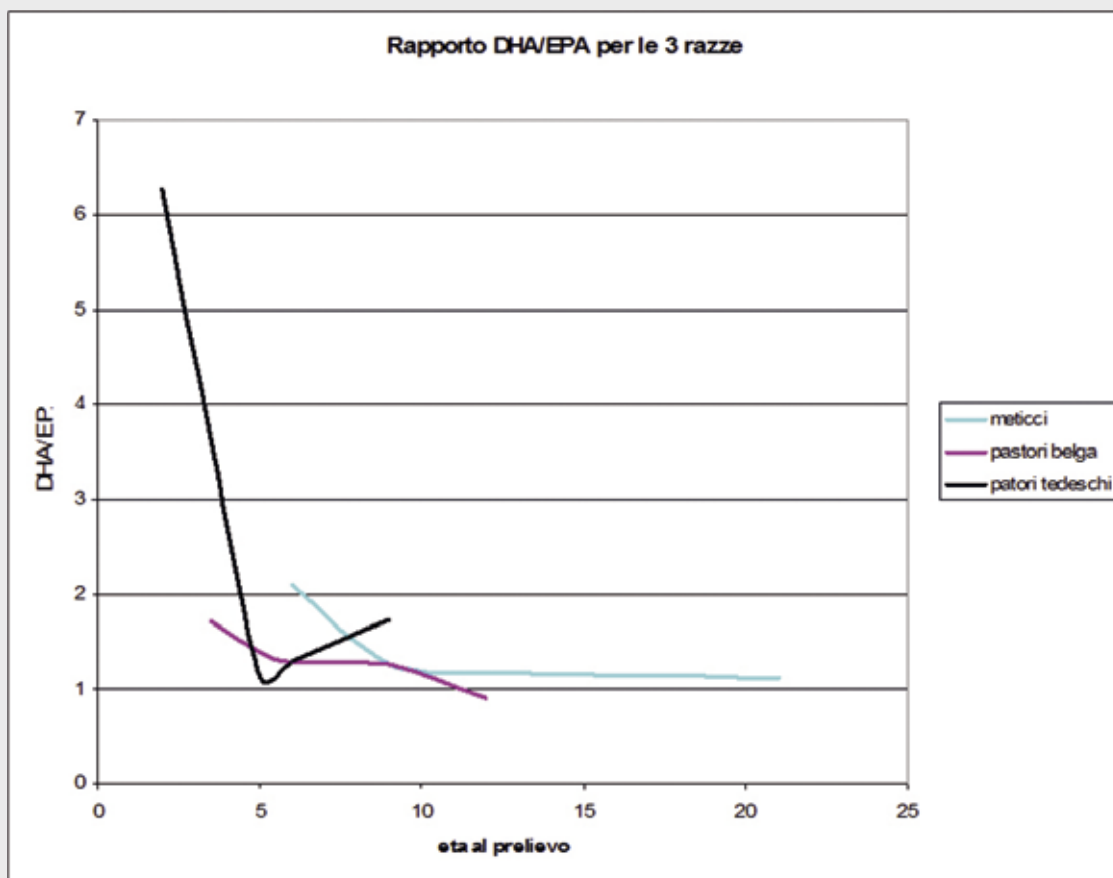


Fig. 5. Evoluzione nel tempo del rapporto tra i due acidi grassi omega 3, DHA su EPA, per le 3 razze studiate.

DISCUSSIONE

In questo studio, l'insorgenza di patologie articolari su base osteo-artritica/osica non è stata posta in relazione all'alimentazione poiché si sono riscontrati solo due casi di soggetti che hanno manifestato displasia dell'anca, uno in ciascun gruppo sperimentale. Nei soggetti displasici, due Pastori Tedeschi, si sono riscontrate concentrazioni plasmatiche più basse di acido arachidonico. Questo dato potrebbe essere interpretato come un sequestro dello stesso metabolita nelle sedi di infiammazione per essere utilizzato come precursore di sostanze pro-infiammatorie anche se il numero esiguo di cani con Osteo-Artrosi non permette di esprimersi in modo definitivo. Nei pochi lavori condotti sul cane⁽⁷⁻⁹⁻¹⁰⁻¹¹⁾, contrariamente al nostro studio, sono stati presi in considerazione solo soggetti affetti da Osteo-artrite, in cui la supplementazione di LC-PUFA con la dieta, oltre a determinare dei miglioramenti clinici nei soggetti testati, ha anche prodotto un rialzo delle concentrazioni plasmatiche di LC-PUFA rispetto ad un gruppo di controllo comunque affetto da OA. La mancata differenza statisticamente significativa tra i due gruppi alimentati in modo diverso, nel nostro caso, si potrebbe spiegare con l'esistenza di una capacità del cane sano di sintetizzare LC-PUFA a partire da altri acidi grassi presenti nella dieta. I cani normali, infatti, potrebbero presentare un'attività normale

delle elongasi e delle desaturasi. Se così fosse, ci si dovrebbe chiedere se sia necessario somministrare a cani sani quote supplementari di LC-PUFA nella dieta. Secondo Walters e coll.⁽⁸⁾, la supplementazione di PUFA nella dieta di cani normali per un periodo di 21 giorni determina un aumento della perossidazione lipidica indicata da un calo del GSH e un aumento di isoprostano nelle urine.

Una diversa modalità metabolica di gestire gli LC-PUFA è probabilmente legata a fattori genetici e questo è emerso anche nel nostro lavoro, per esempio, nel constatare che esiste una diversa attività della Δ6-desaturasi nei Pastori Tedeschi rispetto alle altre razze prese in considerazione e che questa va diminuendo con l'età.

Sarebbe interessante indagare il ruolo genetico che la Δ6-desaturasi, o di altri enzimi implicati nel metabolismo lipidico, ha sull'incidenza di patologie Osteo-articolari; in questo modo si potrebbe verificare l'implicazione degli LC-PUFA nel turn-over delle sostanze anti-infiammatorie e chiarirne il ruolo, se esiste, specifico sul metabolismo articolare.

In conclusione, da questa indagine preliminare si evidenzia una riduzione dell'attività dell'enzima Δ6-desaturasi durante la crescita soprattutto riscontrata nei pastori tedeschi, e si è notato che i soggetti displasici hanno concentrazioni plasmatiche minori di acido arachidonico.

BIBLIOGRAFIA

1. Lust G (1997) An overview of the pathogenesis of canine hip dysplasia. *J Am Vet Med Assoc*, 210, 1443-1445.
2. Willis, M (1989) Hip dysplasia. *Hip dysplasia*. In: Howell Book House (ed), *Genetics of the dog*; New York, pp 144-179.
3. Melhus H et al (2008) *Osteoporos Int*, 19, 929-934.
4. Bligh E, Dyer W (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37, 911-917.
5. Renaville B et al (2006). Eicosapentaenoic acid and 3,10 dithia stearic acid inhibit the desaturation of trans-vaccenic acid into cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid through different pathways in Caco-2 and T84 cells. *Br J Nutr*, 95, 688-695.
6. Li, N., Rivéra-Bermúdez, M. A., Zhang, M., Tejada, J., Glas-son, S. S., Collins-Racie, L. A., LaVallie, E. R., Wang, Y., Chang, K. C. N., Nagpal, S., Morris, E. A., Fannery, C. R., Yang, Z. 2010. *PANS*. Vol. 107. No. 8:3734-3739.
7. Fritsch DA (2010) *J Am Vet Med Assoc*, 236, 535-539.
8. Walters J et al (2010) *Vet Med Int*, 2010, Article ID 619083, 4 pages
9. Roush, J. K., Dodd, C. E., Fritsch, D. A., Allen, T. A., Jewell, D. E., Schoenherr W. D., Richardson, D. C., Leventhal, P. S., Hahn, K. A. 2010. Multicenter veterinary practice assessment of the effects of omega-3 fatty acids on osteoarthritis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Vol. 236. No. 1:59-66.
10. Fritsch, D. A., Allen, T. A., Jewell, D. E., Sixby, K. A., Leventhal, P. S., Brejda, J., Hahn, K. A. 2010. A multicenter study of the effect of dietary supplementation with fish oil omega-3 fatty acids on carprofen dosage in dogs with osteoarthritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Vol. 236. No. 5:535-539.
11. Roush, J. K., Cross, A. R., Renberg, W. C., Dodd, C. E., Sixby, K. A., Fritsch, D. A., Allen, T. A., Schoenherr W. D., Richardson, D. C., Leventhal, P. S., Hahn, K. A. 2010. Evaluation of the effects of dietary supplementation with fish oil omega-3 fatty acids on weight bearing in dogs with osteoarthritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Vol. 236. No. 1:67-73.
12. Amiram, A., Charles N. S. 2007. Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. *Trends in immunology*. Vol. 28. n° 4:176-183.

Ricerca finanziata dal Ministro della difesa nell'ambito della "Ricerca sull'incidenza dell'artrosi nel cane militare e strategia di prevenzione e controllo"