Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
119° (2001), Vol. XXV, pp. 495-507

ALESSANDRO NARDONE *

Resistenza agli stress negli animali: prospettive di impiego delle biotecnologie **

Abstract – Lo stress può essere definito come la risposta biologica espressa da un organismo quando percepisce una minaccia alla sua omeostasi. Tale minaccia può essere apportata da fattori di natura diversa e la reazione può essere specifica o aspecifica.

In zootecnia lo stress è studiato principalmente in relazione allo stato di benessere e di salute, alla prestazione produttiva quanti-qualitativa, e alla riproduzione degli animali allevati.

Gli interventi biotecnologici possono essere: indiretti, se rivolti a ottenere prodotti che contribuiscono a limitare le conseguenze dello stress, diretti se finalizzati all'ottenimento di animali meno sensibili all'azione degli stressori o che risentono meno della condizione di stress.

Talune conoscenze di rilievo nei meccanismi biologici dello stress già sono acquisite. È noto il fattore di trascrizione NF-kB presente nel citoplasma e che induce espressione genica. La sua attività è indotta da molti agenti esogeni ed endogeni: infezioni virali, parassiti, chemioterapici, danni al DNA, etc. Esso agisce inducendo la sintesi di proteine chiave dello stress. È noto anche un fattore di trascrizione (HSF1) coinvolto nella regolazione delle *heat shock proteins* che rivestono un ruolo fondamentale nella protezione delle cellule, dei tessuti o dell'intero organismo dai rischi connessi con l'azione degli stressori.

Sono noti QTLs per caratteri quali la resistenza alle parassitosi nelle pecore, la resistenza al tripanosoma nel *Bos indicus*, la resistenza a varie malattie (salmonellosi) nei polli, ed il controllo del comportamento (aspetti emozionali).

Mediante la tecnica dei QTLs è possibile individuare genotipi che meglio sopportano lo stress da caldo nei bovini di razze cosmopolite a elevata capacità lattifera, allevati nelle aree subtropicali caratterizzate da elevate densità umana e deficit di latte alimentare.

È possibile ottenere alimenti geneticamente modificati (GM) con proprietà vaccinali per evitare agli animali lo stress dovuto a trattamenti per via parenterale e microrganismi GM per eliminare cataboliti tossici causa di stress per l'animale.

Se saranno risolti problemi bioetici e tecnologici, geni positivi ai fini dello stress potrebbero essere trasferiti tra individui di popolazioni e di specie diverse, e individui che meglio controllano lo stress potrebbero essere clonati.

* Dipartimento di Produzioni Animali, Università della Tuscia, Viterbo.

** Relazione presentata al Primo Convegno Nazionale della U.N.A.S.A. su «Biotecnologie agroalimentari, industriali, ambientali: problemi e prospettive», Roma, 1-2 ottobre 2001.

1. Introduzione

La società umana sta dedicando un crescente interesse alle condizioni di benessere degli animali. Per questo negli ultimi anni è aumentato l'impegno per evitare che le tecniche di produzione procurino stress agli animali allevati e, più in generale, che azioni dell'uomo divengano stressori per tutti gli animali, compresi quelli allo stato selvatico.

Alla base di questo atteggiamento vi è il progressivo rifiuto all'impiego dell'animale come mero «meccanismo biologico» di trasformazione di prodotti vegetali in alimenti per l'uomo, tanto da portare alla formulazione di apposite normative in tema di benessere animale in molti paesi a zootecnia avanzata.

Una sollecitazione, in tempi più recenti, ad approfondire lo studio dello stress negli animali di interesse zootecnico viene anche dal diffondersi delle conoscenze degli effetti negativi dello stress sulle prestazioni degli animali, tanto produttive (per quantità e qualità), quanto sportive, nonché di riproduzione. Ultimamente si stanno indagando anche le relazioni intercorrenti tra stress e stato metabolico, metabolismo ossidativo e meccanismi di difesa nei confronti delle malattie infettive e/o parassitarie.

Fino a tempi recenti, difatti, le conoscenze sugli animali di allevamento, nei vari domini della scienza, erano state prioritariamente utilizzate per la messa a punto di tecniche volte a massimizzare le prestazioni produttive (Nardone e Gibon, 2000).

Per taluni sistemi di produzione (sistemi intensivi di monogastrici) le condizioni ambientali a volte erano state adattate, per quanto possibile, al presunto benessere animale, sempre con solo finalità produttive.

2. Stress

Moberg (2000) definisce *lo stress come la risposta biologica espressa da un organismo quando percepisce una minaccia alla sua omeostasi.*

La minaccia può derivare da fattori di natura diversa e la reazione può essere specifica o aspecifica e di diverso tipo e grado in funzione della intensità dello stimolo ricevuto.

L'entità dello stress varia in rapporto a razza, sesso, individuo e entro lo stesso individuo in rapporto a età, stato fisiologico o anche esperienze rispetto al medesimo stressore (Dantzer e Mormede, 1983).

King (2001) ha proposto una classificazione dello stress basata sul tipo di percezione e di risposta da parte dell'animale a seconda dell'ampiezza dello stimolo (Tabella 1). La complessità biologica della risposta agli stimoli, caratterizzata da molteplici relazioni tra le componenti dell'asse ipotalamo-ipofisi-corteccia surrenale (Figura 1), causa difficoltà nella individuazione e nel rilevamento di parametri di valutazione degli effetti degli stressori.

Tabella 1 – *Risposta dell'animale agli stimoli provenienti dall'ambiente.*

	Ampiezza dello stimolo		
	Bassa	Moderata	Intensa
Percezione dell'animale	Impercettibile	Stress	Distress
Risposta dell'animale	Nessuna	Fisiologica	Patologica
Esito	Nessuno	Adattamento	Anormalità

Questo rende problematico stimare quanto è dovuto alla componente ambientale e quanto a quella genetica nella risposta ai diversi fattori di stress.

Della considerevole variabilità riscontrata tra individui nella risposta allo stesso stimolo (Cummins e Gevirtz, 1993; Marsland *et al.*, 1995), Pottinger (2000) ritiene che una parte sia sicuramente imputabile a differenze genetiche quando è riscontrata in animali allevati nel medesimo ambiente.

Modelli combinati di stima della ereditabilità e ricerca di marcatori per caratteri comportamentali e di benessere sono stati proposti da Newman (1994).

3. Stress e biotecnologie

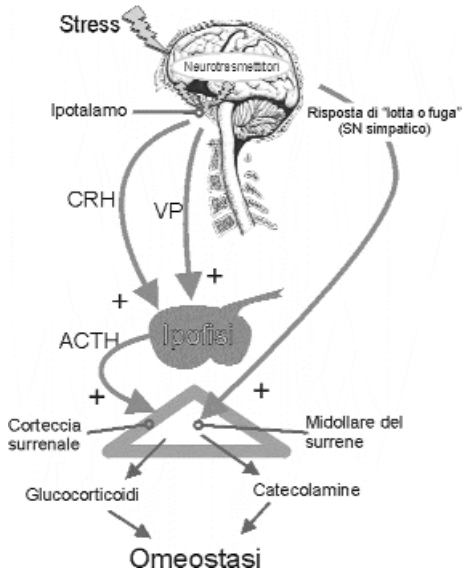
Possono le biotecnologie avere utile impiego per migliorare la resistenza allo stress negli animali allevati?

Possiamo suddividere gli interventi biotecnologici in: a) ad azione indiretta sull'animale e b) ad azione diretta. I primi consentono di ottenere prodotti che contribuiscono a limitare le conseguenze dello stress nell'animale; i secondi consentono di produrre animali meno sensibili all'azione degli stressori o che risentono meno della condizione di stress.

3.1 *Biotecnologie ad azione indiretta*

Applicazioni biotecnologiche che consentano di ottenere prodotti o condizioni tali da limitare indirettamente gli effetti degli stressori, sono già allo studio o sono proponibili.

Batteri geneticamente modificati, ad esempio, possono essere impiegati per limitare la produzione di acido lattico o per degradarne l'eccesso di produzione a livello ruminale, situazione frequentemente riscontrabile, a seguito anche di non



(Fonte: Matteri *et al.*, 2000).

Fig. 1. Diagramma dei maggiori componenti dell'asse ipotalamo-ipofisi-corteccia surreale.

idonee pratiche alimentari, nella prima fase della lattazione nelle vacche selezionate per le alte produzioni.

I fenomeni di acidosi clinica (pH inferiore a 5.5) e subclinica (pH inferiore a 6.2) sono associati ad una alterazione della funzionalità digestiva e dello stato di benessere dell'animale, con comparsa di pica, aggressività e dismetabolie di varia natura.

Tra i sistemi di prevenzione e controllo dello stato di acidosi, sono stati di recente prospettati, in aggiunta alle note regole di corretta alimentazione della vacca da latte nella fase di transizione, interventi di manipolazione dell'ecosistema ruminale.

La funzione dell'organismo modificato dovrà essere quella di degradare, con elevata efficienza, gli eccessi di acido lattico in acidi grassi volatili quali acido acetico e acido proprionico. In condizioni normali tale funzione è svolta da diversi batteri e in particolare da *Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii*. La capacità di questi batteri di utilizzare il lattato come substrato è tuttavia limitata dalla disponibilità di altri nutrienti (ad esempio malato). La loro capacità di metabolizzazione dell'acido lattico potrebbe essere trasferita in batteri che hanno uno spettro metabolico più ampio.

In questo caso l'impiego di biotecniche di ingegneria genetica devono essere indirizzate a un migliore adattamento di tali popolazioni microbiche al normale ambiente ruminale e creare un sistema flessibile di controllo dei metaboliti ruminali e del conseguente pH (Ronchi, 2001 comunicazione personale).

Questa soluzione avrebbe rilevanti vantaggi nel limitare i rischi di stress per la bovina rispetto alla somministrazione di prodotti tampone, ai quali oggi si fa ricorso. Tra l'altro non sarebbe necessario: a) diagnosticare la patologia; b) determinare il dosaggio (che può essere errato); c) stabilire la durata del trattamento; d) ripetere i trattamenti di volta in volta. Difatti i microrganismi ingegnerizzati potrebbero variare di numero e quindi di attività in funzione del valore del pH, senza intervento esterno.

Un'altra via indiretta è la produzione di alimenti geneticamente modificati in modo che acquistino proprietà vaccinale. Streatfield *et al.* (2001) hanno già ottenuto, a livello sperimentale, mais transgenico contenente subunità di enterotossina (EC) e di gastroenterite trasmissibile suina (TGE). L'alimentazione dei suini con questo mais ha funzione vaccinale nei confronti delle due patologie, evitando agli animali lo stress che causerebbe la vaccinazione per via parenterale.

Un'altra biotecnica interessante potrà essere l'impiego, in un particolare caso dell'allevamento bovino, di miostatina ricombinante per limitare, durante la gestazione, lo sviluppo muscolare di un feto MSTN- (Valentini, 2001 comunicazione personale). I vitelli geneticamente MSTN- presentano già alla nascita un notevole sviluppo muscolare causa di stress (o peggio lesioni e a volte morte) al momento del parto sia per la madre sia per i vitelli stessi. L'iperplasia che si manifesta nei soggetti MSTN- è causata dal mancato funzionamento del gene che codifica la produzione della miostatina, la proteina che regola lo sviluppo delle fibre muscolari (Arnold *et al.*, 2001). La miostatina ricombinante, somministrata alla madre durante la gestazione, agendo per via ematica sul feto, consentirebbe di avere vitelli che presentano sviluppo normale alla nascita e non causano stress particolare al momento del parto e successivamente, conformemente al proprio genotipo, assumeranno la caratteristica conformazione «coulard», particolarmente apprezzata per le elevate rese in carne di pregio.

3.2 *Biotecnologie ad azione diretta*

In generale il danno cellulare sia esso fisico, chimico o infettivo induce una serie di risposte adattative differenti e recenti dati indicano che le interazioni tra queste risposte non sono prevedibili e che i cambiamenti nell'ordine sequenziale delle stesse possono avere effetti opposti sulla risposta finale al danno. L'interazione delle risposte allo stress può contribuire al destino della cellula prima e del tessuto e dell'organismo poi, e la modulazione di queste interazioni può avere un effetto importante sulla funzionalità e sulla sopravvivenza degli stessi. Questa complessità dei processi che alterano l'omeostasi a livello cellulare rende difficile la individuazione dei geni coinvolti nei fenomeni di stress e la conoscenza della loro funzionalità.

Diverse conoscenze sono acquisite nella specie umana o murina mentre limitate o nulle sono quelle relative agli animali di allevamento.

È noto come un primo stress termico protegge la cellula contro lo stress infiammatorio (citoprotezione) e si è visto, sia in vivo che in vitro, che l'induzione di successivi stress termici in cellule «segnate» da processi infiammatori può portare a morte cellulare per apoptosi (citotossicità).

Questa situazione per cui lo shock termico induce citoprotezione e citotossicità è stata denominata «paradosso da shock termico», De Meester *et al.* (2001) hanno ipotizzato che il meccanismo possa essere associato ad un abbassamento del grado di induzione di IkappaBalpha, inibitore di NF-kB, (Figura 2 e 3).

Il fattore nucleare (NF)-kB regola l'espressione di diverse serie di geni cellulari, e molti agenti esogeni ed endogeni (inclusi infezioni virali, lipidi batterici, danni al DNA, stress ossidativi e agenti chemioterapici) che rappresentano una minaccia per l'organismo, sono capaci di indurre l'attività di NF-kB. Tali scoperte indicano come NF-kB possa essere considerato un mediatore dello stress cellulare.

L'induzione della risposta da shock termico richiede il trasporto nel nucleo di uno o più fattori di trascrizione che controllano l'espressione di una specifica serie di geni i quali codificano proteine protettive da shock.

Polipeptidi che appartengono alla famiglia delle proteine da stress HSP70 e al complesso regolatorio multi funzionale NF-kB/Rel sono coinvolti nei meccanismi di difesa cellulare ed entrambi i sistemi possono interagire nella risposta cellulare agli stimoli dannosi. È stato scoperto come un moderato shock termico causi un aumento del contenuto intracellulare di HSP70 e una concomitante soppressione dei complessi NF-kB (Guzhova *et al.*, 1997).

Poiché vari studi hanno dimostrato che l'induzione delle HSP inibisce l'espressione genetica di citochine proinfiammatorie, la trascrizione delle quali è dipendente dall'attivazione ad opera del fattore nucleare di trascrizione NF-kB, è stata studiata la relazione tra gli effetti antinfiammatori dovuti all'induzione da shock termico e la via che coinvolge il complesso NF-kB/IkappaBalpha (Yoo *et al.*, 2000).

Può essere supposto, sia pure non in tempi brevi, da un lato che gli avanzamenti di conoscenze in questo campo di indagine portino a individuare geni responsabili di funzioni precise implicate nei fenomeni di stress e loro possibili polimorfismi, da un altro lato che il completamento del mappaggio in corso del DNA delle specie animali allevate faccia individuare le omologie con il genoma umano e murino. Questi risultati consentirebbero di selezionare animali meglio resistenti o tolleranti allo stress.

3.2.1. Quantitative Trait Loci

In fase più applicativa sono invece le biotecnologie molecolari che consentono di individuare eventuali QTLs (Quantitative Trait Loci) responsabili, negli animali, di una migliore resistenza all'azione degli stressori o di risentire meno delle condizioni di stress. Queste tecniche già trovano applicazione nei piani di miglioramento gene-

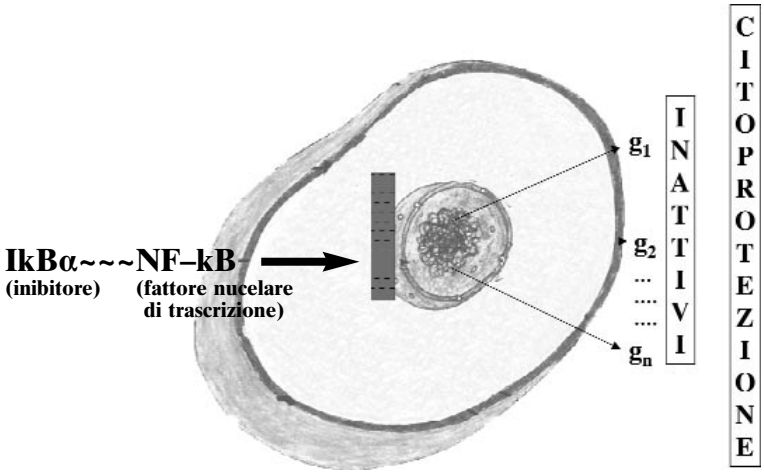


Fig. 2. Stress termico occasionale e moderato.

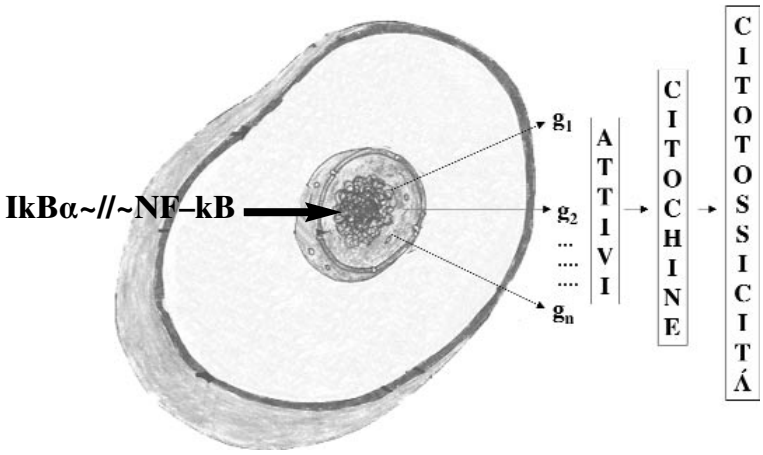


Fig. 3. Stress termico rupetuto.

tico per caratteri di produzione (Georges *et al.*, 1995; Davis & Taylor, 1998; Nadesalingam *et al.*, 2001) e crescenti sono le ricerche per caratteri interessanti lo stress.

Ricerche di QTLs per la tripanotolleranza sono state condotte negli ultimi anni sia su animali da esperimento (diversi ceppi di topo, Noyes *et al.*, 2000) sia su bovini.

La tripanosomia è diffusa nelle popolazioni bovine dell'Africa occidentale della fascia Sud equatoriale. La trasmissione del tripanosoma avviene tramite la mosca Tse-Tse. La malattia causa anemia, perdita di peso fino a morte. Gli animali infetti soffrono un forte stress. Alcuni bovini sono tripanotolleranti.

In una popolazione sperimentale ottenuta dall'incrocio tra tori di razza N'Dama (*Bos taurus*) tripanotollerante e vacche di razza Boran (*Bos indicus*) tripanosuscettibile, esposta al contagio di *Tripanosoma congolese*, sono stati cercati QTLs per la tripanotolleranza su 8 cromosomi (van der Waaij *et al.*, 2001) (Tabella 2). I caratteri presi in esame sono stati: grado di parassitosi, di anemia, e accrescimento. Le tre generazioni F_0-F_1-F_2 sono state tipizzate geneticamente mediante marcatori microsatellitari. Sono stati trovati 3 QTLs in relazione alla quantità di ematocrito dopo infezione e 2 QTLs in relazione all'accrescimento (o cambio peso) dopo infezione.

Ricerche di QTLs per patologie che implicano condizioni di stress sono condotte in altre specie. Per la specie ovina, ad esempio, l'ICRI (International Livestock Research Institute) ha in corso ricerche per individuare, nella pecora Red Masai autoctona dell'Africa dell'Est, QTLs che controllano la resistenza ai nematodi, parassiti gastrointestinali. È utilizzata una popolazione ottenuta dall'incrocio tra Red Masai (resistente) e Dorper (suscettibile). Il DNA della discendenza più resistente e più suscettibile viene tipizzato mediante 200 marcatori microsatellitari.

Un altro caso di impiego di biotecnologie, per il controllo di condizioni di stress, riguarda lo studio della atassia congenita progressiva (CPA) e paresi spastica nei suini. La patologia si manifesta subito dopo la nascita come una severa neuropatia. La malattia sembra essere controllata da un allele recessivo indicato come CPA. Il genoma dei fenotipi CPA viene mappato essendo stato trovato un linkage del CPA con i microsatelliti Sw 1066 e Sw 902 situati sul cromosoma 3 (Kratzsch *et al.*, 2000). È appena il caso di ricordare che in questa specie è già diffusamente utilizzata la tipizzazione rispetto al gene n (alotano) responsabile della sindrome PSE (Leach *et al.*, 1996).

La ricerca di QTLs è rivolta anche a caratteri comportamentali. Sono stati trovati sei QTLs per la risposta all'isolamento in fase di svezzamento e ad età adulta, in una popolazione di soggetti puri e incrociati appartenenti a 6 razze bovine (Angus, Blue Belge, Charolais, Hereford, Limousin e Simmenthal). Uno dei sei QTLs è stato trovato sul cromosoma 9 a 44 cM da ILST013 (Schmutz *et al.*, 2000).

Risultati di ricerche condotte mediante la tecnica dei microsatelliti per individuare QTLs interessanti la depigmentazione del mantello fanno supporre che al locus KIT ci sia un gene candidato per il grado di pezzatura del mantello nei bovini. Tale caratteristica può assumere rilievo a fronte della resistenza allo stress da caldo, alle radiazioni solari, alla fotosensibilità (Reinsch, 1999).

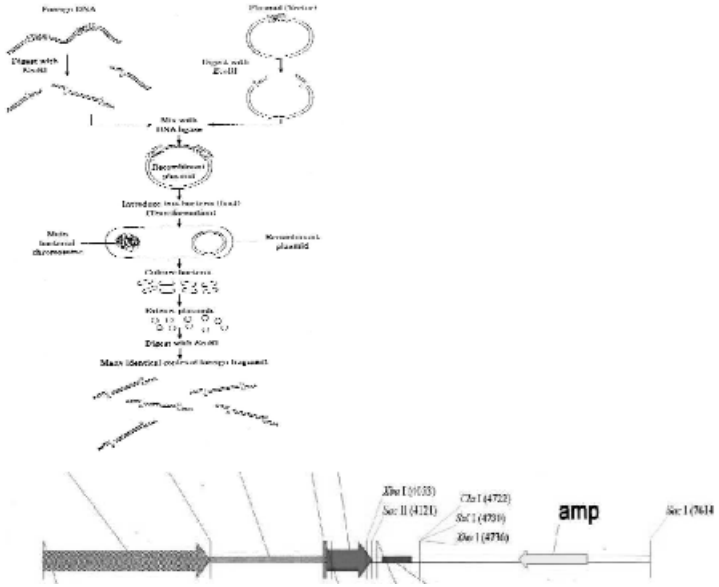
Tabella 2 – *QTL identificati interessanti lo.*

Specie	Causa	Effetto	Autore
Topo (N'DamaxBoran)			Noyes *et al.*, 2000; van der Vaaij *et al.* 2001
Bovino (varie razze)	Isolamento	Modificazione comportamento	Schmutz *et al.*, 2000
Bovino (varie razze)	Carat. mantello	Resistenza a caldo, a radiazioni	Reinsch, 1999
Ovino (Masax Dorper)	Parassitosi gastrointestinale	Resistenza	Okomo *et al.*, 2000
Suino	Atassia e paresi spastica	Resistenza	Kratzsch *et al.* 2000

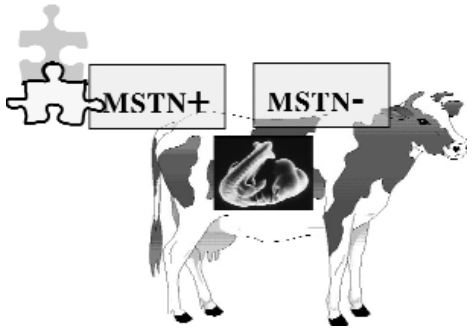
Potrebbero essere ricercati anche QTLs positivi per la termotolleranza, allo scopo di selezionare per questo carattere animali a elevata produzione che vengono allevati sempre più diffusamente in ambienti caldi. I valori elevati di ereditabilità di alcuni caratteri/parametri coinvolti nella termotolleranza (Tabella 3), inducono a ritenere probabile la individuazione di QTLs per tali caratteri. La loro individuazione consentirebbe la selezione di soggetti che, esprimendo a livello elevato caratteri favorevoli alla termoregolazione, resisterebbero meglio allo stress da caldo. La riproduzione di questi soggetti permetterebbe tra l'altro di ottenere individui che pur essendo più termotolleranti non risentirebbero, ai fini del livello produttivo, della relazione negativa che incide negli attuali schemi di selezione tra capacità di termoregolazione e di produzione (Bernabucci *et al.*, 2002; Johnson, 1987) e di potere protettivo del colostro (Nardone *et al.*, 1997).

3.2.2. Transgenesi e clonazione

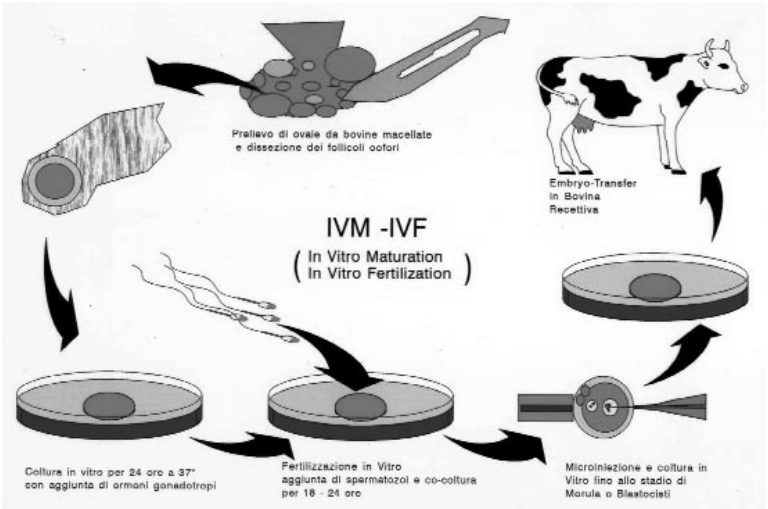
Un ultimo esempio finalizzato ancora a limitare lo stress da parto nei bovini «coulard» prevede l'impiego di transgenesi e clonazione su animali superiori. La produzione di bovini «coulard» transgenici portatori di un costrutto MSTN+ e promotore sensibile, attivabile da un fattore specifico quale β-globulina fetale, presente solo in fase di gestazione (Valentini, 2001 comunicazione personale), consentirebbe di produrre bovini «coulard» che in fase fetale hanno uno sviluppo muscolare regolare e dopo il parto esprimono il carattere (Figura 4). Questi tipi genetici potrebbero essere moltiplicati mediante clonazione.



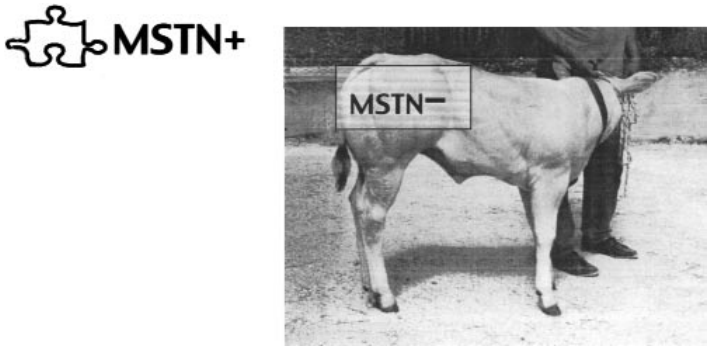
Produzione del costrutto MSTN+ e promotore sensibile attivato da un fattore specifico ad es α-globulina fetale.



Sviluppo dell'embrione MSTN– portatore di MSTN+ e promotore. Durante la gravidanza il promotore del gene MSTN+ è attivato dal fattore specifico della α-globulina fetale per cui MSTN+ produce miostatina e lo sviluppo muscolare è normale.



Inserimento del gene MSTN+ e promotore (es. mediante microiniezione pronucleare) nel genoma ospite MSTN–. IVM-IVF con spermatozoi MSTN–.



Dopo la nascita, in assenza del fattore attivante dell'α-globulina fetale, è soppressa l'espressione MSTN+ e la attività di MSTN–*

* Produzione di miostatina malfunzionante per mancanza della parte carbossiterminale che regola il folding tridimensionale nella proteina normale (Grobet *et al.*, 1998; Cappuccio *et al.*, 1998).

Fig. 4. Stress da parto in bovini «coulard» (int. via diretta).

Tabella 3 – *Ereditabilità di alcuni parametri della termotolleranza.*

Componenti	h^2	Autore, anno
Produzione	0.75	Hotovy *et al.* (1991)
Frequenza respiratoria	0.57	Chan (1974)
Frequenza cardiaca	0.74	Chan (1974)
Mantello	0.77	Becerill *et al.*, (1994)
Ghiand. sudoripare:		Sharma and Nagarchenkar (1981)
volume	0.63	
lunghezza/diametro	0.30-0.45	Jenkinson *et al.* (1975)

Conclusioni

Gli elementi presi in esame portano a ritenere che le prospettive di impiego delle biotecnologie per la resistenza agli stress negli animali di interesse zootecnico possono essere:

— concrete per via indiretta nel breve periodo;
— possibili per via diretta nel medio e lungo periodo;
— Studi di genomica funzionale e proteomica possono dare utili contributi.

Ringraziamenti

Si ringrazia per il prezioso contributo: Alessandra Crisà, Alessio Valentini, Bruno Ronchi, Nicola Lacetera.

BIBLIOGRAFIA

Arnold H., Della-Fera M.A. & Baile C.A. (2001). Review of myostatin history, physiology and applications. *LifeXY*, 1: 1014-22

Becerril C.M., Wilcox C.J., Campos M.S. & Hansen P.J. (1994). Genetic effects and relationship of milk production and percentage of white coat in a subtropical Holstein herd. *Rev. Brasil. Genet.*, 17: 65-70.

Bernabucci U., Lacetera N., Ronchi B. & Nardone A. (2002). Effects of hot season on milk protein fractions in Holstein cows. *Anim. Res.* (in press).

Cappuccio C., Marchitelli A., Serracchioli A., Nardone A., *et al.* (1998). G-T transversion introduces a stop codon at the mh locus in hypertrophic Marchigiana beef subjects. *Proc. XXVI Conference on Animal Genetics*, Auckland, New Zealand.

Chan I.I. (1974). Heat resistence and selection of dairy cattle. *Izvestiya Akademii Nauk Tadzhikskoi SSR, Otdelenie Biologicheskikh Nauk*, 3: 89-92.

Cummins S.E. & Gevirtz R.N. (1993). The relationship between daily stress and urinary cortisol in a normal popolation: an emphasis on individual differences. *Behavioural Medicine*, 19: 129-134.

Dantzer R. & Mormede P. (1983). Stress in farm animals. A need for re-evaluation. *J. Anim. Sci.*, 57: 618.

Davis S.K. & Taylor J.F. (1998). Interval mapping and positional cloning of growth ETLs in cattle. *Proc. XXVI Conference on Animal Genetics*, Auckland, New Zealand.

De Meester S.L, Buchman T.G. & Cobb J.P. (2001). The heat shock paradox: does NF-kappaB determine cell fate? *FASEB J. Jan*, 15 (1): 270-274.

Georges M., Nielsen D., Mackinnon M., Mishra A., Okimoto R., Pasquino A.T., Sargeant L.S., Sorensen A., Steele M.R., Zhao X., Womack J.E. & Hoeschele I. (1995). Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics*, *139*, 907-920.

Grobet L., Poncelet D., Martin L.J.R., Brouwers B., *et al.* (1998). Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm Genome*, 9: 210-13.

Guzhova I.V., Darieva Z.A., Melo A.R. & Margulis B.A. (1997). Major stress protein Hsp70 interacts with NF-kB regulatory complex in human T-lymphoma cells. *Cell Stress Chaperones*, 2 (2): 132-9.

Hotovy S.K., Johnson K.A., Johnson D.E., Carsten G.E., Bourdon R.M. & Seidel G.E. (1991). Variation among twin beef cattle in mintenance energy requirement. *J. Anim. Sci.*, 69: 940-946.

Jenkinson D.M., Mason I.L. & Nay T. (1975). Inheritance of some sweat gland and hair follicle characteristics in cattle. *Aust. J. Biol. Sci.*, 28: 417-424.

Johnson H.D. (1987). Bioclimate effects on growth, reproduction and milk production, in: *Bioclimatology and the adaptation of livestock*. Johnson H.D. (Ed.), Elsevier Publ., B.V., Amsterdam, The Netherland, pp. 35-57.

King G. (2001). Animals and environments. http://www.aps.uoguelph.ca/~gking/animenv.htm

Kratzsch A., Stricker C., Gmür C., Rieder S., Jörg H., Ossent P., Bürgi E., Zimmermann W., Stranzinger G. & Vögeli P. (2000). The heredity disease «congenital progressive ataxia and spastic paresis in pigs» maps to chromosome 3. Proc. XXVII Conference on Animal Genetics, Minnesota.

Leach L., Ellis M., Sutton D., McKeith F.K. & Wilson E.R. (1996). The growth performance, carcass characteristics, and meat quality of halothane carrier and negative pigs. *J. Anim. Sci.*, 74 (5): 934-943.

Marsland A.L., Manuck S.B., Fazzari T.V., Stewart C.J. & Rabin B.S. (1995). Stability of individual differences in cellular immuno responses to acute psychological stress. *Psychosomatic Medicine*, 57: 295-298.

Matteri R.L., Carrol J.A. & Dyer C.J. (2000). Neuroendocrine responses to stress. In: Moberg G.P., Mench J.A (eds.), *The Biology of animal stress*. CABI Publishing, pp. 43-76.

Moberg G.P. (2000). Biological response to stress: implications for animal welfare. In Moberg G.P., Mench J.A (eds.), *The Biology of animal stress*. CABI Publishing pp. 1-21.

Nadesalingam J., Plante Y. & Gibson J.P. (2001). Detection of QTL for milk production on Chromosomes 1 and 6 of Holstein cattle. *Mamm Genome*, 12 (1): 27-31.

Nardone A. & Gibon A. (2000). Livestock Farming Systems, Research and Development. In *Technical and Social Systems Approaches for Sustainable Rural Development*, pp. 71-92.

Nardone A., Lacetera N., Bernabucci U. & Ronchi B. (1997). Composition of colostrum from dairy heifers exposed to high air temperatures during late pregnancy and the early postpartum period. *Journal of Dairy Science*, 80 (5): 838-844.

Newman S. (1994). Quantitative- and molecular-genetic effects on animal well-being: adaptive mechanisms. *J. Anim. Sci.*, 72 (6): 1641-53.

Noyes H.A., Wu J.-H., Broadhead A.M., Kemp S.J. & Iraqi F. (2000). Identifying *Trypanosoma congolense* resistance genes by positional cloning. *Proc. XXVII Conference on Animal Genetics*, Minnesota.

Okomo M.A., Mugambi J.M., Aduda E.O., Hanotte O., Van Arendonk J.A.M. & Baker R.L. (2000). Mapping quantitative trait loci controlling genetic resistance to gastrointestinal nematode parasites in Red Masai sheep. *Proc. XXVII Conference on Animal Genetics*, Minnesota.

Pottinger T.G. (2000). Genetic selection to reduce stress in animals. In Moberg G.P., Mench J.A. (eds.), *The Biology of animal stress*. CABI Publishing, pp. 291-308.

Reinsch N., Thomsen H., Xu N., Brink M., Looft C., Kalm E., Brockmann G.A., Grupe S., Kuhn C., Schwerin M., Leyhe B., Hiendleder S., Erhardt G., Medjugorac I., Russ I., Forster M., Reents R. & Averdunk G. (1999). A QTL for the degree of spotting in cattle shows synteny with the KIT locus on chromosome 6. *J. Hered.*, 90 (6): 629-34.

Schmutz S.M., Stookey J.M., Winkelman-sim D.C., Plante Y. & Buchanan F.C. (2000). A QTL for behavior maps to cattle chromosome 9. *Proc. XXVII Conference on Animal Genetics*, Minnesota.

Sharma A.K. & Nagarchenkar R. (1981). Studies on inheritance of sweat gland characteristics in Murrah buffaloes. *World Rev. Anim. Prod.*, 17: 35-39.

Streatfield S.J., Jilka J.M., Hood E.E., Turner D.D., Bailey M.R., Mayor J.M., Woodard S.L., Beifuss K.K., Horn M.E., Delaney D.E., Tizard I.R. & Howard J.A. (2001). Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine*, 21; 19 (17-19): 2742-8.

van der Waaij E.H., Hanotte O., Kennedy D., De Koning D.-J., Teale A.J., Van Arendonk J.A.M. & Gibson J. (2001). Genetic parameters and imprinting of QTL related to trypanotolerance in African Cattle. *Proc. 52nd Ann. Meet. EAAP*.

Yoo C.G., Lee S., Lee C.T., Kim Y.W., Han S.K. & Shim Y.S. (2000). Anti-inflammatory effect of heat shock protein induction is related to stabilization of I kappa B alpha through preventing I kappa B kinase activation in respiratory epithelial cells. *J. Immunol.*, 15; 164 (10): 5416-23.