



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOMEDICINA, COMPARATA E ALIMENTAZIONE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE

INDIRIZZO COMUNE

XXVI° CICLO

**RISPOSTA DEL TEST DA CARICO DEL GLUCOSIO SUL PROFILO
METABOLICO E VALUTAZIONE ISTO-PATOLOGICA DI CAMPIONI
BIOPTICI EPATICI IN BOVINE DA LATTE NEL PERIODO DI
TRANSIZIONE**

DIRETTORE DELLA SCUOLA: Ch.mo Prof. Gianfranco Gabai

SUPERVISORE: Ch.mo Prof. Massimo Morgante

DOTTORANDO: ENRICO FIORE

***Dedicato alle persone che hanno partecipato
allo sviluppo del progetto***

INDICE

1. <u>ABSTRACT</u>	1
2. <u>RIASSUNTO</u>	3
3. <u>PREMESSA</u>	5
4. <u>INTRODUZIONE</u>	7
4.1. <u>Periodo di transizione</u>	9
4.1.1. Bilancio energetico: fabbisogno energetico.....	12
4.1.2. Meccanismi di adattamento.....	13
4.2. <u>Glicemia e insulinemia</u>	17
4.2.1. Meccanismo di regolazione glicemico.....	18
4.2.2. Ruolo Fisiologico dell'Insulina.....	21
4.2.3. Ruolo dell'insulina nel Metabolismo.....	23
4.3. <u>Insulino resistenza</u>	25
4.3.1. Fattori di rischio dell'Insulino Resistenza.....	27
4.3.2. Stato Infiammatorio e di Immunodepressione.....	34
4.4. <u>Disturbi metabolici Epatici nel Post Partum</u>	36
4.4.1. Disordini metabolici legati ai lipidi.....	41
4.4.2. Lipidiosi Epatica.....	43
4.4.3. Accumulo di glicogeno.....	45
4.4.4. Amiloidosi.....	46
4.4.5. Fibrosi epatica.....	46
4.5. <u>Stato infiammatorio del fegato</u>	48
4.6. <u>Valutazione Istopatologica nel Fegato</u>	50
5. <u>MATERIALI E METODI</u>	53
5.1. <u>Procedura Sperimentale</u>	53
5.1.1. Animali e allevamenti.....	53
5.1.2. Rilevazione del BCS.....	55
5.1.3. Biopsie eco-guidate.....	56
5.1.4. Test di carico del glucosio e Prelievi ematici.....	57
5.1.5. Chetonemia e Glicemia in campo.....	58
5.1.6. Analisi del sangue in laboratorio.....	59
5.1.7. Esame istologico del fegato.....	60
5.1.8. Dati clinici e produttivi.....	62
5.2. <u>Elaborazione dati ed Analisi Statistica</u>	63
6. <u>RISULTATI</u>	65
7. <u>DISCUSSIONI</u>	91
7.1. <u>Risposta metabolica al test da carico del glucosio</u>	91
7.2. <u>Valutazioni istopatologica in relazione ai parametri ematici</u>	97
8. <u>CONCLUSIONI</u>	103
9. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	107

1.ABSTRACT

Objectives of this study were to determine effects of time relative to calving and health status on blood metabolite concentrations after glucose tolerance test (GTT) and to investigate on the severity and on the distribution of periparturient fatty change liver (FCL).

Metabolic profiles were performed on plasma samples collected from 40 cows selected from 2 dairy farms. GTT and Blood sampling was carried out 7 ± 5 d before and 7 ± 5 d after the calving. Glucose was administrated intravenously in a 50% solution at a dose of 0,25 g/Kg. Blood samples were collected before (T0) and after the beginning of the test at different times (T2, T5, T10, T15, T20, T30, T40, T60, T80, T100, T120, T140, T160). Beta-Hydroxybutyrate (BHB), Non-Esterified Fatty Acids (NEFA), Glucose(Glu), Insuline (Ins), Aspartate Aminotransferase (AST-GOT), Alanine Transaminase (ALT-GTP), total proteins (TP), globulins(Gb), albumins(Alb) and Urea were analyzed. Histologic examinations by light microscopy and classifications of samples according to the severity of FCL and Inflammatory infiltrations were done.

The collected data were statistically analyzed by the analysis of variance (ANOVA), using SIGMA STAT 3.7 to evaluate the effect of the period (pre-partum and post-partum) and the farm (farm A and farm B) on the hematic, clinical and productive parameters.

Pearson's coefficients were also calculated between the collected data; finally the AUC (Area Under Curve) of glucose, insulin, NEFA and BHB were calculated.

The result proved that in the post-partum period cows show insulin resistance that causes a reduction of the levels of glucose and insulin ($P<0,005$) and a consequent increase of the levels of NEFA and BHB($P<0,05$); this mechanism permits to spare glucose (and so energy) for the mammary gland for the lactation. All the cows had mild or moderate FCL degree. Results show correlations between lipidic and inflammatory infiltration of hepatocytes in prepartum and levels of NEFA and AST in postpartum. NEFA and AST activity are increased from the prepartum to the postpartum period. High levels of TP and Gb are present in both periods.

These data suggest statistically significant differences ($P<0,05$) between BHB, NEFA, AST and ALT and period.

NEFA and AST are parameters of diagnostic value, also if AST is not a liver specific enzyme. Finally it was also proved that there is a correlation between hematic parameters in the pre-partum and the pathologies of the first days of lactation; imbalances in the energetic metabolism during the pre-partum predispose to developing of clinical disease.

2.RIASSUNTO

Gli obiettivi di questo studio sono di determinare gli effetti del test di tolleranza al carico di glucosio (GTT) sulle concentrazioni dei metaboliti ematici e di indagare sulla gravità e la distribuzione di patologie epatiche (FCL) nel periodo del periparto .

I profili metabolici sono stati effettuati su campioni di plasma prelevati da 40 vacche da latte di razza Frisone selezionate da due aziende Zootecniche in regione Veneto. GTT e campionamento ematico sono stati effettuati 7±5 giorni prima e 7±5 giorni dopo il parto . Il glucosio è stato somministrato per via endovenosa in una soluzione al 50% alla dose di 0,25 g/Kg. I campioni di sangue sono stati raccolti prima (T0) e dopo l'inizio della prova in tempi diversi (T2, T5, T10, T15, T20, T30, T40, T60, T80, T100, T120, T140, T160). Beta-idrossibutirrato (BHB), Acidi Grassi non Esterificati (NEFA), glucosio (Glu), Insulina (Ins), aspartato aminotransferasi (AST-GOT) , alanina transaminasi (ALT-GTP) , proteine totali (TP), globuline (Gb), albumine (Alb) e Urea sono state analizzate. Esami istologici al microscopio ottico e le classificazioni dei campioni sono state fatte in base alla gravità della FCL e infiltrazioni infiammatorie.

I dati raccolti sono stati analizzati statisticamente mediante l'analisi della varianza (ANOVA), utilizzando SIGMA STAT 3.7 per valutare l'effetto in funzione del periodo (pre-parto e post-partum), azienda (Azienda A e Azienda B), profilo ematico e parametri clinici e produttivi.

I coefficienti di Pearson sono stati calcolati anche tra i dati produttivi e, infine, l'AUC (area sotto la curva) di glucosio, insulina, NEFA e BHB sono stati calcolati.

Il risultato attesta che gli animali nel periodo post-partum mostrano resistenza all'insulina che causa una riduzione dei livelli glicemici e insulinemici ($p < 0,005$), con un conseguente aumento dei livelli di NEFA e BHB ($P < 0,05$); questo meccanismo permette di glucosio libero (aumento energia disponibile) per la ghiandola mammaria durante l'allattamento.

Inoltre, tutte le vacche avevano lieve o moderato grado FCL. I risultati mostrano correlazioni tra infiltrazione lipidica e infiammatoria di epatociti in preparto e livelli di NEFA e AST elevati in post-partum ($P < 0,05$). L'attività dei NEFA e AST (GOT) sono aumentati dal preparto al periodo post-partum. Alti livelli di TP e Gb sono presenti in entrambi i periodi. Questi dati suggeriscono differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra BHB, NEFA, AST e ALT e periodo.

NEFA e AST sono parametri di valore diagnostico, anche se quest'ultimo non è un enzima specifico del fegato. Infine, è stato anche dimostrato che esiste una correlazione tra i parametri ematici nel pre-parto e le patologie dei primi giorni di lattazione, squilibri nel metabolismo energetico durante la pre-parto predispongono allo sviluppo della malattia clinica.

3.PREMESSA

Il periodo di transizione nelle bovine da latte, tipicamente identificato tra le 3 settimane preparto e le 3 settimane postparto, è critico, in quanto è associato ad un aumento dell'incidenza delle malattie metaboliche-nutrizionali.

In questa fase la maggior parte delle bovine ad alta produzione presenta bilancio energetico negativo (NEB) in quanto la richiesta di energia supera la loro capacità di assunzione di sostanza secca e si ha un rapido aumento dei fabbisogni energetici legati alla lattazione. Questo periodo è caratterizzato dalla presenza di una quota elevata di acidi grassi non esterificati (NEFA) a livello sierico e da un'eccessiva produzione di corpi chetonici con conseguente accumulo di trigliceridi a livello epatico, unito alla riduzione dell'attività di enzimi cruciali per la gluconeogenesi epatica. Questi fattori, sommati alla produzione e alla secrezione di sostanze ad azione pro-infiammatoria da parte del tessuto adiposo periviscerale, possono influenzare negativamente lo stato di salute e il benessere dell'animale dopo il parto. Inoltre, le bovine sono sottoposte a cambi di dieta e a stress ambientale dovuto all'inserimento in un nuovo gruppo in seguito al parto.

Considerando il ruolo fondamentale del fegato nel metabolismo e che le bovine sono generalmente predisposte a sviluppare patologie metaboliche, l'aumento di frequenza di infiltrazione lipidica del fegato è un fenomeno atteso e molto comune nelle bovine ad alta produzione prima e dopo il parto. Inoltre, le variazioni metaboliche e ormonali proprie del periodo del periparto favoriscono l'incidenza di patologie caratteristiche del primo periodo di lattazione. Quindi, di rilevante importanza è anche lo studio di fenomeni patologici di origine metabolica dovuti a disordini legati al metabolismo glucidico e lipidico, e quindi ascrivibili all'incidenza di fenomeni di Insulino-resistenza nelle vacche da latte nel periodo del periparto.

Dunque, lo scopo del lavoro è di investigare sugli effetti del test di tolleranza al carico di glucosio (GTT) sulle concentrazioni dei metaboliti ematici e di indagare sulla gravità e la distribuzione di patologie epatiche (FCL) nel periodo del periparto.

4. INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni l'allevamento della bovina da latte si è radicalmente trasformato, concentrando sempre più capi ad alto valore genetico in poche aziende tecnologicamente avanzate. La selezione genetica ha comportato un aumento dei livelli di produzione per vacca e con l'innovazione tecnologica si è ottenuto un rilevante miglioramento nei sistemi di alimentazione, nel benessere animale (housing) e nella gestione (Pryce et al., 2004).

Questo ha comportato una maggiore meccanizzazione dell'allevamento con l'intervento di sempre minor impiego di manodopera, andando a discapito del contatto e dell'osservazione del singolo animale. Inoltre, i vantaggi economici per le alte produzioni sono spesso offuscati da disordini metabolici, da processi infiammatori e da problemi riproduttivi, aumentando i costi sia primari che secondari e con una conseguenza negativa, anche, sulla curva di lattazione (Cools et al., 2008).

Considerato l'investimento finanziario che gli allevatori devono affrontare nel creare un allevamento funzionale e redditizio, la selezione genetica ha cercato di ottenere animali in grado di produrre ingenti quantità di latte, andando a discapito della capacità di ingerire sostanza secca e comportando, perciò, squilibri nel bilancio energetico degli animali (Van Arendonk et al., 1991).

Molte delle patologie da produzione infatti sono dovute al divario che si crea tra la richiesta e l'assunzione effettiva di energia e nutrienti, unitamente all'aumento dell'energia utilizzata. Questi squilibri diventano particolarmente evidenti durante il periodo di transizione; infatti, la più alta incidenza di patologie da produzione si concentra nei primi 10 giorni post-parto (Ingvarsen et al., 2003).

Il periodo di transizione è l'intervallo di tempo che va da 3 settimane prima del parto a 3 settimane dopo il parto (Grummer, 1995). Il termine della gravidanza e l'inizio della lattazione sono accompagnati da cambiamenti significativi del profilo endocrino e metabolico della bovina: aumenta la richiesta di nutrienti per lo sviluppo del feto e per la lattogenesi imminente nello stesso momento in cui si verifica una diminuzione nell'assunzione di alimento (e quindi di energia), che viene misurata come ingestione di sostanza secca (Dry Matter Intake o DMI). Questa subisce un calo progressivo da 20 a 40%

durante le ultime 3 settimane di gestazione e in questo modo viene a crearsi uno stato di bilancio energetico negativo (BEN), che compromette la capacità della bovina di far fronte ai cambiamenti fisiologici in atto (Van Saun, 1991). Contemporaneamente, si riscontra un certo grado di immunosoppressione, dovuta a fattori ambientali stressanti a cui è sottoposta la bovina, che quindi risulta essere più suscettibile allo sviluppo di infezioni.

L'animale, di fronte a questo deficit energetico, mobilita e catabolizza parte delle proprie riserve di tessuto adiposo, incrementando la quota di acidi grassi non esterificati (NEFA) presenti a livello sierico. Questo comporta però un'eccessiva produzione di corpi chetonici e un possibile stato di chetosi clinica o subclinica (Duffield et al., 2002; Reynolds et al., 2003; Bradford and Allen, 2005).

Inoltre, l'aumento della concentrazione di NEFA nel sangue, dovuta alla mobilitazione dei lipidi dai tessuti adiposi, implica un'estrazione di questi ultimi da parte del fegato, in misura direttamente proporzionale alle concentrazioni circolanti. I NEFA possono, in questa sede, essere accumulati a livello intracellulare come trigliceridi oppure venire ossidati a fini energetici o, parzialmente, a corpi chetonici.

Infatti, se l'equilibrio tra la lipolisi e la ri-esterificazione degli acidi grassi è disturbato, si assiste ad un aumento della concentrazione dei chetoni nel sangue. Una bassa concentrazione di insulina e la ridotta sensibilità all'insulina nei tessuti nel periparto, stimolano ulteriormente la lipomobilizzazione e inducono ulteriori aumenti nei livelli di NEFA nel sangue.

Quindi la concentrazione sierica di NEFA riflette il grado di lipomobilizzazione mentre la concentrazione di β -idrossibutirrato riflette l'efficacia dell'ossidazione dei lipidi a livello epatico (LeBlanc, 2010).

Il monitoraggio metabolico peripartum delle bovine in lattazione va preferibilmente rivolto alla misurazione dell'adattamento al bilancio energetico negativo. Attualmente, la determinazione dei livelli prepartum degli acidi grassi non esterificati (NEFA) e della concentrazione postpartum dei corpi chetonici rappresenta il modo migliore per valutare lo stato energetico della bovina in lattazione (Duffield et al., 2009).

Esistono molti fattori che, una volta migliorati, possono contribuire a risolvere i problemi metabolici della bovina in fase di transizione. Fra questi rientrano i problemi legati al

punteggio di condizione corporea (bovine sovracondizionate, ovvero con BCS>4), il sovraffollamento, l'insufficiente accesso alle mangiatoie, l'inadeguatezza del volume di alimento offerto, i problemi legati alla qualità dell'acqua e del foraggio, le drastiche transizioni tra le diete per le bovine in asciutta e per quelle che hanno appena partorito (LeBlanc, 2010).

4.1 PERIODO DI TRANSIZIONE

Il periodo di transizione, che comprende le tre settimane precedenti il parto e si estende fino alla terza settimana di lattazione, rappresenta senza dubbio, nella bovina da latte, il periodo maggiormente a rischio per quanto riguarda l'insorgenza di numerose malattie metabolico-nutrizionali dovute a profondi cambiamenti metabolici ed endocrini. Infatti, le vacche da latte, come la maggior parte dei mammiferi, immediatamente dopo il parto entrano in un periodo nel quale si verifica uno spostamento della richiesta metabolica. In questa fase, si passa da un incremento delle riserve di principi attivi che sono necessari allo sviluppo fetale e mammario, a una rapida mobilitazione dei depositi proteici e lipidici per il metabolismo energetico e il supporto alla produzione latte. A questa nuova domanda di energia non corrisponde però l'assunzione di ulteriori sostanze nutritive, anzi. Si entra così in una fase cosiddetta di bilancio energetico negativo, causata da un lato da un calo dell'ingestione di sostanza secca e dall'altro dal rapido aumento dei fabbisogni energetici legati alla lattazione (Butler, 2000; Drackley *et al.*, 2001; Overton and Waldron, 2004).

L'animale, di fronte a questo deficit energetico, mobilita e catabolizza parte delle proprie riserve di tessuto adiposo, incrementando la quota di acidi grassi non esterificati (NEFA) presenti a livello sierico. Questo comporta però un'eccessiva produzione di corpi chetonici e un possibile stato di chetosi clinica o subclinica (Duffield *et al.*, 2002; Reynolds *et al.*, 2003; Bradford and Allen, 2005).

Inoltre, l'aumento della concentrazione di NEFA nel sangue implica un'estrazione di questi ultimi da parte del fegato, in misura direttamente proporzionale alle concentrazioni circolanti. I NEFA possono, in questa sede, essere accumulati a livello intracellulare come trigliceridi oppure venire ossidati a fini energetici o parzialmente a corpi chetonici.

L'ingrassamento della bovina in questa serie di processi, che vedono il fegato come perno centrale, è un aspetto fondamentale: vacche ipercondizionate, cioè con un body condition score (BCS) superiore a 4, vanno incontro a un accumulo di trigliceridi in sede epatica superiore a quelle più magre. Inoltre, l'ipercondizionamento interferisce con l'ossidazione degli acidi grassi, favorendo un ulteriore accumulo di trigliceridi epatici e riducendo l'attività di enzimi cruciali per la gluconeogenesi (Butler, 2003; Druckley *et al.* 2005).

L'attività del fegato, come appena detto, ha un ruolo molto importante nel corso dei processi metabolici sopra nominati. Essa, al pari della produzione di sostanze ad azione proinfiammatoria secrete dal tessuto adiposo periviscerale, è controllata attraverso l'espressione coordinata di un gran numero di geni (Columbano and Ledda-Columbano, 2003).

I fattori che sono in grado di contribuire ai cambiamenti di questa espressione genica sono diversi: si va da quelli ambientali, a quelli nutritivi, autocrini, endocrini e, infine, paracrini. Le biotecnologie genomiche, decisamente sensibili alle variazioni del bilancio energetico durante il periodo di asciutta, risultano particolarmente utili, soprattutto per identificare numerosi meccanismi di adattamento omeostatico di tutto l'organismo. Allo stato attuale della ricerca, per evitare o limitare forme di chetosi, si punta a massimizzare l'ingestione e aumentare nella dieta la quantità di energia prima del parto (Grummer *et al.*, 2004).

Alcuni lavori più recenti, tuttavia, suggeriscono che anche le bovine, che sono sovralimentate durante il periodo di asciutta (> 140,00% del fabbisogno energetico netto), pur senza ingrassare, presentano un maggior rischio di insorgenza di patologie nel post-partum che comportano, tra le numerose conseguenze, anche un peggioramento dell'efficienza riproduttiva, aspetto fondamentale nell'allevamento di questa specie animale (Dann *et al.*, 2005; Dann *et al.*, 2006).

Inoltre, secondo alcuni studi, certe diete per bovine da latte in asciutta, caratterizzate da un'elevata densità energetica ottenuta incrementando i carboidrati senza fibra o dei grassi, non prevencono le condizioni patologiche correlate alla fase di transizione, ma provocano nell'animale solamente un incremento eccessivo dello stato di ingrassamento (Grummer, 2008).

A tal proposito, è stato accertato che, nell'uomo, l'obesità è strettamente correlata alla "sindrome metabolica", condizione patologica caratterizzata dalla presenza simultanea di diversi disordini metabolici quali dislipidemia, insulino-resistenza, diabete mellito di tipo 2, ipertensione arteriosa e malattie cardiovascolari (Kim *et al.*, 2003).

Ricerche condotte in ambito umano hanno inoltre dimostrato l'esistenza di una relazione tra la "sindrome metabolica" e alcuni parametri ematologici e biochimici, tra cui fibrinogeno (Imperatore *et al.*, 1998), proteina C reattiva (Santos *et al.*, 2005), interleuchina 6, leptina (Yanagawa *et al.*, 2007), adiponectina e grelina (Elbatarny *et al.*, 2007). Alcuni tra questi parametri sono stati rilevati anche nel cane, ma ulteriori studi saranno necessari per stabilire delle relazioni certe con lo stato di ingrassamento (Jeusette *et al.*, 2005; Ishioka *et al.*, 2006; Ishioka K *et al.*, 2006).

Sempre nell'uomo, anche l'attività del tessuto adiposo bianco, ossia quello composto da adipociti con complessità strutturale bassissima, citoplasma occupato in gran parte da un grande e unico vacuolo lipidico e scarsi mitocondri, risponde a una moltitudine di stimoli (Trujillo and Scherer, 2006).

Esso è distinguibile in grasso sottocutaneo e grasso viscerale. Oltre a questa distinzione anatomica e di sede, queste due tipologie di tessuto si comportano anche funzionalmente in modo diverso: ciò che cambia significativamente nei due tipi di deposizione grassa è che, posto in condizioni di iperalimentazione, il tessuto adiposo viscerale va incontro a una crescita dimensionale prevalentemente ipertrofica, mentre il sottocutaneo tende a dare una risposta iperplastica (Xu *et al.*, 2003).

A parità di obesità, nel caso di quella viscerale, cambia radicalmente il comportamento funzionale dell'adipocita. Questa, infatti, rappresenta un fattore di rischio importante per la progressione diabetica e la principale causa di complicanze durante la "sindrome metabolica" (Sethi and Vidal-Puig, 2007).

Il tipo di aumento volumetrico del pannicolo adiposo nell'obesità viscerale porta a un'alterazione strutturale e funzionale dei singoli adipociti e, in particolare, all'alterazione del profilo di secrezione delle adipochine, cioè di tutte le molecole sintetizzate e secrete dal tessuto adiposo (Shimomura *et al.*, 1999).

Un adipocita, infatti, produce molte molecole di natura ormonale e altre con effetti proinfiammatori. Tra questi vi sono la leptina, l'adiponectina e numerose citochine infiammatorie. La quantità relativa e la scelta tra quali adipochine produrre è fatta dall'adipocita in base al suo stato funzionale: l'ipertrofia aumenta la produzione di leptina e viceversa riduce la produzione di adiponectina.

4.1.1 Bilancio Energetico: Fabbisogno energetico e Assunzione di Energia

L'energia necessaria per le vacche da latte viene espressa come energia netta per la lattazione, consiste principalmente in energia per il mantenimento e per la lattazione.

L'energia richiesta per la gestazione diventa necessaria dopo i 190 giorni fidi gravidanza..

L'energia giornaliera necessaria per una vacca da latte in asciutta del peso di 700 Kg è di 11,5 MCal di energia netta da 220 giorni di gestazione, aumentando, in maniera approssimativa, di 13 MCal verso i 270 giorni di gestazione.

All'inizio della lattazione l'energia necessaria aumenta drasticamente a causa del repentino aumento della produzione di latte (Goff and Horst, 1997).

Solo pochi giorni dopo il parto, dovrebbero aver bisogno di 25 MCal al giorno considerando una produzione media di 20 litri di latte e di 45 MCal al picco di lattazione per una produzione media di 45 litri (National Research Council 2001). 13

Di conseguenza, l'energia necessaria all'inizio lattazione può, anche, aumentare di ben 3 volte quella richiesta dall'utero gravido in pochi giorni.

L'assunzione di sostanza secca e le funzioni ruminali a metà e fine lattazione e anche all'inizio del periodo dell'asciutta sono, in condizioni fisiologiche normali, di facile gestione anche il fabbisogno energetico è rispettato e se in alcune occasioni è in eccesso va ad aumentare le riserve di grasso e proteine della vacca (Grummer, 2008).

Durante l'ultimo periodo di gestazione l'assunzione di sostanza secca e i fabbisogni energetici diventano limitati a causa della crescita del feto. L'attività ormonale subisce dei cambiamenti con un aumento delle concentrazioni di estrogeni e di glucocorticoidi (Grummer et al 2004).

La diminuzione di assunzione di sostanza secca è stata stimata del 5% a partire dai 215 giorni di gestazione per arrivare sino al 30% nelle prime due settimane di lattazione (Doepel et al 2002).

L'assunzione di sostanza secca raggiunge i livelli più bassi attorno al parto, per cambi di razione, di ambiente e anche lo stress del parto contribuisce a questo declino.

Dopo il parto, si ha un recupero molto lento nell'assunzione di sostanza secca, ma è il fabbisogno energetico che non si riesce a sostenere.

Mentre il picco di lattazione avviene solitamente dalle 4 alle 8 settimane dopo il parto, l'assunzione di sostanza secca raggiunge il suo picco a 10-22 settimane post parto, in questo periodo l'animale si trova in un Bilancio Energetico Negativo (BEN) (Beam and Butler, 1997; Butler, 2000).

Il BEN raggiunge il suo livello più basso attorno ai 14 giorni di lattazione e questo periodo dura fino ai 70 giorni di lattazione circa (Doepel et al, 2002), ma la gravità e la durata sono soggette a enormi variazioni tra le vacche stesse. I fattori che influenzano l'assunzione di energia, così come 14

la condizione corporea al parto, le patologie del periparto, la qualità degli alimenti, la funzionalità ruminale e l'adattamento al nuovo gruppo hanno un impatto più importante sul BEN che non i reali fabbisogni energetici di inizio lattazione. (Jorritsma et al, 2003).

4.1.2 Meccanismi di Adattamento

Durante il periodo di asciutta il fabbisogno energetico è facilmente soddisfatto. Alti livelli di insulina permettono ai grassi e alla muscolatura striata di assorbire il glucosio circolante, inoltre inibiscono la lipolisi a livello epatico facendo sì che i NEFA vengano trasformati in VLDL (Very Low Density Lipoprotein), convertite poi in tessuto adiposo.

Nel periodo della gravidanza la bovina attua una serie di strategie metaboliche volte a fornire nutrienti ed energia al feto. Queste strategie includono cambiamenti del metabolismo non solo dei carboidrati e delle proteine, ma anche a livello lipidico. Si assiste infatti ad un aumento della gluconeogenesi epatica, ad una ridotta utilizzazione del glucosio nei tessuti periferici, ad un moderato aumento della mobilizzazione di NEFA dal tessuto

adiposo, associato a un aumento dell'utilizzazione periferica di NEFA e del loro metabolismo epatico (Bell, 1995).

L'aumento del metabolismo lipidico non permette al feto di ricavare direttamente energia dai substrati che ne derivano, ma favorisce il risparmio del glucosio materno a vantaggio del feto stesso.

Questi meccanismi di adattamento sono caratterizzati da una forte diminuzione della concentrazione basale dell'insulina e del rilascio dell'insulina pancreatico-indotta (Bell, 1995; Holtenius et al., 2003), oltre che da una moderata insulino-resistenza, che è stata osservata in diverse specie di mammiferi durante la gravidanza (Père et al., 2000). Ciò esita in una diminuita capacità dell'insulina di inibire la lipolisi e promuovere la lipogenesi, e favorisce così la mobilizzazione delle riserve di grasso materne. È stato dimostrato come all'inizio della lattazione la soppressione della lipogenesi sia associata a bassi livelli plasmatici di insulina (Hart et al., 1978).

La diminuzione della concentrazione basale di insulina assume un ruolo importante anche dopo il parto, nella prima fase di lattazione, avendo la finalità di permettere un maggior assorbimento di glucosio a livello della mammella, a discapito del tessuto adiposo e del muscolo scheletrico. Si sa infatti che nei muscoli striati e nel tessuto adiposo sono predominanti i canali di trasporto del glucosio GLUT4 insulino dipendenti, mentre nella mammella, nei tessuti fetali e nel fegato si trovano principalmente i GLUT1, 2 e 3 che agiscono in maniera indipendente dall'insulina (Zhao et al, 2006; Zhao and Keating, 2007). Così una bassa concentrazione di insulina riduce fortemente l'azione dei GLUT4 e quindi l'assorbimento del glucosio nei muscoli scheletrici e nel tessuto adiposo, aumentando la disponibilità di glucosio per i tessuti insulino indipendenti.

L'assorbimento del glucosio è costante e la mammella può consumare il 97% di tutta l'energia disponibile fornita attraverso l'alimentazione (Drackley, 1999). La mammella può, inoltre, utilizzare l'85% di tutto il glucosio ematico (Knight et al, 1994).

Alla diminuzione dei livelli ematici di insulina si associa un aumento del glucagone, il quale attiva direttamente i meccanismi gluconeogenetici a livello epatico al fine di aumentare il livello di glucosio circolante.

Nelle prime settimane di lattazione la produzione di glucosio epatico aumenta più del doppio rispetto al periodo dell'asciutta (Reynolds et al., 2003); la piruvato carbossilasi e la fosfoenol piruvato carbossilasi, enzimi coinvolti nella gluconeogenesi, subiscono un importante incremento nella loro attività. Di conseguenza risulta fondamentale garantire alla bovina un'adeguata quantità di propionato tramite la dieta, essendo questo il maggior precursore per la sintesi epatica di glucosio.

Un altro fattore importante che interviene nell'ultimo periodo di gravidanza è l'ormone della crescita, anche conosciuto come somatotropina (GH), che ha un ruolo fondamentale nella crescita e nel metabolismo degli animali; la sua concentrazione aumenta durante la gravidanza fino ad arrivare a un picco al momento del parto. Nel complesso il GH contribuisce all'alterazione della risposta all'insulina da parte dei tessuti, che porta a una moderata produzione di glucosio, una diminuzione della gluconeogenesi e ad un aumento della lipolisi a discapito del processo di lipogenesi. E' stato dimostrato che nel fegato il GH diminuisce la risposta insulino-mediata con inibizione degli enzimi della gluconeogenesi, aumentando la produzione di glucosio epatico (Dunshae et al., 1992).

In uno studio di Bauman and Vernon (1993) è stato dimostrato che le bovine trattate con somatotropina riducono il tasso di lipogenesi e l'attività degli enzimi coinvolti in essa nel tessuto adiposo, apparentemente tramite un meccanismo di inibizione della risposta all'insulina. Inoltre la somatotropina amplifica la risposta lipolitica alle catecolamine (Sechen et al., 1990).

Nel muscolo e nel tessuto adiposo il GH diminuisce l'azione dei GLUT4 (Zhao and Keating, 2007), fatto che porta ad una diminuzione dell'ossidazione del glucosio nei tessuti periferici in favore dell'assorbimento del glucosio a livello mammario.

L'ormone della crescita ha un ruolo importante anche come fattore galattopoietico, in quanto stimola la produzione di latte, una volta che la lattazione è iniziata (Bauman and Vernon, 1993).

Durante il periodo di transizione nella bovina aumenta anche la risposta a fattori adrenergici quali le catecolamine, che vanno ad amplificare il processo della lipolisi a livello di tessuto adiposo. E' stato infatti osservato che si verifica un incremento sostanziale nel numero di

recettori β adrenergici degli adipociti nella bovina durante il periodo del parto (Jaster and Wegner, 1981).

La quantità di latte prodotto dipende dal tasso di lattosio sintetizzato dalle cellule della ghiandola mammaria. Il lattosio agisce come agente osmotico, richiamando acqua nel lume della mammella (Zhao and Keating, 2007). Il lattosio è formato da due molecole di galattosio, derivate dal glucosio ematico. Per la produzione di 1 Kg di latte, servono circa 72 g di glucosio. La quantità di glucosio necessaria al picco di lattazione può raggiungere anche i 4 Kg al giorno (Bell, 1995; Drackley et al, 2001).

I tentativi per diminuire il BEN mediante l'uso di grassi nella dieta si è dimostrato controproducente, mentre l'uso dei precursori gluconeogenici hanno ridotto il BEN (Grummer, 2008).

Si può considerare il glucosio come un fattore limitante nella lattazione e il BEN corrisponde a un bilancio negativo di glucosio.

Nonostante la diminuita assunzione di sostanza secca le bovine mantengono elevate produzioni perché la ghiandola mammaria ha una via preferenziale nell'assorbimento del glucosio. Tutto questo è dimostrato dalla:

- Diminuzione del consumo di glucosio in tessuti extra-mammari;
- Massimizzazione della produzione di glucosio epatico;
- Mobilizzazione delle riserve energetiche per fornire energia ai tessuti extra-mammari.

Questa suddivisione delle varie fonti disponibili di energia è il risultato di una serie di alterazioni nella concentrazione e nella risposta di alcuni ormoni che influenzano il fegato, il tessuto adiposo, il muscolo

scheletrico e la mammella. Queste alterazioni sono definite come "cambi omeoretici" (Bauman and Currie, 1980).

4.2 GLICEMIA E INSULINEMIA

La glicemia presenta valori molto simili e costanti tra le diverse specie animali, con leggere variazioni all'interno dell'intervallo di riferimento (70/100mg/dL) per uomo e per la maggior parte degli animali domestici, misurata dopo diverse ore di digiuno. Dopo un prolungato periodo di digiuno il valore della glicemia è comunque preservato grazie all'attivazione di sensibili e complessi meccanismi di regolazione. Tale sistema di regolazione è fondamentale perché sia la condizione di iperglicemia che di ipoglicemia sono pericolose e per l'organismo. Persistenti valori di glicemia superiori all'intervallo di riferimento, riscontrabili in patologie quali il diabete mellito, possono provocare diversi problemi dovuti all'incremento della pressione osmotica nel liquido extracellulare, che causa disidratazione delle cellule e causa perdita di glucosio con l'urina per diuresi osmotica. Nei pazienti diabetici i livelli di glucosio ematico persistentemente alti provocano inoltre danni al sistema cardiovascolare, aumentando il rischio di insufficienza cardiaca, ictus cerebrale, insufficienza renale e cecità. Nonostante tutto gli animali riescono a compensare in un prolungato stato di iperglicemia, mentre lo stato di ipoglicemia è potenzialmente letale, nel momento in cui la concentrazione di glucosio nel sangue scende al di sotto di 50 mg/dL: mal di testa, tremori, fascicolazioni, convulsioni, perdita di coscienza e morte. Queste condizioni sono causate dall'insufficiente apporto di glucosio al cervello che non è in grado di utilizzare nessuna fonte energetica alternativa a causa dell'impermeabilità della barriera emato-encefalica a molte sostanze. Diversamente alle altre specie animali ed ai giovani ruminanti, nei ruminanti adulti la concentrazione postprandiale plasmatica di glucosio ha un intervallo compreso tra 40 a 60 mg/dL, valori inferiori ai fisiologici intervalli di riferimento riscontrati nei sopraccitati casi (Hsu and Crump, 1989). Nei ruminanti, i carboidrati e le proteine assunti con la dieta vengono convertiti all'interno del rumine e del reticolo ad acidi grassi volatili (AGV) ed alcune altre biomolecole (ammoniaca e proteine microbiche), grazie ai processi di degradazione e di fermentazione mediate dalla flora microbica. Solo una piccola parte del glucosio transita direttamente attraverso al rumine ed al reticolo e viene assorbito a livello intestinale, mentre la maggior parte del fabbisogno di glucosio è sopperito dalla gluconeogenesis epatica (Young, 1976). Per questo dunque, la concentrazione plasmatica di

glucosio nei ruminanti è inferiore a quella riscontrabile nei non-ruminanti. Dunque i ruminanti risultano capaci di tollerare importanti fluttuazioni del valore di glicemia rispetto ai non-ruminanti e sono meno sensibili agli effetti dell'ipoglicemia. Ad esempio, I valori di glicemia nelle pecore allevate al pascolo l'intervallo di riferimento per la glicemia è compreso tra valori di 30 e 60 mg/dL, a seconda del periodo e della stagione. Tale variabilità nel valore di glicemia può essere spiegata dalle modifiche nel fabbisogno glucidico che si verifica durante la lattazione e la gravidanza. Questa situazione di variabilità è spesso influenzata da alterazioni nella qualità dell'alimento disponibile nei pascoli durante le diverse stagioni dell'anno, la richiesta energetica per l'accrescimento del feto durante la gravidanza e per la produzione di latte dopo il parto. I ruminanti affrontano questa importante richiesta energetica tramite l'utilizzo di una fonte energetica alternativa quale gli AGV (acido acetico, acido propionico ed acido butirrico), i quali sono largamente prodotti dalle fermentazioni batteriche ruminali. Tra questi AGV, esclusivamente l'acido propionico assume un ruolo importante nella gluconeogenesi. Poiché quindi la gluconeogenesi è supportata da tali componenti derivanti dall'acido propionico, la composizione della dieta può indirettamente influenzare i livelli plasmatici di glucosio (Wilson et al., 1983).

4.2.1. Meccanismo di regolazione glicemico

La regolazione della glicemia avviene a diversi livelli tramite l'intervento di meccanismi mediati dal sistema endocrino e nervoso, che attraverso risposte rispettivamente endocrine, nervose nonché comportamentali in grado di mantenere costante il livello di glucosio plasmatico (Aguggini et al., 2000). I meccanismi coinvolti nell'omeostasi del glucosio sono diversi, tra cui:

1. Risposta delle cellule delle isole pancreatiche implicate nella secrezione del glucagone e dell'insulina a seconda delle condizioni di ipo o iperglicemia rispettivamente. Quando l'insulina si lega ad i recettori cellulari si innesca la cascata di processi cellulari che promuove l'assorbimento del glucosio dal letto vascolare all'interno delle cellule, nonché allo stoccaggio all'interno del citoplasma cellulare. L'insulina viene quindi definito come un ormone anabolizzante, poiché agisce nella deposizione intracellulare dei nutrienti. L'insulina ricopre diversi ruoli nel

metabolismo di carboidrati, lipidi e proteine. Il glucagone invece è il più importante ormone nella regolazione dei meccanismi che portano alla cessazione delle attività svolte dall'insulina.

2. Intervento del sistema nervoso centrale (SNC), che promuove la sensazione di fame, l'appetito e la ricerca di cibo, quando le riserve di glucosio scarseggiano. Al contrario della maggior parte delle cellule del SNC, alcuni neuroni ipotalamici sono sensibili alle alte concentrazioni di glucosio plasmatico e richiedono l'intervento dell'insulina per lo stoccaggio dello stesso. Tale situazione è esacerbata nella persistente sensazione di fame ed insaziabilità che si evidenzia nei pazienti diabetici, in cui la persistente condizione di iperglicemia per insufficiente secrezione o di incapacità di azione dell'insulina. D'altro canto, l'insulina genera una sensazione di sazietà esclusivamente quando la glicemia rimane elevata, in caso contrario la stessa insulina stimola la sensazione di fame e provoca ipoglicemia. In parte la secrezione di insulina è anche controllata dal nervo vago. Così come la visione del cibo, la percezione dell'alimento tramite il sistema olfattivo e la percezione del gusto tramite i recettori linguali o stimoli condizionati riferiti all'alimento, determinano un rilascio di insulina con rinforzo della sensazione di fame e di interesse per l'alimento.
3. Il rilascio di catecolamine da parte della porzione midollare delle ghiandole surrenali avviene nelle situazioni di pericolo. L'epinefrina è immediatamente rilasciata su larga scala e molto rapidamente, provocando un immediato effetto iperglicemizzante che prevede la glicogenolisi epatica e la lipolisi adipocitaria e nelle cellule muscolari.
4. I glucocorticoidi secreti dalla porzione corticale delle surrenali vengono liberati in situazioni di stress ed in tutte le altre situazioni in cui c'è una generica alterazione dell'omeostasi. In questi casi l'ipotalamo secreta il CRF (Fattore di rilascio delle corticotropine) il quale va ad agire sull'ipofisi stimolando il rilascio dell'ACTH (ormone adrenocorticotropo) che promuove la sintesi e la liberazione dei glucocorticoidi nel sangue. Analogamente all'epinefrina, gli effetti dei glucocorticoidi provocano iperglicemia mediante la soppressione della sintesi delle proteine e l'interruzione della deposizione di glucosio epatico, a scopo di preservare la funzionalità del SNC.

5. La funzione della ghiandola tiroide svolge fundamentalmente un'attività iperglicemizzante atta all'incremento del catabolismo proteico e lipidico, incremento della funzione di assorbimento di principi nutrienti da parte dell'intestino, aumento della funzione del sistema nervoso autonomo simpatico per la sinergica collaborazione con le catecolamine nella mobilitazione delle riserve glucidiche, proteiche e lipidiche.
6. L'ormone somatotropo, o somatotropina, ha un'azione iperglicemizzante, opposta all'insulina: deprime l'uptake di glucosio da parte delle cellule, facilitando e al contrario, il consumo da parte dei tessuti ed in particolare favorisce la mobilitazione delle riserve lipidiche a sostegno della richiesta di sintesi proteica importante durante le fasi di accrescimento, lattazione e gestazione.

Quale ghiandola endocrina il pancreas secreta ormoni peptidici tra cui l'insulina dalle cellule β , il glucagone dalle cellule α , la somatostatina dalle cellule δ , il polipeptide pancreatico dalle cellule F (Hsu and Crump, 1989). Tali cellule sono localizzate in cluster denominati isole di Langerhans, disseminate all'interno del parenchima pancreatico esocrino, che costituiscono l'1-3% della massa parenchimale del pancreas con un'approssimazione di 2500 cellule/isola pancreatica e di un milione di isole pancreatiche nel pancreas umano. La proporzione di cellule β , α , δ ed F sono circa 60%, 30%, 8% e 2% rispettivamente (Hsu and Crump., 1989; Hadlet, 1996).

La biosintesi dell'insulina è un evento molto complesso caratterizzato dalla formazione di due precursori dell'insulina: preproinsulina, composta da una catena acida (A) basica (B) e di una catena peptidica (C) che connette le due catene A e B in un singolo polipeptide composto da 97 amminoacidi, e dalla proinsulina formata in seguito al clivaggio di 23 residui del peptide C ed alla formazione di ponti disolfidrici tra catene A e B all'interno del reticolo endoplasmatico rugoso (RER). In seguito al trasporto della proinsulina all'interno dell'apparato del Golgi, il peptide C viene quindi rimosso dai granuli secretori e proinsulina e peptide C vengono stoccati all'interno del citosol (Hadley, 1996). Vengono entrambi rilasciati nel medesimo istante, per questo motivo il peptide C può essere misurato come indicatore sensibile della produzione endogena di insulina nei pazienti sottoposti a terapia

insulinica (Swenson e Reece, 2002). L'insulina consiste in due catene peptidiche, A e B, costituite da 21 e 30 amminoacidi rispettivamente, connessi da ponti disolfidrici.

Le differenze biochimiche riscontrabili tra i diversi tipi di insulina secreta da diversi mammiferi sono minime, e questo non influenza gli effetti biologici nella somministrazione di insulina eterologa, ma può causare bensì reazioni immunitarie di tipo anticorpale dopo trattamenti prolungati (Ganong, 1991). Ad esempio, la treonina localizzata in posizione 30 nella catena B dell'insulina umana è sostituita dall'alanina nell'insulina bovina (Hsu e Crump, 1989).

4.2.2 Ruolo fisiologico dell'insulina

Dal momento in cui l'insulina viene sintetizzata, viene secreta in due diverse fasi dopo l'entrata

del glucosio nelle cellule β del pancreas endocrino.

La prima fase prevede il rilascio rapido dell'insulina in 3-5 minuti, fino a quando la concentrazione di glucosio nel sangue aumenta. Questa prima secrezione ormonale ha una durata breve di circa 5-10 minuti. La seconda fase prevede un lento rilascio di insulina formatasi all'interno delle vescicole intracellulari stimulate dall'incremento dei livelli di glucosio (Guyton et Hall, 2000). Tale fase inizia dopo 15 minuti circa ed aumenta fino a raggiungere il plateau in 2-3 ore, arrivando a livelli nettamente più alti rispetto alla fase iniziale.

Il rilascio di insulina avviene tramite meccanismo di esocitosi. In seguito all'aumento di glucosio nel sangue, il glucosio viene captato da specifiche proteine di trasporto localizzate sulla membrana cellulare, il recettore GLUT-2 insulino-indipendente, e tramite quest'ultimo entra all'interno della cellula. Successivamente il metabolismo del glucosio genera un aumento dell'ATP all'interno della cellula. Un elevato rapporto ATP/ADP inibisce i canali potassio ATP dipendenti della membrana delle cellule β , permettendo la depolarizzazione della cellula e così l'entrata di calcio extracellulare attraverso i canali per il calcio voltaggio dipendenti. Avviene quindi una fusione delle vescicole reticoloplasmatiche con la membrana cellulare e quindi l'esocitosi dell'insulina nel circolo ematico (Kumar et al., 2005).

La trasduzione del segnale insulinico implica una complessa rete di meccanismi biochimici che iniziano a livello cellulare e regolano l'omeostasi del glucosio. Il recettore insulinico è un dimero di due subunità α e di due subunità β . La subunità α è localizzata sulla superficie cellulare, lega l'insulina plasmatica, la subunità β al contrario si trova sul versante intracellulare della membrana plasmatica e dispone di un dominio tirosin-chinasi (Kahn, 1994). La subunità α agisce come un enzima in grado di attivare l'insulina che dopo il legame con la prima subunità provoca l'autofosforilazione ATP dipendente della subunità β , la quale innesca l'attività tirosin-chinasi all'interno della cellula. Così, il complesso ormone-recettore viene internalizzato nel citosol e successivamente a livello intracellulare vengono liberati secondi messaggeri in una reazione a catena che coinvolge fosforilazioni e defosforilazioni enzimatiche. Tali messaggeri sono specifici per gli effetti biologici specifici dell'insulina, che per semplicità, verranno di seguito suddivisi in funzioni mitogeniche e metaboliche. Ad esempio, la fosforilazione e l'attivazione della guanosina trifosfato (complesso RAS) e la Mitogenic-activated protein kinase (MAPK) sono responsabili della funzione di espressione mitogenica come la crescita cellulare, proliferazione ed espressione genica; la fosforilazione della fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI-3K) è coinvolta in meccanismi fondamentali quali la sintesi dei lipidi, proteine e glicogeno. Il meccanismo d'azione della PI-3K più importante è quello coinvolto nella distribuzione del glucosio utilizzato a livello cellulare, mediante il legame con i vari trasportatori del glucosio (recettori e trasportatori GLUT), promuove la traslocazione delle vescicole contenenti GLUT-4 sulla membrana cellulare, incrementando quindi l'entrata di glucosio nella cellula (Kumar et al., 2006). La diversa capacità dei tessuti di accumulare glucosio a livello intracellulare dipende dalla tipologia e dalla quantità di recettori per il glucosio di cui sono dotate le membrane delle cellule del tessuto. Ad esempio, GLUT-1 è il recettore glucidico maggiormente presente nel cervello, placenta, ghiandola mammaria ed eritrociti; GLUT-2 in fegato, reni e pancreas; GLUT 3 in cervello e placenta; GLUT 4 nei tessuti adiposi, muscolo scheletrico e muscolo cardiaco. GLUT -5 nel piccolo intestino (DeFronzo et al., 1992). Tra questi, solo il recettore GLUT 4 necessita dell'insulina per l'uptake di glucosio. Al contrario il fegato e la ghiandola mammaria sono definibili come organi non sensibili all'insulina. Gli effetti dell'insulina dipendono largamente

dalla tipologia di tessuto, ad ogni modo l'insulina è fondamentale per l'uptake di glucosio nel tessuto adiposo e muscolare (Zhou et al., 1999).

4.2.3 Ruolo dell'insulina nel metabolismo:

L'insulina permette l'entrata di glucosio all'interno delle cellule ed il suo stoccaggio sotto forma di glicogeno, specialmente nel tessuto adiposo e muscolare. La mobilitazione del glucosio all'interno delle cellule avviene attraverso due meccanismi: incremento dell'esocitosi e diminuzione dell'endocitosi del recettore GLUT-2 negli epatociti, e la stimolazione dell'attività della glucochinasi la quale è responsabile della fosforilazione del glucosio a glucosio-6-fosfato (G6P) (Katzung, 1995). La rapida fosforilazione del glucosio garantisce il mantenimento di livelli bassi di glucosio a livello intracellulare. Così il gradiente biochimico tende a richiamare il glucosio all'interno delle cellule, ma l'insulina accelera questa traslocazione. Allo stesso modo l'insulina facilita l'entrata di glucosio all'interno delle cellule adipose attraverso il recettore GLUT 4, dove il glucosio viene ossidato ed esterificato ad acidi grassi liberi durante la lipogenesi. Questo fenomeno è altamente specifico e prettamente limitato al glucosio e a pochi altri zuccheri simili, i quali possono competere per i medesimi trasportatori (Ganong, 1991). Il fegato utilizza i recettori GLUT-2, il tessuto muscolare invece esprime il GLUT-4. La glicolisi è promossa dall'insulina attraverso l'attivazione della fosfofruttochinasi e della piruvatochinasi, le quali trasformano il glucosio in lattato e piruvato rispettivamente (Berne and Levy, 1993). La sintesi del glicogeno è mediata dall'attivazione della glicogeno-sintetasi. Nei ruminanti l'insulina è in grado di attivare la glicogeno-sintetasi, ma al contrario l'attività della glucochinasi è ridotta o addirittura assente nel fegato (Brockman e Larveld, 1986). Al contrario l'hexochinasi è coinvolta nell'uptake di glucosio nel fegato dei ruminanti (Brockman, 1984).

L'insulina successivamente impedisce la produzione di glucosio dai substrati non-glucidici, tramite l'inibizione di enzimi specifici per la gluconeogenesi (piruvato carbossilasi e fosfoenolpiruvatochinasi) (O'Brien e Granner, 1990) e la glicogeno fosforilasi per la glicogenolisi.

Nel tessuto adiposo e nel muscolo, l'insulina promuove l'esterificazione degli acidi grassi e la sintesi dei trigliceridi a partire dai substrati intracellulari. Nei vasi di piccolo calibro del

tessuto adiposo l'insulina stimola la lipoproteina lipasi (LPL) e la divisione dei TG e l'ingresso degli acidi grassi nelle cellule. Gli acidi grassi volatili sono riesterificati con glicerofosfato, un derivato della glicolisi, glicerolo o altri acidi grassi. I precursori della lipogenesi sono diversi tra ruminanti e non ruminanti: il glucosio è il maggior precursore per la lipogenesi nel tessuto adiposo dei non-ruminanti, mentre l'acetato è il maggior precursore nei ruminanti (Prior e Scott, 1980). Inoltre nel fegato, l'insulina stimola la lipogenesi ed inibisce la chetogenesi (Brockman, 1978, 1979). Il Malony-CoA rappresenta il primo step per la formazione degli Acidi Grassi. Gli acidi grassi non esterificati mobilizzati dal tessuto adiposo sono la fonte primaria per la lipogenesi epatica nei ruminanti (Emery et al., 1992).

L'Insulina può inibire la lipolisi rallentando l'attività della lipasi e della proteinkinasi A e abbassare il livello di cAMP. Inoltre, il controllo dell'insulina di lipogenesi e lipolisi delle cellule del tessuto adiposo inferiori circolanti di acidi grassi non esterificati (NEFA), riduce l'assorbimento dal fegato e migliora l'utilizzazione dei chetoni a livello periferico. In sintesi, è chiaro che l'insulina principalmente favorisce l'utilizzo di carboidrati come fonte energetica. Invece, deprime l'utilizzo di grasso dai tessuti, ad eccezione di CNS.

L'insulina interviene sul metabolismo delle proteine attraverso l'attivazione di amminoacidi all'interno della cellula, diminuisce la proteolisi e la scomposizione delle proteine all'interno dei lisosomi, favorisce l'aumento di sequenze di DNA trascrizionale, aumenta la traduzione mRNA e la sintesi proteica. Gli enzimi responsabili alla formazione di carboidrati, lipidi e proteine sono indotta dall'insulina. Grazie alla sua influenza anabolizzante, l'insulina è anche coinvolto nel processo di crescita e collabora con altri ormoni anabolizzanti, come la somatotropina (ormone della crescita, GH) e gli androgeni (Guyton e Hall, 2000). Nel caso di insulina, promuove la secrezione della valina, leucina, fenilalanina e tirosina.

Quanto al metabolismo minerale, l'insulina facilita l'ingresso di ioni potassio nel muscolo e nelle cellule del miocardico aumentando l'attività della pompa Na^+/K^+ ATPasi nella membrana cellulare. La conseguenza è una diminuzione del potassio nel liquido extracellulare e conseguente iperpolarizzazione delle cellule. Al contrario, gli ioni potassio in esaurimento provocano una riduzione della secrezione di insulina e sviluppando sintomi diabetici.

4.3 INSULINO RESISTENZA

L'insulino-resistenza è un termine generico che descrive lo stato in cui un livello fisiologico di insulina produce una inferiore risposta biologica normale (Kahn, 1978).

Ciò può essere dovuto a difetti localizzati sia a livello pre-recettore, o ai livelli di recettore e post-recettore. In realtà la resistenza all'insulina può essere sommariamente definita come l'insulina risposta o insulina sensibilità. Il primo è valutato come la risposta dell'insulina al glucosio, quest'ultimo inteso come reattività all'insulina nel tessuto.

Sappiamo che un certo grado di insulino resistenza (IR) si manifesta nella vacca da latte verso fine gravidanza, quando il bilancio energetico incomincia ad essere negativo e il GH è basso (Rhoads et al., 2004) e causa un aumento della lipolisi mobilizzando le riserve materne.

Qualsiasi disturbo nella regolazione del metabolismo energetico da parte dell'insulina può essere associato allo sviluppo di disordini metabolici, tra cui steatosi epatica e chetosi.

Il meccanismo molecolare dell'insulino resistenza può essere localizzato a diversi livelli:

- prima dell'interazione dell'insulina con i recettori, per cui la causa è da riscontrarsi in una diminuita produzione di insulina o in una sua aumentata degradazione o in entrambi questi processi;
- a livello recettoriale, con un'alterata interazione dell'insulina con i suoi recettori, questo può essere dovuto a un diminuito numero di recettori o a una minor affinità di legame;
- a livello post-recettoriale per difetti associati a danneggiamento del segnale intracellulare.

Riassumendo: alterazioni a livello pre-recettoriale causano ipoinsulinemia, alterazioni a livello dei recettori causano una ridotta risposta insulinica e alterazioni a livello post-recettoriale riducono la sensibilità all'insulina (Kahn, 1978).

L'importanza che ha assunto l'insulino resistenza come fattore eziologico primario nella comparsa di disturbi metabolici ha reso necessario lo sviluppo di metodi per misurare la sensibilità all'insulina.

Vi sono diversi metodi per valutare la sensibilità all'insulina: è possibile misurarla tramite un'infusione di insulina e verificare la risposta sistemica all'infusione oppure, per via indiretta senza somministrazione di insulina, si misura la sua concentrazione serica.

Per la complessità di svolgimento ed anche per la relativa scarsa sicurezza dei metodi che misurano la sensibilità all'insulina attraverso una sua infusione, in campo buiatrico si è preferito usare test di tolleranza del glucosio (Glucose Tolerance Test, GTT) per indagini cliniche, nonostante nelle vacche da latte circa l'80% dell'assorbimento di glucosio avvenga indipendentemente dall'insulina (Rose et al., 1997), fatto che può ridurre l'efficienza dell'utilizzo di questi test.

Il GTT misura la velocità di clearance del glucosio dal flusso sanguigno, e quindi indirettamente anche l'azione dell'insulina; è un esame pratico e semplice per misurare l'insulino resistenza (cioè l'intolleranza al glucosio) e permette di valutare i parametri del glucosio quali le concentrazioni basali e di picco, la frequenza di scomparsa nel plasma, l'emivita, il tempo per raggiungere il livello basale e l'area sottostante la curva del glucosio (Chagas et al., 2009).

Nel corso del GTT, il rapporto molare insulina:glucosio nel plasma può essere il miglior indicatore di IR (Hayirli, 2006).

Gli animali resistenti all'insulina hanno una permanenza prolungata di glucosio nel sangue, e mostrano un picco più elevato e prolungato di insulina dopo una somministrazione di glucosio in endovena (Hove, 1978). E' stato dimostrato che nel terzo trimestre di gravidanza nella bovina la risposta insulinica al glucosio endovenoso è aumentata di 3-3.5 volte (Catalano et al., 1991), come tentativo iniziale di risposta a uno stato di insulino resistenza nel periodo del parto.

4.3.1 Fattori di rischio dell'Insulino Resistenza

D'ora in avanti, mi concentrerò sulla descrizione dei disturbi e dei fattori che sono rilevanti per le vacche da latte ad alta produzione.

Gestazione :

L'insulino-resistenza è una diminuzione della sensibilità dei tessuti periferici all'insulina sono comunemente osservato durante la tarda gestazione (Hay et al , 1988; Petterson et al, 1994). In questa fase fetale l'assorbimento del glucosio è circa il 50 % della produzione di glucosio nelle pecore (Prior e Christenson, 1978) e l'assorbimento insulino - mediata di glucosio da parte del muscolo scheletrico e tessuto adiposo con inibizione della lipolisi (Schlumbohm et al. , 1997). L'assorbimento di glucosio e il numero di GLUT 4 nel muscolo cardiaco e tessuto adiposo bianco sono più bassi in ratti gravidi rispetto ai ratti non gravidi (Nieuwenhuizen et al., 1998) . Il transfer di glucosio dalla placenta al feto dipende dalla differenza di concentrazione di questa molecola tra il plasma materno e quello fetale (Simmons et al. , 1979) ed è mediata da specifiche proteine di trasporto GLUT-1 e GLUT-3 .

Ridotta sensibilità all'insulina da parte dei tessuti periferici durante la gravidanza tardiva assicura un adeguato trasferimento di glucosio al feto come un processo insulino-indipendente. Questo meccanismo è influenzato da un aumento delle concentrazioni sieriche di ormoni quali l'estradiolo , progesterone e prolattina. Sembra che gli estrogeni migliorino l'azione dell'insulina durante la fase non- gravidanza e quella dell'allattamento. Il progesterone, invece, sopprime le azioni dell'insulina durante la gravidanza tardiva . Questo è stato suggerito da ricerche di Ryan e Enns sugli effetti di questi ormoni sull'azione dell'insulina nelle cellule isolate dal tessuto adiposo di ratti gravidi e non(1988).

Nutrizione - densità energetica della dieta :

Restrizione, malnutrizione e mangimi spinti riducono l'azione della regolazione del glucosio da parte dell'insulina.

Nei bovini da latte, la diminuzione dell'insulinemia prima del parto e nelle prime settimane dopo il parto può riflettere sulla regressione del pancreas a causa della depressione in S.S. . Alimentazioni inadeguate durante il periodo d'asciutta possono causare una varietà di problemi in vacche postparturienti, compresa la suscettibilità alle infezioni, sterilità, e gli effetti negativi sulla produzione di latte. Una raccomandazione comune è massimizzare l'assunzione di S.S. in vacche in asciutta durante il close-up , per preparare la vacca ad una maggiore assunzione di cibo subito dopo il parto e, di conseguenza , ridurre disturbi metabolici (Grümmer , 1995).

In uno studio del 2003 , Holtenius e colleghi hanno riferito che il tasso di scomparsa di glucosio nel plasma, e di conseguenza l'efficacia e la concentrazione di insulina, è stato correlato ad un regime alimentare nel periodo di transizione prima della fase di lattazione di 6, 9 e 14,5 kg di DM, fornendo 71 (dieta a basso consumo energetico, L), 106 (dieta energia Medium, M), o 177 MJ (dieta ad alta energia , H) di energia metabolizzabile (ME) al giorno. Le diete previste in media 75, 110, e 178 % del fabbisogno energetico per la manutenzione e la gravidanza secondo le raccomandazioni alimentazione svedesi (Spörndly, 1999).

Sono state introdotte queste diete quando le vacche da latte sono state asciugate fuori dalla lattazione precedente, almeno 8 settimane prima del parto previsto.

Dopo il parto tutte le vacche sono stati alimentati con un altro totale ad razione mista libitum. Hanno trovato una nettamente maggiore concentrazione di insulina plasmatica e una velocità di clearance minore di glucosio nel preparto H mucche, rispetto a M e L mucche. Hanno suggerito che questo potrebbe riflettere un saldo positivo preparto energetico (EB), ma anche una maggiore resistenza all'insulina. Inoltre , non vi erano differenze nei DMI all'inizio della lattazione , ma durante la settimana dal 6 al 12 postpartum DMI era più basso tra mucche H , che è stato legato a una prolungata bilancio energetico negativo in questo gruppo . Allo stesso tempo, la perdita di peso corporeo era maggiore e, soprattutto, si è verificato da 1 a 4 settimane di lattazione, mentre la produzione di latte non differiva tra i trattamenti (Agenäs et al. , 2003).

Tuttavia, l'entità e la durata della malnutrizione necessari per sviluppare disordini metabolici nelle vacche da latte sono in gran parte sconosciuti. Relativamente pochi studi hanno valutato gli effetti di alimentazione razionata durante il periodo secco sulla salute e il metabolismo dei bovini. Vacche sottoposte sia a restrizione alimentare del 30 % o riduzione del DMI che si avvicinano al parto sono noti per sviluppare disturbi epatici dopo il parto (Veenhuizen et al , 1991; Hayirli e Grummer , 2004). Al contrario, Holcomb et al. (2001) trovarono effetti negativi di alimentazione razionata, tranne percentuale di grassi del latte inferiore all'inizio della lattazione. Altri ritengono che la bassa densità energetica della dieta durante il periodo di transizione è associata con una migliore DMI e bilancio energetico (Douglas et al , 1998; . . Rabelo et al, 2003). D'altra parte, la sovralimentazione durante il periodo secco potrebbe portare alla depressione appetito e un aumentato del tasso di disturbi di salute e scarsa produzione di latte (Rukkwamsuk et al. , 1999) .

La maggior parte dei ricercatori hanno indicato che la concentrazione di energia superiore della dieta preparto potrebbe migliorare l'assunzione volontaria, aumento BW guadagno (VandeHaar et al , 1999; . . Dewhurst et al, 2000), e ridurre la mobilitazione di tessuto adiposo e le concentrazioni plasmatiche di NEFA (Ingvarsen e Andersen, 2000; Hayirli et al , 2002), che migliorerebbe la regolamentazione materna di risposte fisiologiche e migliorare le performance produttive durante il periodo di transizione (Contreras et al, 2004).

Recentemente (2012), Gao e colleghi hanno accertato che l'alimentazione con diete energetiche inferiori alle mucche durante l'ultime tre settimane preparto aveva diversi effetti significativi sia sulla vacca e il suo vitello. Le diete consistevano in un gruppo a bassa energia (energia netta di lattazione (NEL)=5.25 MJ/kg di DM) ; gruppo energetico medio (NEL)=5.88 MJ/kg di DM) e di gruppo ad alta energia (NEL = 6.48 MJ/kg del DM). Vacche alimentate con la dieta a basso consumo energetico ha avuto un grande aumento della concentrazione plasmatica NEFA 21-7 days. I loro risultati suggeriscono che la densità di energia materno durante gli ultimi 21 giorni preparto influenzano negativamente la crescita, lo sviluppo, l'immunità e la capacità antiossidante dei vitelli neonati e il bilancio energetico delle madri nel periodo post-parto .

Nutrizione - alimentazione con alti livelli di grasso (hyperinsulinemia):

Con un'alta percentuale di grassi nell' alimentazione la disponibilità di lipidi nel muscolo e nel fegato e l'ossidazione dei grassi sono elevati. Così , alimentazione grassa è accompagnata da un aumento NEFA plasma e concentrazioni di chetoni. La dieta chetogenica puo' causare anche iperinsulinemia acuta e ridotta sensibilità all'insulina. In generale, l'iperinsulinemia è inibita dalle azioni dell'insulina e dalla trasduzione del segnale a livello del recettore e postrecettoriale (Berna e Levy, 1993; Sebokova et al, 1995). Infatti, iperinsulinemia compromettere la capacità dell'insulina di sopprimere a livello epatico la produzione di glucosio (Oakes et al., 1997) e di comprometterne l'assorbimento da parte dei tessuti periferici.

Assorbimento del glucosio è limitata da alterazioni della fluidità delle membrane cellulari, dal ridotto numero di GLUT-4 e dalla diminuita attività della glucochinasi nel fegato e nei muscoli. Questi meccanismi sono stati confermati in ratti alimentati aumentando la razione dei grassi in vivo e in vitro (Watari et al., 1988; Ruth e Kor, 1992; Ruth, 1992) .

Le diete ricche di grassi sono stati associati ad una riduzione importante nel legame dell'insulina. L'insulina ha effetto anti-lipolitico e riduce il rilascio degli acidi grassi da parte del tessuto adiposo (Sparks e Sparks, 1995). L'aumento della concentrazione di NEFA in animali alimentati con diete lipidiche mostrano una insulino-resistenza indotta. Questo è stato dimostrato nell'uomo da Laville e colleghi (1995): l'insulina non era in grado di ridurre NEFA nel plasma e l'ossidazione dei lipidi, in seguito infusioni endovenose di glucosio marcato e palmitato rispetto ad un gruppo di controllo. Inoltre , gli effetti negativi del grasso supplementare (oltre il 4 %) sulla DMI di allattamento bovini da latte sono ben documentati.

Obesità e mobilitazione dei grassi (iperlipidemia) :

Una serie di studi rivelano che l'obesità è associata ad un aumento del rischio di disturbi metabolici. Iperinsulinemia (McCann et al , 1986.) e insulino-resistenza (Mahler , 1981; McCann e Reimers, 1985; Bergman et al, 1998) sono segni metabolici comuni di obesità in non ruminanti e ruminanti. A differenza di obesi non ruminanti, i ruminanti presentano scarso appetito (Garnsworthy e Topps 1982; Treacher et al. 1986; Hayirli et al., 2002b) . Pertanto, l'obesità nei non - ruminanti è associata con iperglic considerando che l'obesità nei ruminanti è associata ad ipoglicemia e ipoinsulinaemia. Ciò è stato collegato alle concentrazioni di ATP all'interno delle cellule del fegato con sazietà presenti come combustibili vengono ossidati e ATP è prodotta, e la fame che si verificano come diminuzioni di ossidazione e ATP è impoverito(Allen, 2000). Poiché gli acidi grassi sono facilmente ossidati nel fegato, la fornitura di NEFA da mobilitazione del corpo riserve di grasso probabile che sopprime l'assunzione di cibo nel periodo di transizione. Come conseguenza di obesità, il grado di grasso mobilitato dipende dalla quantità di grassi di riserva disponibili per la mobilitazione e cambiamenti nella concentrazione di insulina, la sensibilità dei tessuti all'insulina e lo stress. Vacche con eccessiva condizione fisica generale, mobilitano i grassi molto rapidamente attraverso transizione perché i loro tessuti sono più resistenti all'insulina e hanno maggiori riserve di grasso per mobilitare. Recenti ricerche indicano che vacche che consumano più energia di quella necessaria durante il periodo d'asciutta, presentano un aumento delle concentrazioni di NEFA all'inizio della lattazione (Holtenius et al. , 2003). Gli ormoni rilasciati durante lo stress aumentano la mobilitazione dei grassi , elevando ulteriormente la concentrazione plasmatica NEFA.

È stato, inoltre, dimostrato l'effetto negativo di un'elevata concentrazione di NEFA sulla sensibilità all'insulina del tessuto adiposo (VanEpps - Fung e colleghi , 1997; Bergman e Mittelman , 1998). In sintesi, concentrazione elevata NEFA provoca inibizione di insulino-stimolatori sull'assorbimento di glucosio da parte dei tessuti periferici diminuendo il numero e la traslocazione di GLUT-4, e disturba vie di segnalazione intracellulare di insulina nei tessuti epatici e periferici con un rischio di aumento della downregulation recettoriale (Garvey et al. , 1986) .

Genetica:

Fino a poco tempo fa, la politica di allevamento delle vacche da latte generalmente ha portato a un animale che produce più latte ed ha una maggiore propensione a mobilitare il grasso corporeo all'inizio della lattazione (Buckley et al., 2000; Roche et al, 2006; McCarthy et al, 2007). Questa sfida è stata anche associata con una riduzione delle performance riproduttive (Beam e Butler , 1999; Buckley et al , 2003; . Roche et al, 2007 .). Bassi livelli di insulina sono associati genotipicamente (Gutierrez et al., 2006) e fenotipicamente (Ingvarstsen e Friggens, 2005) con un'elevata produzione di latte. Sebbene l'insulina ha effetti diretti sulla galattopoiesi, una bassa concentrazione di insulina diminuisce l'assorbimento di glucosio da parte dei tessuti insulino-sensibili, quali i muscoli scheletrici , e migliora la disponibilità di glucosio per la ghiandola mammaria , che è insulina - insensitive (Zhao et al , 1996; . Nishimoto et al, 2006 ; . van Knegsel et al, 2007) . Pertanto , l'insulina è una molecola candidata con molto interessante riguardante il paradosso tra rendimento, malattie metaboliche e la capacità riproduttiva .

McCarthy et al. (2009) hanno confrontato l'espressione epatica di geni dell'ormone della crescita(GH), IGF (o somatotropo) dell'asse Ipotalamo-Ipofisi in animali a inizio e metà lattazione. Hanno trovato che gli adattamenti precoce allattamento al bilancio energetico negativo possono avere effetti più gravi in un ceppo genetico rispetto ad un altro perché il si è avuta una maggiore espressione di IGF-1. Nel periodo post-parto, l'asse somatotropo nel fegato diventa disaccoppiato , per cui elevate concentrazioni plasmatiche di GH riescono a stimolare un aumento epatica della sintesi di IGF-1 (Thissen et al, 1994; Fenwick et al, 2008; Lucy, 2008). IGF-1 gioca un ruolo fondamentale nello stimolare l'attività anabolica e mitogenica di GH in vari tessuti (Laron , 2001). Numerosi rapporti hanno suggerito che le vacche nutrizionalmente compromesse hanno ridotte concentrazioni sistemiche di insulina e IGF-1 (Patton et al, 2006; . Lucy , 2008). È stato riportato che la perdita irreversibile glucosio porta ad un certo grado di disaccoppiamento dell'asse somatotropo come concentrazioni plasmatiche di IGF-1 si riducano in concomitanza ad una riduzione epatica di mRNA e del recettore GH (GHR; Meier et al, 2008). Studi precedenti hanno dimostrato che le concentrazioni sistemiche di ormone metabolico IGF-1 all'inizio della lattazione sono

positivamente associate con l'intervallo successivo gestazione, parto e, infine, l'esito della gravidanza (Taylor et al, 2004; Patton et al, 2007; Wathes et al,2007).

4.3.2. Stato infiammatorio e immunodepressione

Il periodo del puerperio nelle bovine da latte è spesso caratterizzato da stati infiammatori (Cappa et al., 1989). Questa condizione è probabilmente il risultato del rilascio di citochine pro infiammatorie (Grimble, 1990), prime fra tutte l'interleuchina 6 (IL-6) e il tumor necrosis factor α (TNF- α); recentemente sono state messe in evidenza da Drackley et al. (2005) numerose cause di rilascio di tali citochine nel periodo del periparto, quali malattie infettive o metaboliche, parassitosi, traumi, endotossine e fattori stressanti.

Il potenziale effetto delle citochine pro infiammatorie nella bovine durante il periodo di transizione può variare in base alla durata del loro rilascio; comunque le conseguenze principali coinvolgono l'attività riproduttiva, la sintesi a livello epatico e l'anoressia.

Nel fegato stimolano la produzione delle proteine positive della fase acuta, come l'aptoglobina, e inibiscono la sintesi delle proteine negative della fase acuta, come l'albumina (Fleck, 1989). Inoltre inducono stress immunitario e peggiorano lo stato anoressico intorno al periodo del parto; interferiscono anche con il rilascio di LH, che può dare disturbi dell'attività riproduttiva (Braden et al., 1998).

Tutti questi effetti possono contribuire a una diminuzione della produzione latte (Bionaz et al., 2007) e della fertilità (Calamari et al., 1997; Bertoni et al., 2000); in particolare i maggiori problemi di fertilità sono stati riscontrati nelle bovine che presentavano malattie del periparto e patologie infettive come la mastite (Schrack et al., 2001).

Le citochine possono esacerbare il bilancio energetico negativo (Pryce et al., 2001) e aumentare il rischio di steatosi epatica (Kato, 2002) e in particolare il TNF- α ha dimostrato essere un fattore importante per il determinarsi dell'insulino resistenza in quanto causa una transiente inibizione del meccanismo di rilascio glucosio-dipendente dell'insulina (Kushibiki et al., 2000). Ametaj et al. (2002) hanno dimostrato infatti che l'accumulo epatico di lipidi (dovuto all'incremento della lipolisi per diminuita azione dell'insulina) può essere preceduto da un aumento della concentrazione di TNF- α .

I disturbi metabolici possono avere un effetto negativo sull'immunità dell'organismo, soprattutto nel periodo di transizione dove vi sono anche cambiamenti endocrini in atto.

La steatosi epatica può interferire con la risposta immunitaria direttamente, alterando la capacità del fegato di sintetizzare e degradare i componenti del sistema immunitario (Kato,

2002), oppure indirettamente intervenendo nei cambiamenti metabolici e ormonali che influiscono sulle funzioni immunitarie (Breukink and Wensing, 1997).

Se si sviluppa una condizione di chetosi, che come già accennato spesso segue ad uno stato di steatosi epatica, anche l'azione linfocitaria è depressa (Sato et al., 1995).

4.4 DISTURBI METABOLICI EPATICI NEL POST PARTUM

Il fegato rappresenta la ghiandola più voluminosa del corpo e svolge un numero impressionantemente ampio di funzioni: la sintesi dei sali biliari e la loro escrezione a livello del lume duodenale (che nei ruminanti è continua); la dismissione di glucosio accumulato sotto forma di glicogeno con la neoglicogenesi e decostruito con la glicogenolisi; la proteolisi delle molecole proteiche del sangue usurate; il catabolismo degli aminoacidi; l'eliminazione della maggior parte dell'ammoniaca; la sintesi di molte proteine del sangue (albumina, prealbumina, transtiretina) e delle glicoproteine (proteine della fase acuta, fattori della coagulazione-fibriniformazione e della fibrinolisi, apolipoproteine, metalloproteine, enzimi di esportazione); la sintesi di alcuni enzimi – aminoacido-ossidasi, L-idrossi-acido-ossidasi, monoamino-ossidasi, fosfatasi alcalina e acida, acetilglucosidasi, γ -glutamyl transferasi, glucuronidasi, lecitina-colesterolo-acil-transferasi, lipasi lipoproteica epatica, pseudocolinesterasi ; la sintesi di colesterolo; la β -ossidazione degli acidi grassi; l'azione protettiva nei riguardi di alcune sostanze tossiche (a mezzo della glutazione perossidasi); la formazione di composti chetonici con la chetogenesi; una parte della detossicazione dell'ammoniaca; il metabolismo dei farmaci e altri xenobiotici (Arias et al., 1988).

In ogni sezione di fegato esaminata al microscopio, sono presenti estese aree di tessuto connettivo interlobulare, le quali accolgono: un vaso linfatico, rami dell'arteria epatica, ramificazioni della vena porta ed un condotto biliare. Questo insieme di strutture forma i canali (o spazi) portal. Le lamine epatiche sono formate da file di epatociti, che presentano 6 o più facce differenziate in 3 gruppi: facce provviste di microvilli rivolti verso lo spazio perisinusoidale, facce canicolari che delimitano i capillari biliari, facce tra epatociti, in cui le membrane possono presentare giunzioni comunicanti e desmosomi (Dellmann et al., 1998).

Gli epatociti non sono cellule specializzate, in quanto sono provvisti di uno stesso corredo genomico; perciò sono in grado di svolgere tutti i compiti della funzione epatica di loro pertinenza, attivandosi in rapporto alla materia messa a disposizione dal sangue che li lambisce (Arias et al., 1988).

Il lobulo epatico si organizza intorno alla vena centrale ed è composto da un prisma poliedrico di tessuto epatico, di forma grossomodo esagonale, con i vari sinusoidi che dalla periferia convergono verso la vena centrale nella quale sboccano (Dellmann et al., 1998).

I macrofagi (cellule di Kupffer) e le cellule di Ito concorrono alla funzione di eliminazione di alcune sostanze tossiche, di alcune glicoproteine denaturate e dei detriti cellulari che si accumulano nel sangue, e, con il metabolismo del collagene, di un certo numero di lipidi e della vitamina A. Alcuni prodotti del metabolismo delle cellule di Kupffer sono captati dagli epatociti per essere dismessi dal fegato con la bile.

Le cellule di Kupffer sono macrofagi stanziali e costituiscono l'80% dei macrofagi non circolanti dell'organismo. Sono presenti nel lume dei sinusoidi e la loro funzione primaria è di ingerire e degradare materiale particolato. Sono una fonte di citochine e possono agire come cellule presentanti antigeni. Le cellule di Ito sono note anche come cellule del grasso e cellule stellate e sono localizzate nello spazio di Disse, tra le cellule endoteliali e gli epatociti. Sintetizzano il collagene e sono il sito di maggior immagazzinamento di vitamina A dell'intero organismo (Robson et al., 1968).

Per quanto riguarda la funzione del fegato nell'ambito del metabolismo dei lipidi, essa può essere suddivisa in tre attività principali: la neolipogenesi, operazione attinente alla sintesi di lipidi; la sintesi del colesterolo; la sintesi di apolipoproteine, proteine che hanno il compito di solubilizzare e di trasportare grassi nel sangue (lipoproteine). Spetta al fegato rimuovere dalla circolazione i remnant chilomicrons, complessi molecolari, che trasportano colesterolo dall'intestino (Schiff, 1999).

Le cellule epatiche posseggono meccanismi specializzati nel trasporto trans-membrana in input e in output di tutti i tipi di lipoproteine. I processi di produzione dei chetoni sono limitati alla zona degli epatociti più vicini alla venula centrale di scarico, come si può dedurre dall'identificazione in questa regione di un'alta presenza di β -idrossibutirilideidrogenasi che deve essere considerato come il più significativo indicatore di questo processo. Fonti di produzione di chetoni sono gli acidi grassi e alcuni aminoacidi (Fauci et al., 1998).

Il glucosio svolge un ruolo cruciale nel metabolismo della bovina, sia per i fabbisogni di mantenimento che per il sostentamento delle funzioni produttive, come l'accrescimento e la lattazione. In particolare riveste importanza nella vacca da latte a causa dell'ingente

quantitativo richiesto dalla mammella per la produzione del latte; il glucosio infatti è il precursore per la sintesi del lattosio, che controlla il volume di latte fungendo da agente osmotico (Zhao and Keating, 2007).

In uno studio condotto da Annison et al. (1974) è emerso che il lattosio incide per il 69,4% sul glucosio assorbito dalla mammella. A partire da questo dato e assumendo che il contenuto di lattosio nel latte sia del 48% si può calcolare la richiesta di glucosio giornaliera per una bovina che produce al giorno 60 kg di latte, che risulterà essere di oltre 4 kg al giorno. Nelle vacche in lattazione la richiesta di glucosio varia a seconda della quantità di latte prodotto; secondo i dati forniti da Annison et al. (1974) all'aumentare della produzione di latte la mammella accresce la quantità di glucosio assorbito sul totale disponibile: nello studio effettuato si passò da un 20% del totale per una produzione giornaliera di 6 kg di latte ad un 90% per una produzione di 25 kg di latte.

Il glucosio ha quindi un ruolo fondamentale nella lattazione, ma anche nel mantenimento degli altri tessuti che lo utilizzano mediante ossidazione o per la produzione di trigliceridi nel tessuto adiposo.

Nei ruminanti la quantità di glucosio assorbita come tale nell'apparato gastroenterico è molto scarsa (Baird et al., 1983), poiché le fermentazioni batteriche ruminali determinano la demolizione immediata del glucosio che proviene dall'alimento; in questo modo quasi tutti i carboidrati non raggiungono l'intestino per la digestione ghiandola e l'assorbimento sotto forma di glucosio. Ne deriva che tutto il glucosio disponibile, in queste specie, sia il risultato del processo di gluconeogenesi: i fabbisogni di glucosio nel bovino sono soddisfatti dalla sua sintesi operata principalmente a livello epatico a partire dagli acidi grassi volatili prodotti dalle fermentazioni ruminali (primo fra tutti il propionato), dagli amminoacidi gluconeogenici, dal lattato, dal glicerolo e da altri acidi grassi (Leng, 1970).

Su una base quantitativa è il propionato il precursore principale per la sintesi del glucosio, arrivando a fornire fino al 76% del glucosio sintetizzato dal fegato (Reynolds et al., 1994). Quasi tutto il propionato assorbito dal ruminante giunge per via portale al fegato, senza mai entrare nel circolo sistemico; ciò fa sì che tutto il propionato venga utilizzato per la gluconeogenesi, entrando nel ciclo di Krebs come succinato e portando alla formazione di ossalacetato, il primo metabolita del processo gluconeogenico.

La quantità di propionato dipende dalla quantità di alimento ingerito, per cui in caso di bilancio energetico negativo la sintesi di glucosio avviene in maggior misura a carico di lattato, glicerolo, amminoacidi e acidi grassi provenienti dai tessuti.

La seconda fonte di glucosio, in ordine di importanza, è rappresentata dagli amminoacidi: quasi tutti possono concorrere alla sintesi di glucosio, ma è l'alanina a fornire il maggior contributo e ad essere assorbita in quantità maggiori a livello portale.

Per quanto riguarda il lattato, che riveste un ruolo di minor importanza, la captazione a livello epatico dipende dalla disponibilità degli altri precursori (Reynolds, 1995): all'aumentare della concentrazione portale di propionato e alanina aumenta la loro captazione e diminuisce quella del lattato. Ciò permette un maggior approvvigionamento di lattato ai tessuti periferici, dove può essere usato come fonte di energia o per la sintesi di riserve adipose (Benson et al., 2002).

Esaminando più approfonditamente il metabolismo dei lipidi a livello epatico, si evince come tramite il torrente circolatorio gli acidi grassi raggiungano il fegato, dove possono seguire due vie: subire un processo di ossidazione all'interno dei mitocondri, che porta alla produzione di energia, oppure essere trasformati in trigliceridi per essere depositati o ridistribuiti. I NEFA in eccesso a livello epatico che non rientrano nel processo dell'ossidazione vengono riesterificati a trigliceridi (Van den Top, et al 1995). Questi vengono coniugati con la apolipoproteine per formare le Very Low Density Lipoprotein (VLDL), che sono poi immesse nel torrente circolatorio. Avendo i ruminanti una ridotta capacità di sintesi delle apolipoproteine epatiche, la produzione di VLDL risulta insufficiente per coniugare la grande quantità di acidi grassi messa in circolo dal processo di lipomobilizzazione. In questo modo gli acidi grassi vengono depositati nel fegato.

Il lipidi contenuti nel plasma sono principalmente l'acetato e il butirato, due acidi grassi volatili, i quali hanno origine dalla fermentazione ruminale e in particolare dalle fibre non digeribili. Vengono mobilizzati come acidi grassi non esterificati (Van Kneysel et al., 2007).

La composizione dei lipidi dopo il parto cambia completamente sia in qualità che in quantità, questo è dovuto principalmente a una notevole mobilizzazione dei grassi dal tessuto adiposo. Una frazione di lipidi viene usata direttamente dalla mammella per la sintesi dei

grassi oppure come fonte energetica per i tessuti periferici, ma una quota rilevante, proporzionale al flusso sanguigno epatico, arriva al fegato (Reynolds et al., 2003).

A livello epatico sia i NEFA che gli acidi grassi volatili possono seguire due vie:

- Penetrano nei mitocondri e completano il processo biochimico dell'ossidazione
- Subiscono una riesterificazione e rientrano nel torrente circolatorio sotto forma di lipoproteine.

Il trasporto dei NEFA all'interno dei mitocondri avviene mediante un sistema di trasporto regolato da fonti energetiche attraverso la carnitina palmitil transferasi, la quale è attivata dal glucagone e inibita dall'insulina, dal propionato e dal malonil CoA (Jesse et al., 1986; Drackley et al., 1991).

Quest'ultimo è un composto intermedio del metabolismo del propionato e dei grassi e viene anche considerato un "termometro" dell'energia (Grummer, 1995).

Il trasporto dei NEFA all'interno dei mitocondri è limitato solamente durante la fase di bilancio energetico positivo.

All'interno dei mitocondri, gli acidi grassi seguono la via dell'ossidazione: in questo processo, durante la fase di NEB, l'ossalacetato diventa un fattore limitante nel ciclo di Krebs, perché viene quasi totalmente utilizzato nella gluconeogenesi e di conseguenza nella formazione di corpi chetonici che sono la principale fonte energetica (Grummer, 1995; Van Knegsel et al., 2005).

Invece, i NEFA in eccesso a livello epatico che non rientrano nel processo ossidazione, vengono riesterificati a trigliceridi (Van den Top et al., 1995).

I trigliceridi vengono trasportati nel torrente circolatorio sotto forma di lipoproteine, precisamente, come Very Low Density Lipoprotein (VLDL) (Puppione, 1978; Bouchart et al., 1989).

4.4.1 Disordini metabolici legati ai lipidi

Il processo della lipomobilizzazione, regolato principalmente dall'insulina, causa una diminuzione delle riserve corporee della bovina, ed è pertanto misurabile tramite il controllo del Body Condition Score (BCS). La perdita di BCS tra il parto e il picco di lattazione normalmente va da 0,5 a 1 punto, su una scala di 5 punti (Edmondson et al, 1989). La perdita di 1 punto di BCS si riferisce a una diminuzione del 7-8% del peso corporeo (circa 60 Kg) e fornisce approssimativamente 417 MCal di energia netta (Oikawa and Ozel, 2006).

La lipolisi causa un aumento del livello di acidi grassi liberi nel sangue che inizia ad aumentare prima del parto e raggiunge il suo picco subito dopo il parto proprio mentre i valori di glucosio e di insulina raggiungono i valori minimi (Grummer, 2008). I NEFA (acidi grassi non esterificati) possono anche raggiungere una concentrazione di 1000 $\mu\text{mol/l}$ per diverse settimane (Holtenius et al, 2003).

Tramite il torrente circolatorio gli acidi grassi raggiungono il fegato, dove possono seguire due vie: subire un processo di ossidazione all'interno dei mitocondri, che porta alla produzione di energia, oppure essere trasformati in trigliceridi per essere depositati o ridistribuiti. I NEFA in eccesso a livello epatico che non rientrano nel processo dell'ossidazione vengono riesterificati a trigliceridi (Van den Top, et al 1995). Questi vengono coniugati con la apolipoproteine per formare le Very Low Density Lipoprotein (VLDL), che sono poi immesse nel torrente circolatorio. Avendo i ruminanti una ridotta capacità di sintesi della apolipoproteine epatiche, la produzione di VLDL risulta insufficiente per coniugare la grande quantità di acidi grassi messa in circolo dal processo di lipomobilizzazione. In questo modo gli acidi grassi vengono depositati nel fegato.

La steatosi epatica si sviluppa quando la captazione epatica dei lipidi supera la capacità di ossidazione e secrezione degli stessi da parte del fegato. I lipidi in eccesso vengono così immagazzinati nel fegato come triacilglicerolo (TAG) e sono associati a una ridotta funzionalità epatica (Drackley, 1999). Nella bovina la steatosi epatica si riscontra principalmente nelle prime 4 settimane post-parto (Grummer, 1993), in corrispondenza del bilancio energetico negativo. L'accumulo di lipidi, che generalmente si misura come percentuale di peso dovuto ai TAG sul peso totale del fegato, è più marcato nelle vacche obese (BCS>4) (McNamara, 2000): in questi animali l'ingestione è maggiormente depressa in

prossimità del parto, questo aggrava ancora di più il bilancio energetico negativo e porta quindi a una più severa lipomobilizzazione (Stockdale, 2001).

L'aumento dei NEFA nel plasma è stato associato allo sviluppo di IR nelle bovine da latte in studi condotti mediante digiuno a breve termine (Oikawa and Oetzel, 2006) o infusione endovenosa di lipidi (Pires et al., 2007). In entrambi i casi, livelli di NEFA più elevati causarono IR e un trattamento per ridurre i NEFA ripristinò rapidamente la sensibilità all'insulina.

La diretta conseguenza dell'incapacità da parte del fegato di ossidare o ridistribuire gli acidi grassi è lo sviluppo di una condizione di chetosi. Elevati livelli di NEFA aumentano la lipogenesi e la chetogenesi negli epatociti (Cadorniga-Valiño et al., 1997).

In assenza di ossalacetato il ciclo di Krebs non può essere portato a termine e l'acetil coA, derivato dal metabolismo degli acidi grassi, viene convertito a livello epatico in acetato e betaidrossibutirrato, (corpi chetonici); l'ossalacetato, oltre ad essere un intermedio del ciclo di Krebs, è un metabolita dell'acido propionico, il quale si forma nel ruminante a partire dai carboidrati fermentescibili presenti nella dieta. Pertanto per limitare il processo di lipomobilizzazione e di chetogenesi risulta di primaria importanza assicurare alla bovina sia una sufficiente ingestione di sostanza secca, che una dieta qualitativamente adeguata a soddisfare la richiesta di precursori gluconeogenici.

La chetosi è quindi un disordine nel metabolismo di carboidrati e lipidi caratterizzato da un aumento nella concentrazione di corpi chetonici (i principali sono il beta-idrossibutirrato, l'acetoacetato e l'acetone) nel sangue (chetonemia), nelle urine (chetonuria), nel latte e negli altri fluidi corporei.

Nel sangue la concentrazione normale di BHBA è <1 mmol/l (Filar, 1979). Da recenti studi il valore soglia per classificare animali in condizione di chetosi sub-clinica è stato identificato ad 1,4 mmol/l (Duffield, 1997; Geishauser et al., 2001); animali con concentrazioni di BHBA $>2,6$ mmol/l sono considerati in condizione di chetosi clinica (Duffield, 2000).

Da un punto di vista biochimico le bovine in chetosi presentano ipoinsulinemia, iperchetonemia, ipoglicemia, chetonuria e una diminuzione dei valori epatici di glicogeno.

La chetosi causa perdite economiche dovute alla diminuzione della produzione di latte e dell'efficienza riproduttiva e all'aumento dei costi di trattamento, soprattutto se si manifesta

in maniera subclinica e quindi più difficilmente diagnosticabile. Inoltre le bovine con concentrazioni di BHBA al di sopra di 1,0 o 1,4 mmol/l sono 3,2 e 4,3 volte più a rischio di malattie del periparto (Van Saun, 2004 a, b).

4.4.2. Lipidosi epatica

La lipidosi epatica rappresenta una delle principali malattie metaboliche delle bovine nella prima fase di lattazione ed è associata ad un peggioramento dello stato di salute e delle performance riproduttive.

L'infiltrazione lipidica del fegato è parte di una sindrome di mobilizzazione lipidica generale, che avviene nella prima fase di lattazione, specialmente nelle bovine ad alto valore produttivo, in quanto l'energia utilizzata per produzione di latte non è compensata dalla dieta e vengono utilizzate le riserve corporee per sanare il deficit energetico (Bobe et al., 2004).

È una patologia che avviene quando l'accumulo di trigliceridi a livello epatico supera la capacità epatica di degradarli metabolicamente o di secernerli come lipoproteine. I meccanismi potenzialmente causa di accumulo di trigliceridi nel fegato includono:

- L'accumulo di acidi grassi nel fegato avviene come conseguenza di una dieta ricca di grassi o per l'aumentata mobilizzazione di trigliceridi dal tessuto adiposo a causa di una maggior richiesta in condizioni particolari (es. lattazione, anomalie endocrine);
- Disfunzioni epatocitarie, che portano ad accumulo lipidico intra-citoplasmatico per minor energia utilizzabile dall'epatocita per l'ossidazione degli acidi grassi;
- Un'eccessiva assunzione di carboidrati con la dieta, che esita in una maggior produzione di acidi grassi, quindi di accumulo di trigliceridi negli epatociti;
- Una maggior esterificazione degli acidi grassi a trigliceridi per aumentare la concentrazione di glucosio ed insulina, che stimolano la sintesi di trigliceridi a partire dal glucosio e dai chilomicroni provenienti dalla dieta;
- Una diminuita sintesi di apolipoproteine e una conseguente diminuzione della produzione ed escrezione delle lipoproteine dagli epatociti;
- Un'alterata secrezione di lipoproteine dal fegato per difetti secretori causati da epatotossine o farmaci (McGavin et al., 2007).

Le patologie che avvengono più comunemente nel immediato postparto e che predispongono la bovina all'infiltrazione lipidica includono la chetosi, la dislocazione abomasale sinistra, la mastite, la ritenzione degli invogli fetali, la milk fever e la sindrome della vacca a terra. Come risultato del deficit energetico, la bovina mobilita le riserve corporee per la produzione di latte e perde una grande quota di peso corporeo. Diversamente dalle altre specie (soprattutto rispetto alla lipidosi felina), le bovine affette da steatosi epatica non presentano alcun segno di insufficienza epatica: possono manifestare abbattimento e riduzione dell'appetito ma, il più delle volte, solo l'esistenza concomitante delle patologie sopra elencate mette in luce i disturbi metabolici che interessano l'animale.

In circa il 30% delle vacche ad alta produzione, l'infiltrazione lipidica è grave ed è associata ad effetti gravi ma reversibili nelle strutture e nelle funzioni epatiche (Bobe et al., 2004).

Con il progressivo accumulo di lipidi, il fegato aumenta di volume e vira la sua colorazione verso il giallastro. Nei casi di lipidosi più lieve, i lipidi possono accumularsi solo in determinate regioni del lobulo, nello specifico, la regione centrolobulare. Nei casi estremamente gravi, l'intero fegato è coinvolto e aumenta considerevolmente di volume, con larga parte degli epatociti occupata da vacuoli lipidici.

La maggior parte delle bovine si adeguano al NEB (bilancio energetico negativo) attraverso complicati meccanismi di adattamento metabolico. Se questi meccanismi falliscono, si sviluppa lipidosi epatica. In condizioni fisiologiche, l'ammontare dei lipidi a livello epatico aumenta a cominciare da alcune settimane prima del parto, arriva ad un picco del 20% del volume epatocitario 1 settimana dopo il parto e torna a livelli sotto al 5% 26 settimane dopo il parto.

La mobilitazione lipidica inizia 2-3 settimane prima del parto e, dopo che questo è avvenuto, si assiste ad un grande aumento di accumulo di lipidi. La bassa capacità glucogenetica porta successivamente a bassa glicemia, bassi livelli di insulina e ad alte quote di mobilitazione di acidi grassi, che causano una grave lipidosi epatica (Holtenius et al., 1990).

In bovine con lipidosi epatica subclinica, la bassa concentrazione di glucosio e l'alto contenuto di NEFA nel plasma sono strettamente correlati alla presenza di trigliceridi nel fegato e vacche con livelli aumentati di trigliceridi epatici sono meno capaci di mantenere i

marginì nella concentrazione di glucosio e NEFA nel plasma (Jorritsma et al.,2004). L'infiltrazione lipidica si sviluppa quando la captazione dei lipidi supera l'ossidazione e la secrezione di questi da parte del fegato. I lipidi in eccesso vengono stoccati come triacilglicerolo a livello epatico e vanno a diminuire la funzionalità dell'organo. I NEFA invece, vengono incorporati nel fegato e secreti come VLDL (very low density lipoproteins) o, in alternativa, vengono ossidati dai mitocondri e dai perossisomi. Nelle bovine, la sede principale di sintesi degli acidi grassi è il tessuto adiposo, non il fegato, per questo la loro capacità di secernere trigliceridi come lipoproteine è molto bassa se paragonata agli altri animali (Katon et al., 2002). Quando l'ammontare dei NEFA incorporati ed ossidati supera la quantità di quelli secreti come trigliceridi, si ha un accumulo di trigliceridi nel fegato e si sviluppa lipidosi epatica.

4.4.3 Accumulo di glicogeno

Il glucosio viene normalmente stoccato all'interno del fegato come glicogeno ed è spesso presente in grandi quantità dopo i pasti. Un accumulo eccessivo di glicogeno avviene quando il metabolismo che regola il glucosio viene alterato, ad esempio, dal diabete mellito. In queste condizioni, il coinvolgimento epatico è solo una delle manifestazioni di una patologia sistemica. La degenerazione epatocellulare indotta dai glucocorticoidi, è un disordine specifico caratterizzato dall'accumulo eccessivo di glicogeno livello epatico che esita in un ampio rigonfiamento degli epatociti (fino a 10 volte il volume fisiologico), soprattutto in quelli nell'area midzonale. Nei casi gravi di degenerazione epatocitaria indotta dai glucocorticoidi, il fegato aumenta di volume in maniera irreversibile e diviene pallido (McGavin et al., 2007).

4.4.4. Amiloidosi

L'amiloidosi non è una singola patologia che affligge il fegato, ma è un termine usato per vari disturbi che portano al deposito di proteine fibrillari a livello epatico. I fegati affetti da tale patologia aumentano di volume, diventano friabili e pallidi, presentano consistenza pastosa o soda, cedevole e si lacerano con facilità. Istologicamente, si apprezzano depositi amorfi e brillanti di eosinofili a livello di spazio di Disse, lungo i sinusoidi a contatto con le fibre reticolari. Ne consegue un'atrofia da compressione ed un'iponutrizione delle lamine epatiche. Più di 15 proteine amiloidi sono state identificate, ma se ne riscontrano soprattutto tre tipi: la fibrilla amiloide AL (amyloid light chain), catene di amiloidi composite (AA) e la siero amiloide associata (SAA), una proteina di fase acuta prodotta dal fegato.

I depositi di amiloidi possono causare diversi gradi di epatomegalia e, nei casi più gravi, gli animali possono mostrare segni di disfunzione o di insufficienza epatica causati dalla maggior fragilità del fegato. Spesso si assiste ad un deposito di amiloidi anche a livello renale, soprattutto nei glomeruli: l'insufficienza renale avviene frequentemente prima che ci siano segni di disfunzione epatica da amiloidosi (McGavin et al., 2007).

4.4.5 Fibrosi epatica

In seguito alla distruzione del parenchima epatico, si può assistere a rigenerazione parenchimale o alla sua sostituzione con fibrosi e iperplasia biliare.

La fibrosi è una delle più comuni manifestazioni di danno epatico cronico. Si tratta di un eccessivo deposito di tessuto connettivo fibrillare, dovuto ad un'alterazione dell'equilibrio tra sintesi e demolizione, in risposta a cause biologiche, tossiche, metaboliche o immunitarie. Inizia con l'interazione, tramite mediatori chimici, tra cellule parenchimali alterate in senso regressivo e cellule mesenchimali attivate in senso fibrogeno, che porta ad uno squilibrio nei componenti della matrice extracellulare (ECM = Extracellular matrix) composta da: vari tipi di collagene (I, III e IV), glicoproteine strutturali (fibronectina, laminina e integrine) e da proteoglicani (eparansolfato). La sintesi dell'ECM epatica è realizzata da:

- Cellule di Ito, che normalmente producono collagene di tipo IV (principale costituente della membrana basale), e, se stimulate da PDGF (*Platelet derived growth factor*) e TGF- β (*Transforming growth factor- β*), sintetizzano collagene fibrillare (tipo I e III);

-Fibroblasti; -Miofibroblasti; -Cellule endoteliali; -Cellule epiteliali dei dotti biliari.

Essa è regolata dagli epatociti, dalle cellule di Kupffer, dalle cellule endoteliali e dalle piastrine, che producono citochine che, a loro volta, controllano l'attivazione e la funzione delle cellule di Ito.

Nella fibrosi, i componenti dell'ECM sono gli stessi ma vengono depositati in quantità e rapporti alterati, questo porta ad un aumento del collagene fibrillare e delle cellule a funzione sintetica. Quindi l'aumentata sintesi di ECM è dovuta all'*up-regulation* degli RNAm codificanti per il Collagene tipo I, il Collagene tipo III ed altre proteine e alla *down-regulation* delle Metallo-proteasi (MMPs), enzimi capaci di digerire i componenti dell' ECM, e dei loro inibitori (TIMP = *Tissue inhibitors of metalloproteinase*).

Questo porta ad un aumento del collagene tipo I e III (ma anche IV, fibronectina e laminina).

Nel fegato normale i collageni I e III sono presenti in proporzioni quasi uguali (40-45%), mentre nella fibrosi il tipo III viene sostituito dal tipo I che finisce per prevalere (perché vengono inibiti gli enzimi responsabili della sua demolizione). La fibrosi epatica può regredire se l'agente fibrogeno viene eliminato entro un determinato tempo, dopo di che diventa irreversibile e si trasforma in cirrosi (McGavin et al., 2007).

4.5. STATO INFIAMMATORIO DEL FEGATO

La lipidosi epatica può portare ad infiammazione epatica a causa di cicatrizzazione e fibrosi del fegato stesso. Infatti, si riscontrano fenomeni quali il rigonfiamento torbido degli epatociti, attivazione delle cellule del Kupffer, infiltrazioni neutro-granulocitarie e linfocitarie, calcificazioni distrofiche, degenerazione fibrinoide di piccole e medie arterie, tutti visibili all'istologia.

La risposta di fase acuta è una risposta immunitaria generalizzata e non specifica che l'ospite attiva per rispondere a diversi stimoli, come le infezioni, i danni tissutali e i traumi. Lo scopo della risposta di fase acuta è isolare e neutralizzare i patogeni, oltre che prevenirne l'ingresso di altri, per minimizzare il danno tissutale e promuovere i processi riparativi per ristabilire le normali funzioni fisiologiche (Kushner, 1982).

La risposta dell'ospite ai patogeni e o alle lesioni comincia attraverso l'attivazione dei macrofagi tissutali nel sito di origine dello stimolo infiammatorio. I macrofagi attivati rilasciano una varietà di citochine, le più importanti delle quali sono il tumor necrosis factor- α (TNF α), l'inteleuchina-1 (IL1), e l'inteleuchina-6 (IL6). Tra le altre funzioni, queste promuovono la produzione di molte proteine a livello epatico come la siero amiloide A (SAA) e l'aptoglobina (Edbrooke et al., 1993; Kushner, 1988).

Appena dopo il parto, la siero amiloide A aumenta nel plasma delle bovine così come dopo la somministrazione per via endovenosa di endotossine (Alsemgeest et al., 1993; Werling et al., 1996). La SAA nel plasma è associata alle high density lipoproteins (HDL) durante la risposta di fase acuta (Hoffman and Benditt, 1982). L'aptoglobina è un'altra proteina di fase acuta prodotta dal fegato e aumenta nelle bovine con mastite, metrite e altre condizioni infiammatorie (Hirvonen et al., 1996, 1999). La sua funzione principale è legarsi l'emoglobina rilasciata dagli eritrociti durante l'emolisi.

Il TNF- α può contribuire allo sviluppo di steatosi nella bovina (Bradford et al., 2009). A causa dello stress del parto ed all'associazione con il rischio di infezione, è probabile che l'infiammazione e l'induzione della risposta immunitaria compaiano nel corso del periodo di transizione. Ciò che è sorprendente è l'aumento della secrezione di proteine di fase acuta nel fegato diversi giorni prima del parto (Bertoni et al., 2009).

Queste risposte normalmente sono scatenate dalle citochine infiammatorie, ma gli animali appaiono per il resto sani. È anche molto interessante notare come le alterazioni prepartum nelle proteine di fase acuta siano associate a successivi problemi di salute postpartum.

La steatosi nelle bovine da latte è causata da una compromissione del metabolismo lipidico ed esita in insulino-resistenza. Un TNF- α sierico elevato si riscontra in animali con steatosi e la presenza di TNF- α promuove l'accumulo di trigliceridi epatici. Oltre agli effetti sul fegato, il rilascio di TNF- α dall'infezione e dall'infiammazione uterina postpartum può essere correlato ad un ritardo della prima ovulazione, attraverso effetti negativi sulla produzione di steroidi da parte del follicolo (Sakumoto et al., 2003).

Basandosi sull'osservazione che la lipidosi epatica viene associata ad un'ampia gamma di patologie infettive quali la mastite, la metrite e la zoppia grave, si è affermato che l'attivazione del sistema immunitario magnifica il fenomeno dell'infiltrazione lipidica epatica. Le bovine affette da lipidosi epatica mostrano concentrazioni di TNF- α prima del parto decisamente superiori a quelle che non sviluppano steatosi. Ancora più evidente è la forte correlazione tra la concentrazione sierica di TNF- α 4 giorni prima del parto e l'ammontare dei lipidi a livello epatico. Subito dopo il parto, inoltre, nelle bovine affette da steatosi epatica la concentrazione delle principali proteine di fase acuta, la siero amiloide A e l'aptoglobina, risultano molto aumentate rispetto alle altre bovine (Ametaj et al., 2002). Lo scatenarsi di questi eventi, normalmente considerato come un effetto protettivo dell'organismo (Petersen et al., 2004), può essere considerato un effetto negativo nel periodo di transizione.

Infatti, con l'aumento della sintesi di aptoglobina e di siero amiloide-A, l'organismo reagisce ad uno stimolo negativo mettendo in condizione i tessuti di reagire positivamente, ma sopprime la sintesi di altre apolipoproteine coinvolte nel trasporto dei lipidi epatici, aumentando il rischio di lipidosi (Kato, 2007).

4.6 VALUTAZIONE CLINICA E ISTO-PATOLOGICA DELLA STEATOSI EPATICA

La steatosi epatica è associata ad un peggioramento dello stato di salute, del benessere, della produttività e delle performance riproduttive delle bovine (Wensing et al., 1997). Inoltre, la lipidosi epatica è associata a crescenti costi veterinari, ad aumentati periodi di interparto, a minor produzione di latte e ad una riduzione della vita media della bovina. Stimare esattamente i costi causati dalla lipidosi epatica è difficile in quanto essa è una patologia diagnosticata solo attraverso biopsia (Bobe et al., 2004).

La steatosi epatica può essere classificata come infiltrazione lipidica lieve, moderata e grave. La lipidosi epatica grave è spesso preceduta da alte concentrazioni di chetoni urinari, consistente perdita di peso corporeo e l'assunzione di alimento è inibita o, comunque, molto minore rispetto a quella richiesta per la produzione di latte (Veenhuizen et al., 1991; Hippen et al., 1999; Jorritsma et al., 2001). Bovine con grave steatosi epatica possono anche presentare una bassa concentrazione di glucocorticoidi (Morrow et al., 1979). Risultati riportati da Gerloff et al. (1986) suggeriscono che, in contrasto con la lipidosi epatica lieve e moderata, la steatosi grave si sviluppa prima del parto ed è naturalmente associata ad alte concentrazioni epatiche di trigliceridi. In casi estremi, le bovine sviluppano encefalopatia epatica, che è caratterizzata da depressione del sensorio, atassia, sonnolenza e coma (Rehage et al., 1999), fino alla morte causata da insufficienza epatica e renale o arresto cardiaco. Anche bovine con moderata lipidosi epatica presentano chetoni nelle urine ma in quantità minori rispetto alle bovine con steatosi conclamata (Hippen et al., 1999).

Bovine con steatosi epatica moderata o lieve generalmente presentano bilancio energetico negativo più grave rispetto a quelle con fegato normale.

Le bovine con steatosi presentano soprattutto dislocazioni dell'abomaso e chetosi, immunoreattività ridotta, mastiti, metriti e, secondariamente, laminiti, milk fever e ritenzione della placenta (Markusfeld, 1985; Rukkwamsuk et al., 1999; Sweeney, et al., 1988; West et al., 1990).

La produzione latte, lo stato di salute e le performances riproduttive possono essere compromessi per settimane anche dopo la diminuzione a livelli base dei trigliceridi epatici

(Veenhuizen et al.,1991; Breukink and Wensing, 1997) che suggeriscono che la lipidosi epatica è associata a cambiamenti istologici, metabolici e ormonali a lungo termine. L'accumulo dei trigliceridi a livello epatico regredisce lentamente (Veenhuizen et al.,1991).

Considerata la grande frequenza di bovine ad alta produzione in bilancio energetico negativo nel periparto ed il problema che molte siano predisposte a sviluppare disordini epatici, l'indagare sulle condizioni epatiche diviene fondamentale per tutelare la salute dell'animale visto il ruolo centrale del fegato nel metabolismo (Kalaitzakis et al., 2007).

Il rischio di sviluppare malattie aumenta parallelamente alla concentrazione di lipidi nel fegato, di conseguenza, assegnare il grado di lipidosi epatica diventa molto importante.

In condizioni di campo, la diagnosi di FCL è difficoltosa e molto spesso basata sull'anamnesi, rilevamenti clinici e fallimenti nella risposta a determinate terapie. Sono disponibili molti metodi di laboratorio che possono essere d'aiuto nella diagnosi e nell'assegnazione del grado di gravità del danno epatico, ma non esiste una combinazione di test laboratoristici in grado di diagnosticare FCL.

Tra i test usati più comunemente è presente la concentrazione di: acidi grassi non-esterificati (NEFA), glucosio, chetoni: β -idrossibutirrato (BHB). Inoltre si prendono in considerazione anche: albumine (ALB), globuline (GLO), aspartato aminotransferasi (AST o GOT), alanina aminotransferasi (ALT o GTP), proteine totali (PT) e urea. Lo scopo principale della seguente Tesi di Laurea è stato quello di esaminare la gravità e la distribuzione di FCL nelle bovine da latte. Questo è stato reso possibile grazie al metodo Kalaitzakis (Kalaitzakis et al.2007), che si basa sull'osservazione dell'infiltrazione lipidica a livello epatocitario e sulla classificazione del grado di steatosi calcolato sulla scala di punteggio di Mertens (Mertens, 1992).

Si valutano le lesioni a livello epatocitario, che spaziano dalla degenerazione idropica con lieve o marcata rarefazione citoplasmatica alla presenza vacuoli intracitoplasmatici piccoli o grandi; la percentuale del volume epatocitario interessato dall'infiltrazione lipidica; il grado di infiammazione del parenchima epatico, visibile attraverso le infiltrazioni neutrogranulocitarie e linfocitarie, le calcificazioni distrofiche e la degenerazione fibrinoide di piccole e medie arterie

5. MATERIALI E METODI

La raccolta dei dati analizzati in questo studio è stata effettuata da ottobre 2011 a febbraio 2012 in due aziende di bovine da latte di razza Frisona ad alta produzione (circa 100 quintali/capo per lattazione).

Nel progetto sono state incluse 42 vacche pluripare equamente distribuite tra i due allevamenti situati nella regione Veneto.

Su tutti gli animali oggetto di studio è stato valutato il body condition score (BCS), sono stati eseguiti prelievi ematici, per valutare lo stato metabolico nutrizionale, e prelievi bioptici ecoguidati di tessuto epatico 7 ± 5 giorni prima del parto, al fine di determinare il grado di infiltrazione lipidica ed infiammatoria del parenchima.

In seguito, 7 ± 5 giorni dopo il parto, sono stati effettuati nuovamente dei prelievi ematici ed è stato rilevato il BCS.

5.1 PROCEDURA SPERIMENTALE

5.1.1 Animali e allevamenti

Nel progetto sono state incluse 42 vacche pluripare equamente distribuite tra due allevamenti: la prima azienda è situata nella provincia di Padova, e ha un numero medio di vacche in lattazione pari a 250; l'altra si trova invece nella provincia di Vicenza e ha mediamente 120 vacche in lattazione.

Entrambe presentavano un periodo di asciutta di 60 giorni e un periodo di steaming-up di 15 giorni prima del parto.

Le aziende selezionate avevano una produzione media annua per lattazione intorno ai 100 quintali/capo per lattazione

Tutti gli animali sono stati alimentati con tecnica UNIFEED. Tabella 1 mostra la composizione chimica delle diete usate durante lo steaming-up e la successiva fase di lattazione.

I valori di NDF (Neutral detergent fiber), ADF (acid detergent fiber), NFC (non fiber carbohydrates), amido , proteina grezza, calcio, fosforo, sodio, potassio, cloro and Urea erano simili in entrambe le aziende. L'acqua era sempre disponibile e *ad libitum*.

PERIODO	AZIENDA A		AZIENDA B	
	STEAMING-UP	LATTAZIONE	STEAMING-UP	LATTAZIONE
Proteina grezza	12.63	16.59	12.87	16.66
Estratto etero	4.18	6.01	4.55	5.32
Ceneri	7.55	7.42	7.83	7.34
NDF	43.25	33.17	43.99	33.41
NFC	33.39	38.81	33.56	38.27
S.S. degr.	58.58	68.48	59.68	68.22
ADF	24.66	20.37	24.46	20.12
Amido	16.71	25.46	16.49	25.94
Calcio	0.39	1.06	0.41	0.98
Fosforo	0.24	0.45	0.24	0.43
Magnesio	0.30	0.33	0.29	0.31
Sodio	0.10	0.58	0.11	0.62
Potassio	0.43	1.45	0.51	1.39
Cloro	0.20	0.32	0.19	0.28
Zolfo	0.16	0.22	0.16	0.21

Tabella 1. Composizione chimica (%) delle diete delle vacche da latte durante lo steaming-up e la prima fase di lattazione

La scelta delle bovine oggetto di studio è stata effettuata valutandone lo stato di salute e l'assenza di sintomatologia clinica manifesta.

Gli animali scelti sono stati sottoposti alle procedure sperimentali in due momenti: 7 ± 5 giorni prima del parto e 7 ± 5 giorni dopo il parto.

A 7 ± 5 giorni prima del parto sono state effettuate le biopsie eco-guidate a livello epatico, mentre sia nel periodo pre-parto, che nel periodo post-parto sono stati effettuati i seguenti interventi:

- determinazione del Body Condition Score (BCS)
- un test da carico del glucosio in campo con successivi prelievi di sangue sequenziali per successive analisi di laboratorio
- determinazione della glicemia e della chetonemia di campo

Nel periodo post-parto sono stati rilevati anche i dati clinici e produttivi delle bovine.

5.1.2 Rilevazione del BCS

Su ciascuna bovina è stato determinato il body condition score (BCS) sia a 7 ± 5 giorni precedenti il parto sia a 7 ± 5 giorni a seguito del parto, secondo la procedura di Edmondson *et al.* (1989).

Il BCS è una valutazione visiva e tattile mediante la quale viene stabilito lo stato nutrizionale, di ingrassamento e lo sviluppo delle masse muscolari di animali in allevamento, basandosi su una scala da 1 a 5. Il punteggio 1 corrisponde a uno stato di estrema magrezza ed emaciazione, mentre il punteggio 5 coincide con uno stato di eccessivo ingrassamento.

Il punteggio può avere uno scarto minimo di un quarto di punto (0,25) (Edmondson *et al.*, 1989).

La valutazione è stata effettuata analizzando sistematicamente l'animale sia lateralmente che posteriormente, dalla parte più rostrale a quella più caudale osservando attentamente i profili dei processi spinosi, il profilo tra i processi spinosi e quelli trasversi, quello soprastante il fianco, le tuberosità ischiatiche e coxali, la regione fra natica e anca, il profilo tra le anche e l'area fra l'attacco della coda e la punta delle natiche.

5.1.3 Biopsie eco-guidate

Le biopsie eco-guidate sono state effettuate a livello dell'11° spazio intercostale a 7 ± 5 giorni prima del parto.

È stata eseguita la tricotomia dell'area cutanea tramite un rasoio monouso e disinfezione chirurgica tramite cinque passaggi alternati con alcool e iodio iodoforo (Betadine®) utilizzando garze sterili. Per l'incisione della cute è stata utilizzata una lama da bisturi n°10, previa anestesia locoregionale.

Per effettuare le biopsie è stato usato un ago Tru-Cut da biopsia istologica per tessuti molli, modello Ultimate® della Zamar s.r.l.®: diametro 14 G; innesto tru-cut 2,1 cm; lunghezza totale ago 20 cm.

La raccolta dei campioni è avvenuta all'interno di cassette per istologia e in provette crioresistenti CryoVial® (Figura 1).

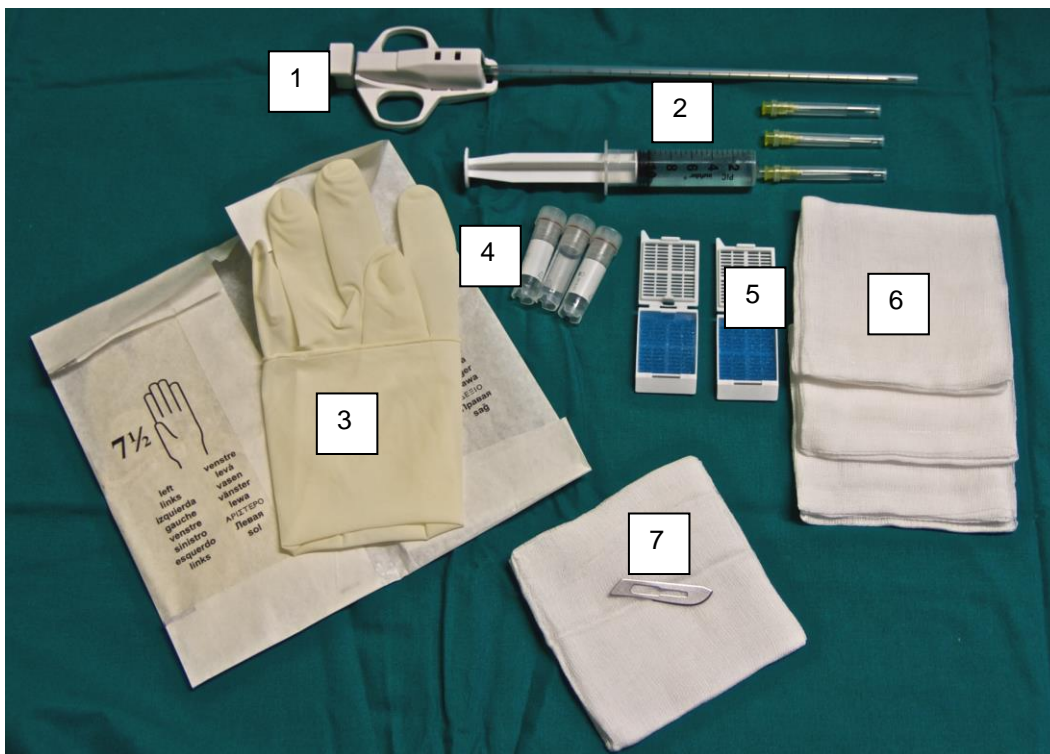


Figura 1. Materiali utilizzati per la biopsia epatica.

- 1: Ago Tru-Cut da biopsia istologica per tessuti molli.
- 2: Siringa.
- 3: Guanti sterili.
- 4: Provette crioresistenti.

- 5: Cassette per istologia.
- 6: Garze sterili.
- 7: Lama da bisturi n°10.

L'ecografia epatica è stata effettuata grazie all'impiego dell'ecografo portatile MyLab™One Vet® della Esaote S.p.A.®, sistema portatile "arm-held" (Figura 2).

A questo è stata collegata una sonda Convex SC3421® multifrequenza da 2,2-4,3-6,6 MHz della Esaote S.p.A.® (Figura 3).



Figura 2.

Ecografo portatile MyLab™One Vet® della Esaote S.p.A.®.



Figura 3.

Sonda convess SC3421® multifrequenza da 2,2-4,3-6,6 MHz della Esaote S.p.A.®.

Le biopsie di tessuto epatico effettuate su ciascun animale sono state quattro. Ogni campione biotico è stato posizionato all'interno di un' apposita cassetta per istologia e quindi conservata in soluzione acquosa al 4 % di formaldeide (formalina al 4%).

Non è stata effettuata alcuna sutura nel punto di incisione e di entrata dell'ago biotico e la ferita è stata lasciata cicatrizzare per seconda intenzione.

5.1.4. Test da carico del glucosio e prelievi ematici

Ogni bovina è stata sottoposta a due test da carico del glucosio: il primo effettuato 7 giorni prima del parto e il secondo 7 giorni dopo il parto.

La tecnica utilizzata per l'esecuzione del test è la seguente: il prelievo viene eseguito a livello della vena giugulare, dopo la cattura e il contenimento dell'animale, con un ago 22G e un vacutainer (BD Vacutainer Systems®, Preanalytical Solutions, Plymouth, UK) contenente Litio-eparina. Questo prelievo (T0) ha lo scopo di misurare la glicemia e la chetonemia basali prima dell'infusione di glucosio.

Si procede poi somministrando con un deflussore una soluzione di glucosio al 50% ad una dose di 0,25 g/kg p.v. per via endovenosa (vena giugulare opposta a quella del prelievo precedente).

Conclusa l'infusione si effettuano 13 prelievi seriali secondo tempistiche stabilite: T2, T5, T10, T15, T20, T30, T40, T60, T80, T100, T120, T140, T160, a seconda dei minuti che trascorrono dalla fine dell'infusione. I campioni, una volta raccolti, sono stati refrigerati e conservati per successive analisi di laboratorio.

5.1.5. Chetonemia e Glicemia in campo

La chetonemia e glicemia sono state misurate in campo dopo prelievo ematico (T0-T10-T80) tramite uno strumento in uso anche in medicina umana che serve per la valutazione del diabete in pazienti affetti da questa patologia: l'OPTIUM XCEED.

L'OPTIUM XCEED è uno strumento di facile utilizzo e il suo funzionamento si basa su un principio di misura di tipo elettrochimico.

Il campione da analizzare consiste semplicemente in una goccia di sangue. Si inserisce nel misuratore un'apposita striscia reattiva, diversa a seconda che si voglia ottenere il valore di chetonemia o di glicemia. All'applicazione del campione di sangue sulla striscia, o il BHB reagisce con le sostanze chimiche presenti sulla stessa. Questa reazione sviluppa una piccola reazione di corrente elettrica che viene misurata; il risultato di tale misurazione viene quindi visualizzato sul display dopo qualche secondo.

Il livello di entità di corrente varia a seconda della quantità di BHB o glucosio presente nel campione di sangue. Il range di misura del BHB è di 0,0-8,0 mmol/l, mentre quello adoperato per la glicemia è di 0,0- 300,0 mg/dl.

5.1.6 Analisi del sangue di laboratorio

I campioni ematici sono stati centrifugati entro 2 ore dalla raccolta avvenuta in campo.

E' stata utilizzata la centrifuga Labofuge 400 ad una velocità di 3500 giri al minuto per 10 minuti e il plasma ottenuto è stato stoccato in aliquote conservate poi ad una temperatura di -18°C.

Le aliquote basali di plasma (T0) sono state analizzate nel Dipartimento di Medicina Animale Produzioni e Salute dell'Università di Padova, per la determinazione di Albumine, Globuline, Proteine Totali, Urea, GOT-AST, GPT-ALT, Calcio, Cloro, Fosforo, Magnesio, Potassio e Sodio tramite l'analizzatore biochimico "BT1500" (Biotechnica Instruments S.p.A., Roma, Italy). Le concentrazioni di Plasma dei seguenti parametri è stata determinata tramite l'uso dei reagenti "Gesam" (Gesam Production s.r.l., Campobello di Mazara, TP, Italy): "Albumin LR" per le albumine (REF C1200620 518 Test, colorimetric bromocresol green BCG method, intra-assay and inter-assay CV < 4.15%); "Total Protein LR" per le proteine totali (REF E4506100, biuret methods, intra-assay and inter-assay CV < 3.92%); "Urea UV LR" per i valori di Urea (REF E4800550, Kinetic UV method Urease-GLDH, intra-assay and inter-assay CV < 3.70%); "AST- GOT LR" per GOT-AST (REF 3700650, Kinetic UV optimized method IFCC, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, intra-assay and inter-assay CV < 3.66%); "ALT - GPT LR" per i valori di GPT-ALT (REF 3800650, Kinetic UV optimized method IFCC, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, intra-assay and inter-assay CV < 3.71%); "Calcium CPC LR" per i valori di Calcio (REF 1801030, Colorimetric o cresolphthalein complexone method CPC, intra-assay and inter-assay CV < 2.11%); "Chloride LR" per i valori di Cloro (REF E2100650, Colorimetric method mercurious thiocyanate, intra-assay and inter-assay CV < 2.60%); "Phosphorus LR" per i valori di Fosforo (REF C3300620, Colorimetric blue of molybdate method, intra-assay and inter-assay CV < 2.71%); "Magnesium LR" per i valori di Magnesio (REF C4400620 518 Test, Colorimetric method Xylidyl Blue, intra-assay and inter-assay CV < 4.89%); "Potassium LR" per i valori di Potassio (REF 4900430, Turbidimetric method, intra-assay and inter-assay CV < 2.75%); "Sodium LR" per i valori di Sodio (REF 4950180, Kinetic enzymatic method, intra-assay and inter-assay CV < 4.72%). Le Globuline, invece, sono state determinate calcolando la differenza tra le Proteine totali e la concentrazione delle Albumine.

UOne of the series of plasma aliquots have been transferred and stored at -20° at the Laboratory

of Medical Clinic (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, IZSVE) Per le analisi del glucosio, NEFA, BHB e insulin è stata adoperata una macchina automatizzata e un kit commercial basato su reazioni enzimatiche, colorimetriche e immunologiche (kit ELISA) presso il laboratorio di clinica medica dell'Istituto Zooprofilattico sperimentale delle Venezie. Tutti I campioni sono stati testate con la macchina Cobas c 501 analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany): Glucosio, glucose HK test (kit no. 04404483190VB, Roche Diagnostics);NEFA, test colorimetrico NEFA RX Monza test (kit no. FA 115, Randox, Crumlin, UK); BHB, con metodo UV cinetico RANBUT RX Monza test (kit no. RB 1007, Randox, Crumlin, UK); Insulina, misurata con Immulite One analyzer (Siemens, distributed by Medical Systems S.p.A., Genova, Italy) e kit commercial a fase solida e chemilluminescenza immunometrica (Siemens Healthcare, Diagnostic Products Ltd, Gwynedd, UK).

Il valore minimo valutabile per il test insulinemico era attestabile sui livelli di 14.7 pmol/l.

5.1.7 Esame istologico del fegato

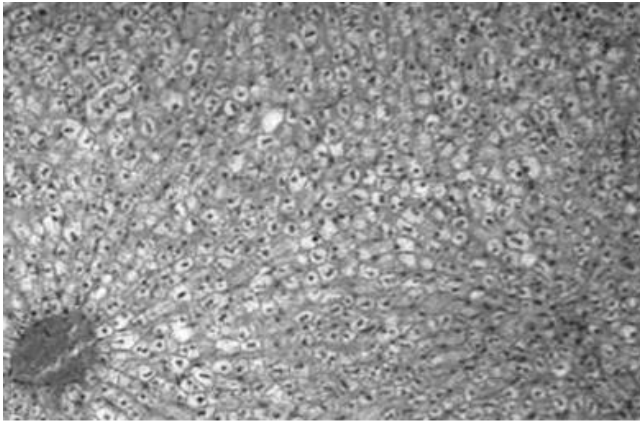
Dopo essere stati fissati in formalina al 4%, trattati secondo la metodologia di routine ed incisi allo spessore di 3-4 µm , i campioni sono stati colorati con ematossilina ed eosina (HE). Tutti i campioni sono stati esaminati per il loro contenuto lipidico tramite microscopio ottico. Il contenuto di lipidi a livello epatico è stato classificato in base a 6 diversi livelli (gradi di Leberverfettung o GdL), che spaziano tra: 0 = gocce lipidiche non visibili, epatociti totalmente normali e 5 = infiltrazione lipidica panlobulare.

Nei nostri riscontri però, abbiamo evidenziato la presenza dei livelli da 0 a 3, non avendo riscontrato livelli di infiltrazione pari al grado 4 e al grado 5.

Questa classificazione è stata eseguita tramite la scala di punteggio di Mertens 1992. Secondo tale scala, l'area dalla vena centrale alla triade portale del lobulo epatico viene diviso in 3 regioni concentriche eque.

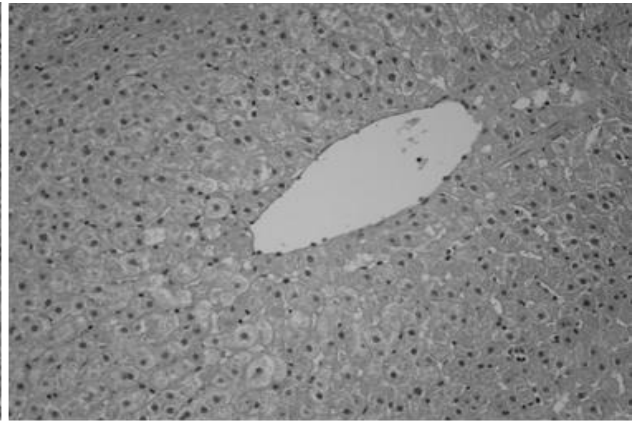
In ciascuna di queste regioni, è stato ottenuto, come riportato in tabella 2 un punteggio usando le seguenti valutazioni delle lesioni in ordine ascendente di gravità.

Tabella 2. Scala adoperata per attribuire punteggio lesioni Epatiche.



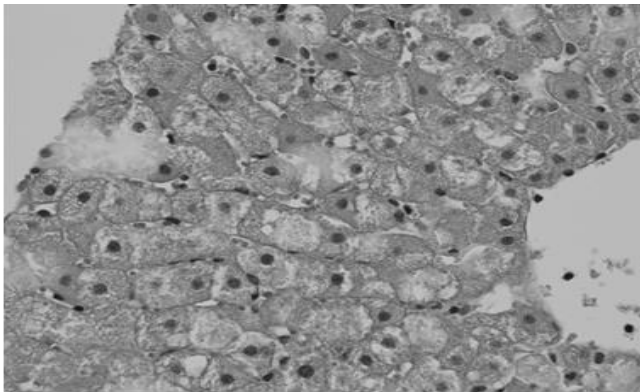
Assenza lesioni Patologiche:

0 punti



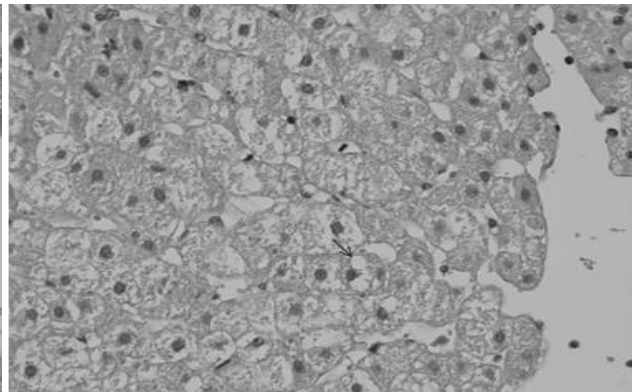
Deg. idropica con lieve rarefazione citoplasmatica:

1,0 punti



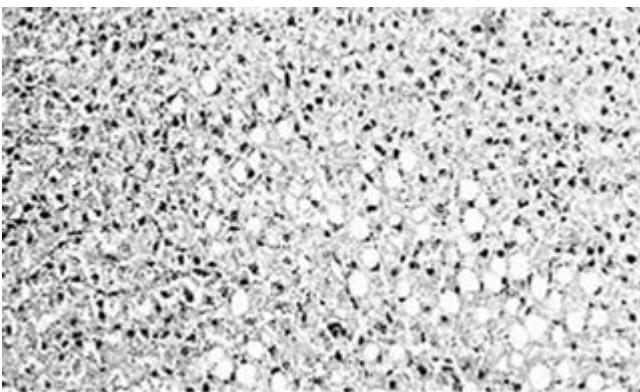
Deg. idropica con marcata rarefazione citoplasmatica:

2,0 punti



Presenza vacuoli piccoli intra-citoplasmatici:

3,0 punti



Presenza vacuoli grandi intracitoplasmatici:

4,0 punti

Questo considerando che i lipidi nella colorazione HE sono visibili come vacuoli nel citoplasma degli epatociti, perché vengono solubilizzati dall'alcool durante il processo di colorazione. Alle regioni è stato assegnato un punteggio in base alla presenza delle lesioni più gravi. Per esempio, se in una regione un vacuolo grande coesiste con piccoli vacuoli o rigonfiamenti nelle altre cellule, è stato assegnato comunque un punteggio di 4,0 punti.

Questi punti sono stati sommati e si è ottenuto un punteggio per ogni lobulo.

Per tutti i campioni, sono stati valutati 5 lobuli diversi ed è stata calcolata la percentuale di parenchima coinvolto:

- < 30% : 1 punto
- 30-60% : 2 punti
- > 60% : 3 punti

Si è inoltre valutato il grado di infiltrazione infiammatoria a livello di lobulo epatico:

- Se assente : 0 punti
- Se lieve : 1 punto
- Se moderata : 2 punti

5.1.8. Dati clinici e produttivi

Nel periodo post-parto sono state inoltre valutate per esame diretto l'assenza (0) o la presenza (1) di ritenzione placentare, metrite, distocia, mastite, collasso puerperale, zoppia. I dati relativi alla produzione giornaliera di latte, alla percentuale di grasso e di proteine e al numero di cellule somatiche sono stati ottenuti dai tabulati APA relativi ai controlli funzionali mensili, facendo riferimento ai primi 4 controlli funzionali del periodo oggetto di studio.

5.2. ELABORAZIONE DATI ED ANALISI STATISTICA

I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi descrittiva mediante l'uso del software EXCEL. Successivamente, tramite software SIGMA STAT 3.7, è stata effettuata l'analisi della varianza (ANOVA) al fine di valutare l'effetto del periodo (pre-parto vs post-parto) sul test da carico del glucosio, sui parametri ematici, sul BCS e sui parametri epatici (infiltrazione lipidica ed infiammatoria dei campi microscopici analizzati).

Sono state infine calcolate le correlazioni di Pearson tra tutti i parametri presi in considerazione.

L'analisi della varianza a due vie (ANOVA) è stata usata per determinare le significatività sull'effetto dei differenti periodi (pre-partum vs post-partum) e sulle 2 aziende (Azienda A vs Azienda B) sui parametri oggetto di studio; e l'effetto prima e dopo la somministrazione del test da carico di glucosio (T_0 , T_{10} and T_{80}) sul glucosio determinato in campo.

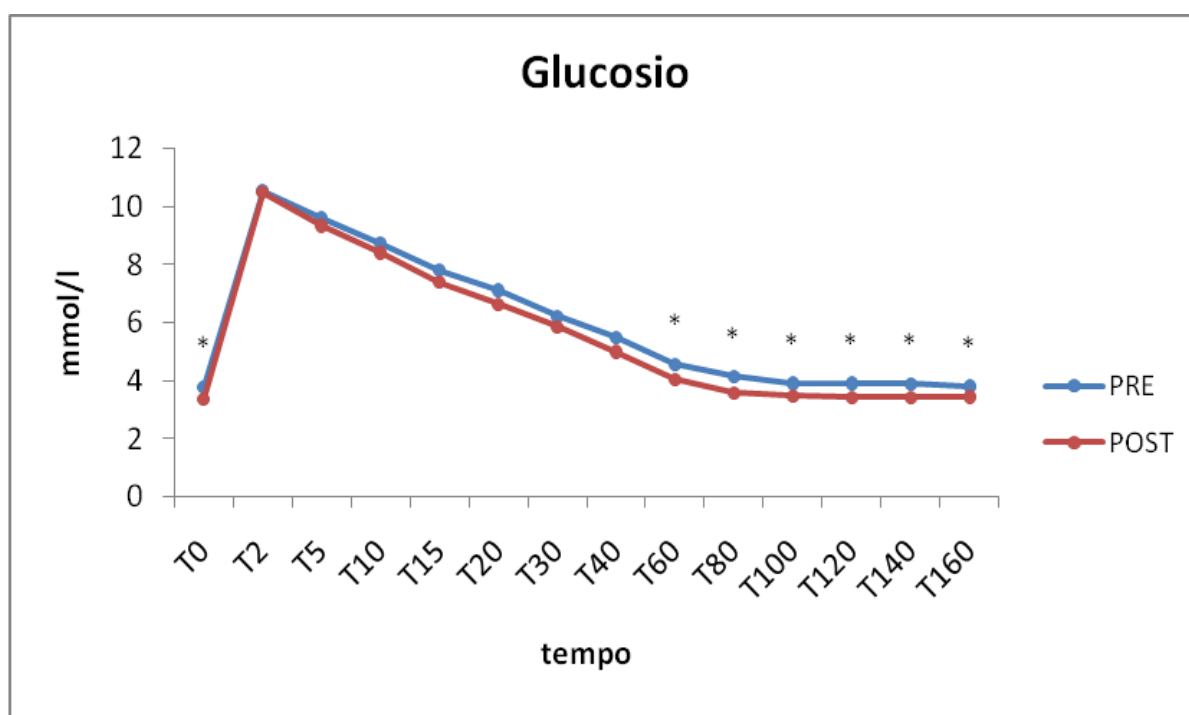
I dati sono stati analizzati con il software Prism v. 4.00 (Graphpad Software Ltd., USA, 2003). Tutti i risultati sono espressi con le medie \pm deviazione standard (SD).

5.RISULTATI

Per tutte le tempistiche i valori riscontrati nel periodo pre-parto sono risultati essere maggiori rispetto a quelli riscontrati nel post-parto. In particolare per quanto concerne i prelievi effettuati a T0, T60, T80, T100, T120, T140 e T160, tale differenza è risultata essere statisticamente significativa ($P<0,05$).

Anche per quanto riguarda i valori di glicemia rilevata in campo (T0 campo, T10 campo e T80 campo) , sono risultati più alti quelli relativi al periodo pre-parto rispetto al post-parto e, nel caso di T0 e T80, è stata evidenziata una differenza statisticamente significativa ($P<0,05$).

Grafico 1. Andamento dei valori della glicemia nel periodo pre-parto (pre) e nel periodo post-parto (post) secondo le diverse tempistiche.



*: l'asterisco indica differenze statisticamente significative ($P<0,05$) nella stessa tempistica tra i due periodi (pre-parto vs post-parto).

Nel grafico 1 è possibile osservare l'andamento della glicemia nei due distinti periodi (pre-parto e post-parto) secondo le varie tempistiche.

Al fine di valutare un eventuale effetto azienda in tabella 3 vengono riportati i valori medi della glicemia distinti tra i due periodi all'interno delle due aziende oggetto di studio.

Tabella 3. Media \pm deviazione standard dei valori della glicemia nel periodo pre-parto e nel periodo post-parto e distinti nelle due aziende (azienda A e azienda B).

GLUCOSIO (mmol/l)	AZIENDA A		AZIENDA B		PERIODO	
	PRE-PARTO	POST-PARTO	PRE-PARTO	POST-PARTO	PRE-PARTO	POST-PARTO
T0	3,51 \pm 0,29b	3,41 \pm 1,09	4,07 \pm 0,94*a	3,34 \pm 0,37**	3,79 \pm 0,59*	3,37 \pm 0,93**
T0 campo	2,80 \pm 0,30*	2,40 \pm 0,41**	3,01 \pm 0,48*	2,53 \pm 0,38**	2,90 \pm 0,37*	2,46 \pm 0,40**
T2	10,58 \pm 1,51	10,02 \pm 1,90	10,51 \pm 2,63	10,97 \pm 1,95	10,54 \pm 1,87	10,50 \pm 1,93
T5	9,73 \pm 1,39	9,25 \pm 1,73	9,45 \pm 2,20	9,43 \pm 1,41	9,60 \pm 1,63	9,34 \pm 1,63
T10	8,74 \pm 1,34	8,20 \pm 1,26	8,82 \pm 1,93	8,63 \pm 1,25	8,74 \pm 1,51	8,41 \pm 1,26
T10 campo	7,31 \pm 1,04	6,00 \pm 1,23	7,18 \pm 1,62	7,08 \pm 1,37	7,24 \pm 1,21	7,04 \pm 1,25
T15	7,84 \pm 1,22	7,39 \pm 1,27	7,76 \pm 1,78	7,42 \pm 1,31	7,80 \pm 1,32	7,40 \pm 1,27
T20	7,05 \pm 1,35	6,74 \pm 1,22	7,19 \pm 1,66	6,52 \pm 1,45	7,12 \pm 1,43	6,63 \pm 1,27
T30	6,17 \pm 0,91	5,73 \pm 1,49	5,77 \pm 2,43	5,79 \pm 1,08	6,22 \pm 1,48	5,85 \pm 1,37
T40	5,36 \pm 0,95	5,04 \pm 1,04	5,63 \pm 1,64	4,95 \pm 1,14	5,50 \pm 1,18	4,99 \pm 1,05
T60	4,33 \pm 0,84	4,04 \pm 0,97	4,82 \pm 1,38	4,02 \pm 0,97	4,57 \pm 1,03*	4,03 \pm 0,96**
T80	3,86 \pm 0,67b	3,57 \pm 0,68	4,42 \pm 0,95a*	3,58 \pm 0,62**	4,14 \pm 0,80*	3,58 \pm 0,66**
T80 campo	2,99 \pm 0,66b*	2,56 \pm 0,47**	3,55 \pm 0,92*a	2,58 \pm 0,47**	3,27 \pm 0,78*	2,57 \pm 0,47**
T100	3,70 \pm 0,74b	3,53 \pm 0,60	4,11 \pm 0,64a*	3,44 \pm 0,42**	3,91 \pm 0,76*	3,48 \pm 0,55**
T120	3,67 \pm 0,91	3,48 \pm 0,53	4,16 \pm 0,73*	3,38 \pm 0,39**	3,91 \pm 0,88*	3,43 \pm 0,50**
T140	3,82 \pm 0,48*	3,42 \pm 0,48**	3,97 \pm 0,50*	3,42 \pm 0,36**	3,89 \pm 0,48*	3,42 \pm 0,45**
T160	3,68 \pm 0,38b	3,45 \pm 0,51	3,91 \pm 0,45a*	3,43 \pm 0,32**	3,80 \pm 0,42*	3,44 \pm 0,46**

*, **: asterischi diversi nella stessa riga indicano differenze statisticamente significative (P<0,05) tra i due diversi periodi (pre-parto vs post-parto).

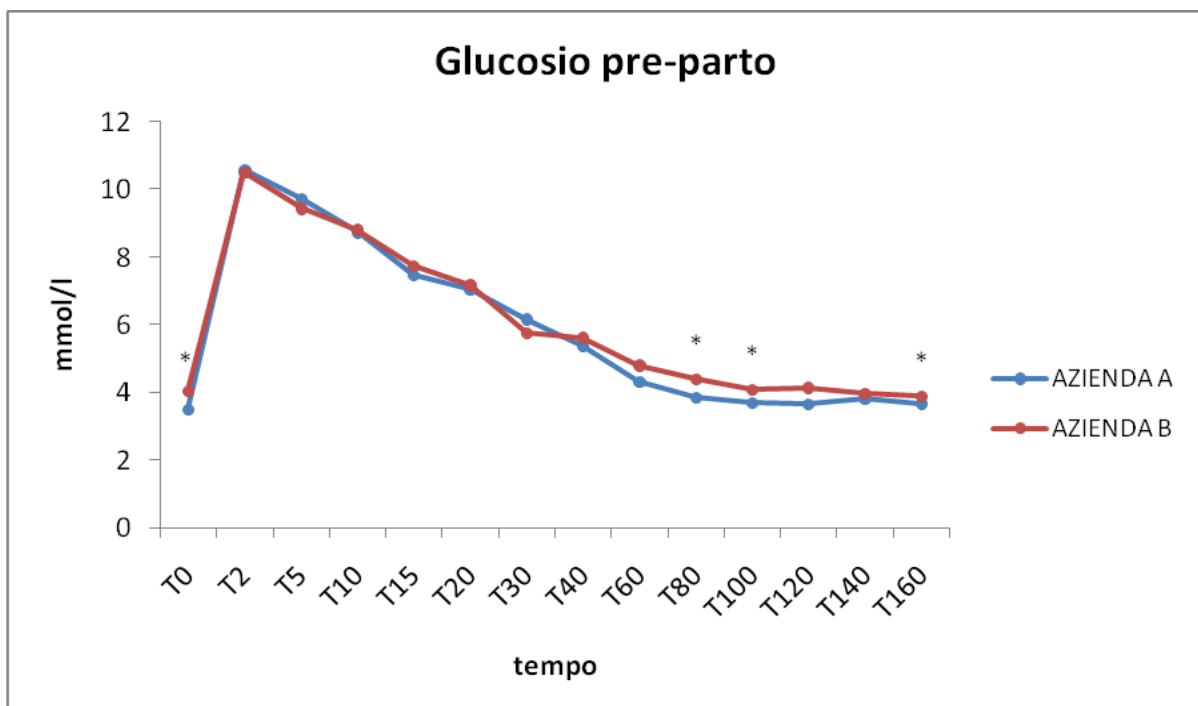
a, b: lettere diverse nella stessa riga indicano differenze statisticamente significative (P<0,05) tra le due aziende (azienda A vs azienda B) all'interno dello stesso periodo(pre).

Nell'azienda A sono emerse differenze statisticamente significative tra i due periodi (pre-parto e post-parto) per quanto riguarda i valori della glicemia di campo T0 e T80 e la glicemia al prelievo T140. Nell'azienda B invece differenze rilevanti tra i periodi sono state riscontrate, oltre che nella glicemia di campo T0 e T80, anche nella glicemia a T0, T80, T100, T120, T140 e T160.

Le due aziende sono poi risultate differire in modo statisticamente significativo all'interno del periodo pre-parto per quanto riguarda i valori della glicemia a T0, T80, T80 campo, T100 e T160. In tutte queste tempistiche i valori dell'azienda B sono risultati essere maggiori di quelli dell'azienda A. Non sono emerse differenze rilevanti tra le due aziende per quanto concerne il periodo post-parto.

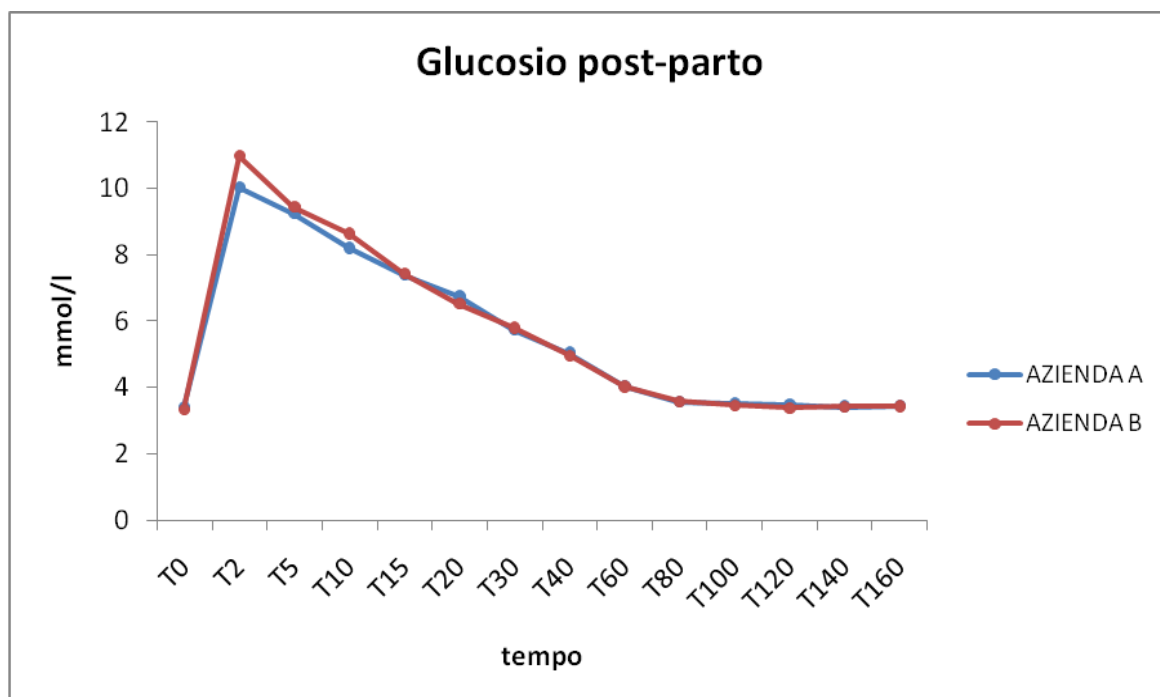
I grafici 2 e 3 mostrano i valori della glicemia rispettivamente nel periodo pre-parto e nel periodo post-parto, rilevati in corrispondenza delle diverse tempistiche, distinti tra l'azienda A e l'azienda B.

Grafico 2. Valori della glicemia nel periodo pre-parto distinti tra le due aziende (azienda A vs azienda B).



*: l'asterisco indica differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) nella stessa tempistica tra le due aziende (azienda A vs azienda B).

Grafico 3. Valori della glicemia nel periodo post-parto distinti tra le due aziende (azienda A vs azienda B).



La tabella 4 mostra i valori ematici dell'insulina secondo le diverse tempistiche distinti nel periodo pre-parto e nel periodo post-parto, indipendentemente dall'azienda.

I valori rilevati nel pre-parto sono risultati essere più elevati di quelli riscontrati nel post-parto per quanto riguarda quasi tutte le tempistiche a eccezione di quelli rilevati a T100 e a T160, in cui i valori nel post-parto sono risultati lievemente superiori a quelli del pre-parto. In nessuno dei casi, comunque, le differenze sono risultate essere statisticamente significative.

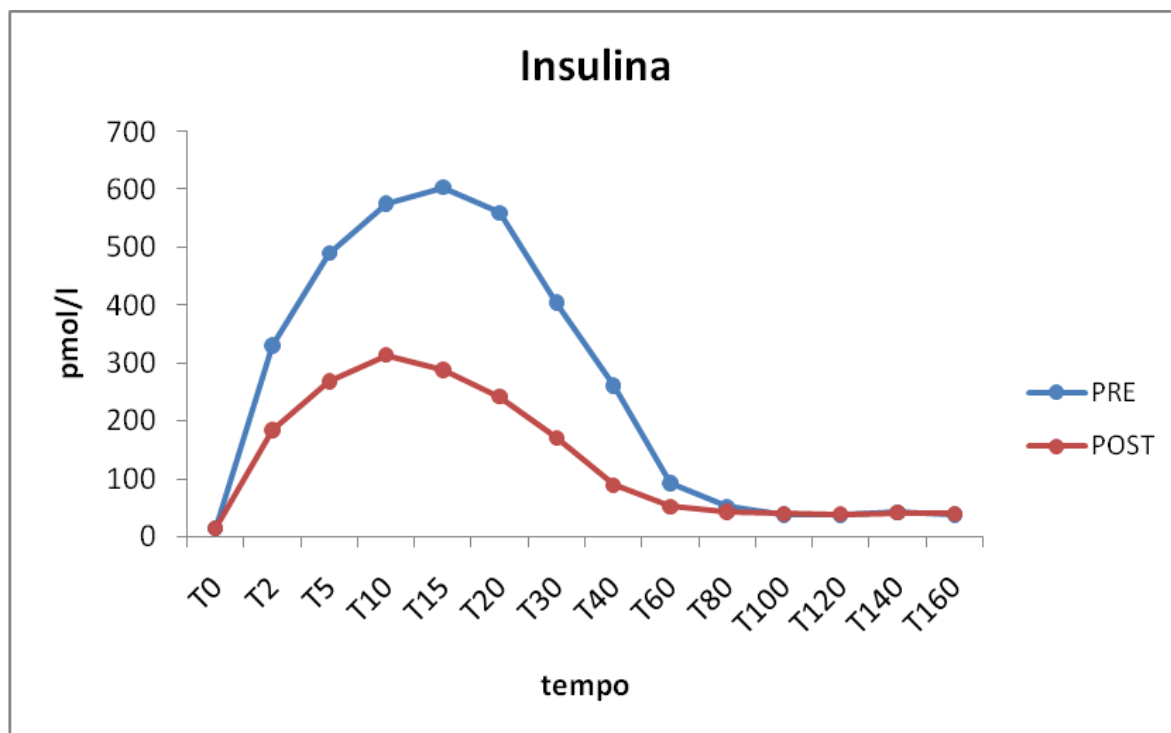
Come si può evidenziare non sono emerse differenze statisticamente significative per nessuna delle tempistiche, né tra i diversi periodi all'interno della stessa azienda, né tra le due aziende oggetto di studio nello stesso periodo. A T0 i valori sono risultati <14,35 per entrambe le aziende e per entrambi i periodi, perché la metodica utilizzata in laboratorio per dosare l'insulina riesce a rilevare solo valori superiori a 14,35 pmol/l.

Tabella 4. Media±deviazione standard dei valori ematici dell'insulina riscontrati nel periodo pre-parto e nel periodo post-parto distinti nelle due aziende (azienda A e azienda B).

INSULINA (pmol/l)	AZIENDA A		AZIENDA B		PERIODO	
	PRE-PARTO	POST-PARTO	PRE-PARTO	POST-PARTO	PRE-PARTO	POST-PARTO
T0	<14,35	<14,35	<14,35	<14,35	<14,35	<14,35
T2	470,92±466,33	238,87±287,06	188,96±264,01	127,52±134,84	329,94±433,32	183,20±255,80
T5	707,80±631,36	308,87±321,45	271,82±335,95	225,60±208,56	489,81±591,28	267,23±292,61
T10	842,91±718,43	329,05±326,61	308,73±443,11	296,92±284,11	575,82±687,50	312,98±309,38
T15	848,79±705,40	299,97±313,02	359,08±477,06	275,47±283,05	603,94±676,21	287,72±298,65
T20	790,52±703,88	233,57±252,35	330,42±417,15	248,70±79,85	560,47±659,36	241,14±223,22
T30	523,64±523,38	152,30±194,12	285,41±356,06	188,40±275,53	404,53±485,54	170,35±212,79
T40	327,63±369,21	123,17±196,63	194,61±226,64	53,15±26,89	261,12±335,34	88,16±169,09
T60	117,69±184,68	66,51±171,78	66,60±31,48	35,52±33,45	92,15±158,45	51,01±148,38
T80	68,14±138,03	57,57±114,98	35,18±16,45	27,08±16,69	51,66±117,91	42,33±98,40
T100	55,78±125,90	55,29±106,96	18,64±4,85	21,77±13,67	37,21±107,86	38,52±91,62
T120	52,10±121,45	53,60±112,79	20,88±8,93	22,25±18,89	36,49±103,82	37,92±96,49
T140	63,62±123,97	53,46±111,88	18,55±8,70	27,51±32,23	41,08±107,01	40,48±96,29
T160	58,46±125,12	51,42±106,52	17,10±5,70	26,90±30,57	37,78±107,55	39,16±91,85

L'andamento dell'insulina nel corso dei diversi prelievi nei due periodi è rappresentato nel grafico 4.

Grafico 4. Andamento dei valori ematici dell'insulina nel periodo pre-parto (pre) e nel periodo post-parto (post) secondo le diverse tempistiche.



I grafici 5 e 6 mostrano rispettivamente nel periodo del pre-parto e nel periodo del post-parto i valori ematici dell'insulina distinti nelle due aziende.

Grafico 5. Valori ematici dell'insulina nel periodo pre-parto distinti tra le due aziende (azienda A vs azienda B).

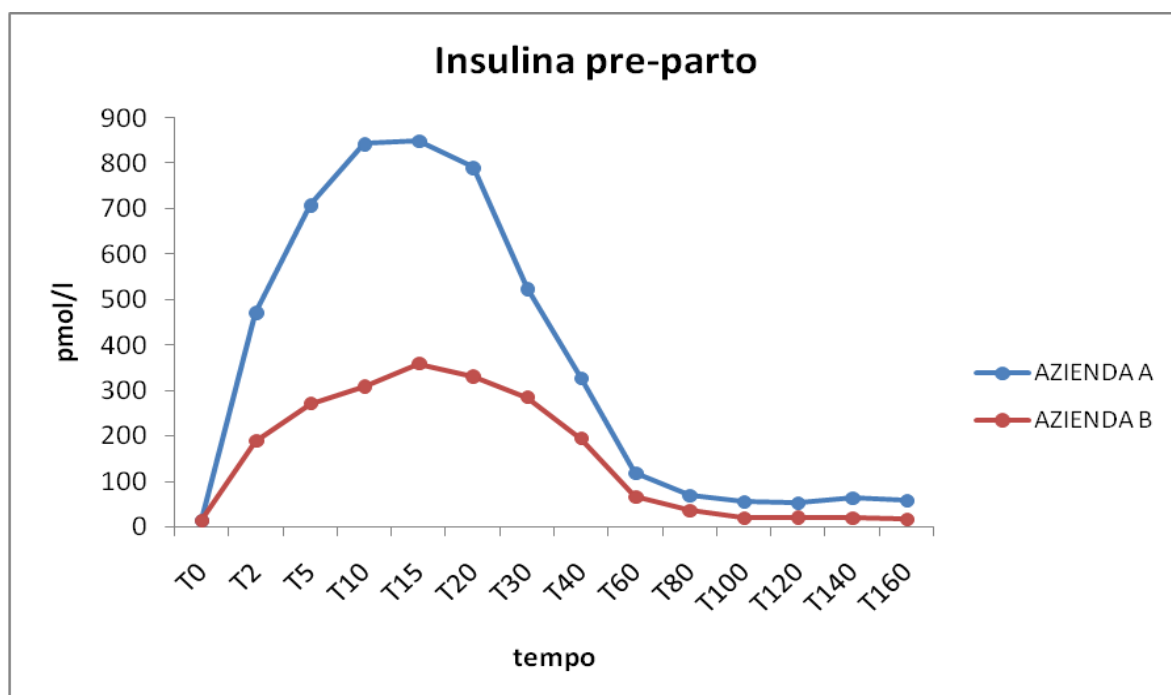
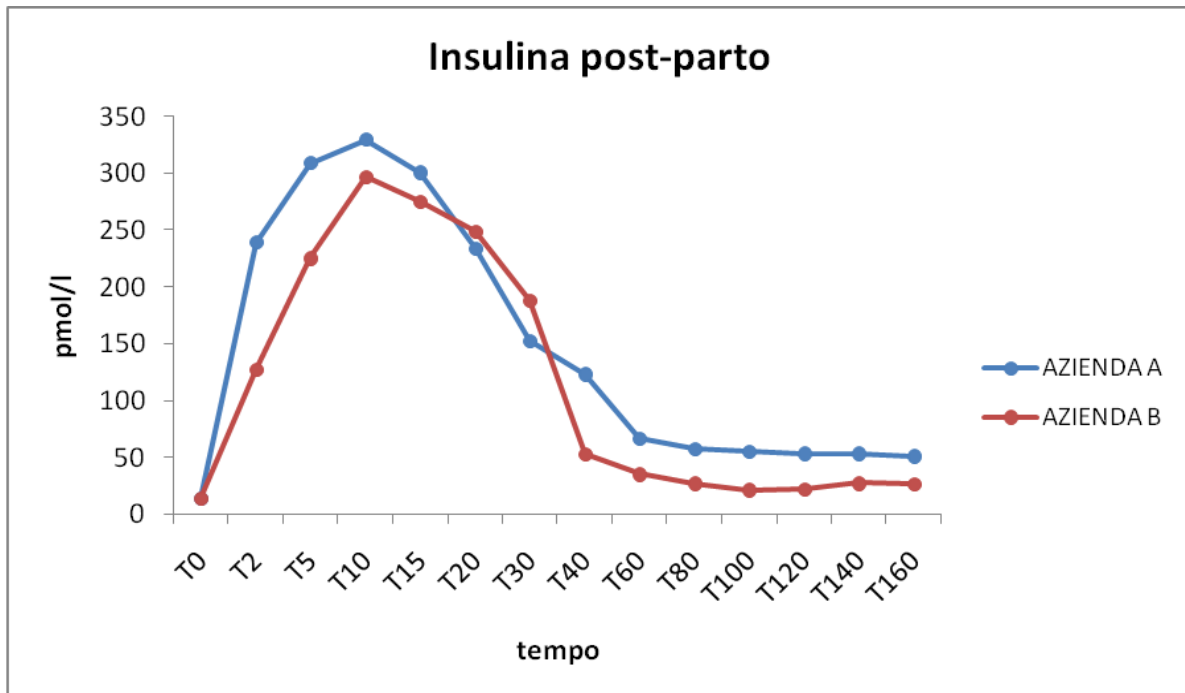
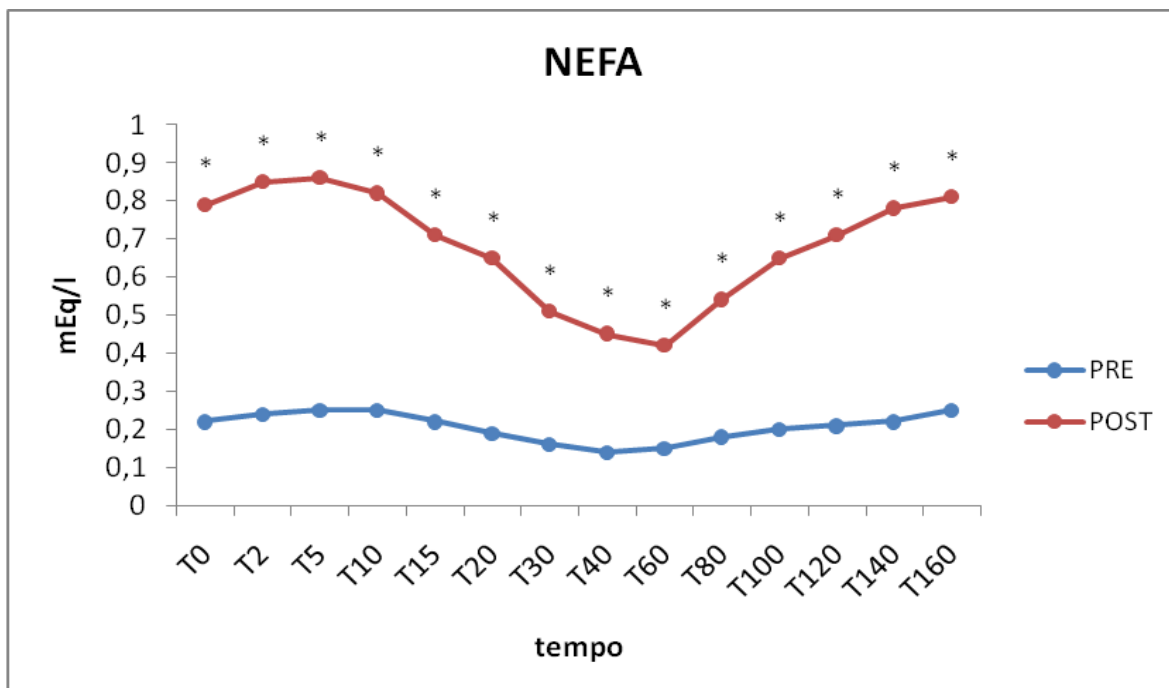


Grafico 6. Valori ematici dell'insulina nel periodo post-parto distinti tra le due aziende (azienda A vs azienda B).



Nel grafico 7 è possibile osservare l'andamento dei NEFA nei due distinti periodi secondo le diverse tempistiche.

Grafico 7. Andamento dei valori ematici dei NEFA nel periodo pre-parto (pre) e nel periodo post-parto (post) secondo le diverse tempistiche.



*: l'asterisco indica differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) nella stessa tempistica tra i due periodi (pre-parto vs post-parto).

La tabella 5 mostra i valori ematici degli acidi grassi non esterificati (NEFA) nel periodo pre-parto e nel periodo post-parto, indipendentemente dall'azienda di origine. I valori rilevati nel pre-parto sono risultati differire in modo statisticamente significativo da quelli nel post-parto per quanto riguarda tutte le tempistiche. In particolare nel periodo post-parto tali valori si sono dimostrati elevati rispetto al periodo pre-parto. Per tutte le tempistiche prese in esame si sono evidenziate differenze statisticamente significative tra il periodo pre e post-parto all'interno delle singole aziende.

Tabella 5. Media \pm deviazione standard dei valori ematici dei NEFA distinti nel periodo pre-parto e nel periodo post-parto e distinti nelle due aziende (azienda A e azienda B)

NEFA (mEq/l)	AZIENDA A		AZIENDA B		PERIODO	
	PRE-PARTO	POST-PARTO	PRE-PARTO	POST-PARTO	PRE-PARTO	POST-PARTO
T0	0,16 \pm 0,11*	0,81 \pm 0,40**	0,28 \pm 0,34*	0,77 \pm 0,86**	0,22 \pm 0,21*	0,79 \pm 0,56**
T2	0,20 \pm 0,13*	0,86 \pm 0,35**	0,29 \pm 0,31*	0,84 \pm 0,53**	0,24 \pm 0,20*	0,85 \pm 0,40**
T5	0,21 \pm 0,14*	0,87 \pm 0,35**	0,28 \pm 0,30*	0,85 \pm 0,52**	0,25 \pm 0,20*	0,86 \pm 0,40**
T10	0,20 \pm 0,14*	0,82 \pm 0,36**	0,30 \pm 0,34*	0,82 \pm 0,57**	0,25 \pm 0,21*	0,82 \pm 0,43**
T15	0,18 \pm 0,13*	0,72 \pm 0,34**	0,27 \pm 0,33*	0,70 \pm 0,54**	0,22 \pm 0,21*	0,71 \pm 0,40**
T20	0,16 \pm 0,11*	0,64 \pm 0,33**	0,22 \pm 0,28*	0,65 \pm 0,53**	0,19 \pm 0,18*	0,65 \pm 0,39**
T30	0,14 \pm 0,13*	0,55 \pm 0,33**	0,18 \pm 0,22*	0,47 \pm 0,39**	0,16 \pm 0,16*	0,51 \pm 0,35**
T40	0,13 \pm 0,12*	0,45 \pm 0,28**	0,16 \pm 0,20*	0,45 \pm 0,36**	0,14 \pm 0,14*	0,45 \pm 0,30**
T60	0,14 \pm 0,14*	0,46 \pm 0,25**	0,16 \pm 0,18*	0,39 \pm 0,30**	0,15 \pm 0,15*	0,42 \pm 0,26**
T80	0,17 \pm 0,19*	0,59 \pm 0,28**	0,18 \pm 0,20*	0,49 \pm 0,27**	0,18 \pm 0,19*	0,54 \pm 0,27**
T100	0,20 \pm 0,18*	0,70 \pm 0,31**	0,19 \pm 0,16*	0,61 \pm 0,32**	0,20 \pm 0,17*	0,65 \pm 0,31**
T120	0,22 \pm 0,17*	0,77 \pm 0,33**	0,21 \pm 0,17*	0,66 \pm 0,36**	0,21 \pm 0,17*	0,71 \pm 0,34**
T140	0,22 \pm 0,28*	0,84 \pm 0,35**	0,23 \pm 0,22*	0,72 \pm 0,46**	0,22 \pm 0,26*	0,78 \pm 0,38**
T160	0,23 \pm 0,18*	0,85 \pm 0,36**	0,26 \pm 0,53*	0,78 \pm 0,54**	0,25 \pm 0,32*	0,81 \pm 0,41**

*, **: asterischi diversi nella stessa riga indicano differenze statisticamente significative (P<0,05) tra i due diversi periodi (pre-parto vs post-parto).

Grafico 8. Valori ematici dei NEFA nel periodo pre-parto distinti tra le due aziende (azienda A vs azienda B).

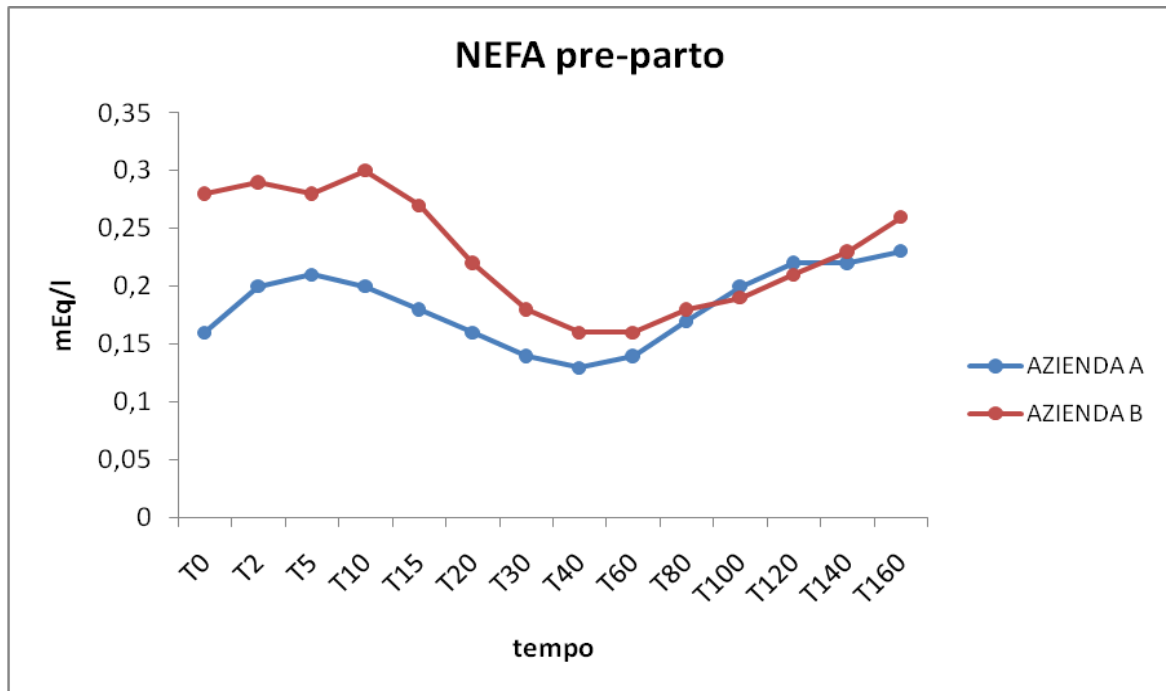
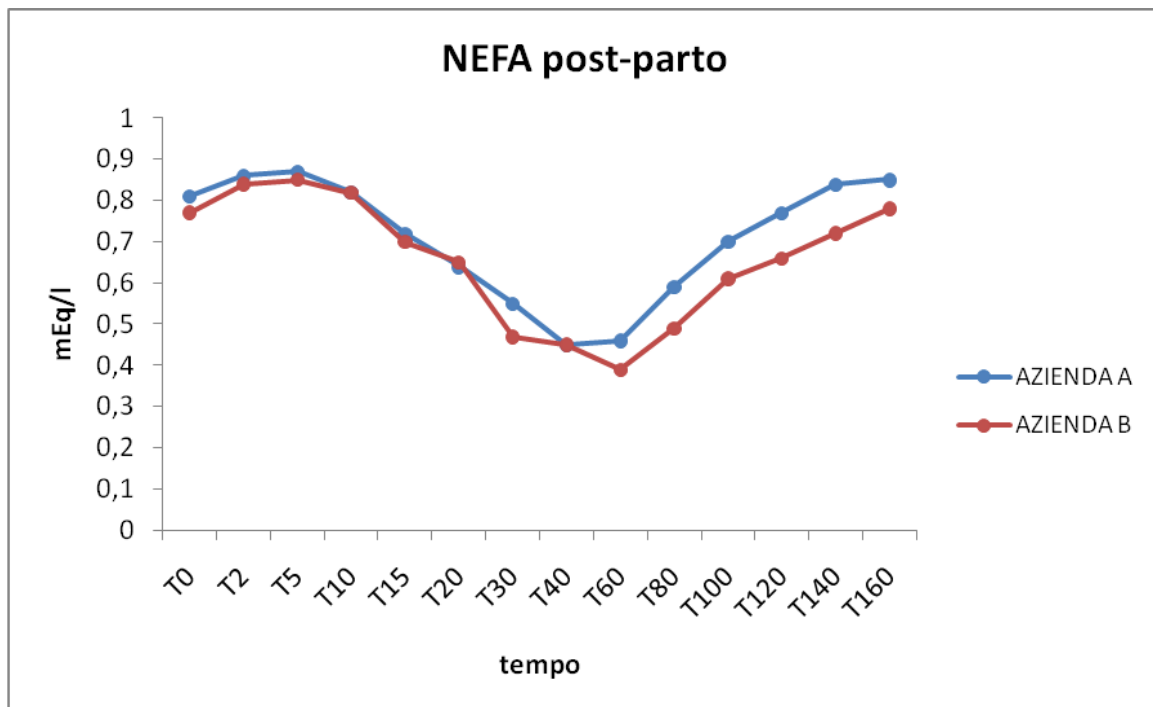
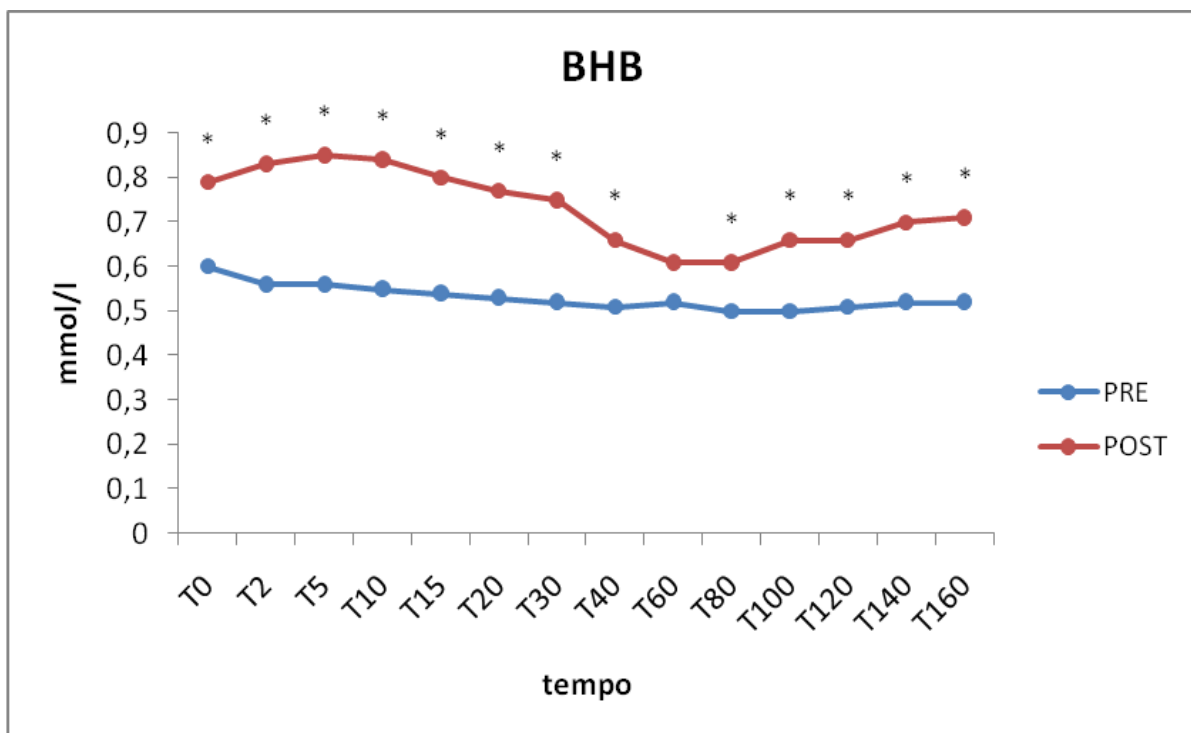


Grafico 9. Valori ematici dei NEFA nel periodo post-parto distinti tra le due aziende (azienda A vs azienda B).



Come è possibile osservare, in tutte le tempistiche i valori nel post-parto sono risultati maggiori dei valori nel pre-parto e, ad eccezione di quelli rilevati a T0 in campo e a T60, questa differenza tra i periodi è risultata essere statisticamente significativa. Il grafico 10 mostra l'andamento dei valori di BHB nei due periodi.

Grafico 10. Andamento dei valori ematici del BHB nel periodo pre-parto (pre) e nel periodo post-parto (post) secondo le diverse tempistiche.



*: l'asterisco indica differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) nella stessa tempistica tra i due periodi (pre-parto vs post-parto).

Per quanto riguarda il BHB, i valori medi all'interno dei due periodi sono riportati in tabella 6. Al fine di valutare eventuali differenze tra le due aziende sono riportati i valori ematici del BHB nel periodo pre-parto come nel post-parto, divisi nelle due aziende. Per quanto riguarda i valori rilevati all'interno dell'azienda A, per tutte le tempistiche si sono osservate differenze statisticamente significative, a parte in T0 di campo. Lo stesso non vale per l'azienda B, in cui solo per quanto concerne T5 e T10 sono emerse differenze statisticamente significative; per quanto riguarda le altre tempistiche, i valori non sono risultati differire in maniera rilevante. Tra l'azienda A e l'azienda B non sono state osservate differenze rilevanti né all'interno del periodo pre-parto, né per quanto riguarda il periodo post-parto.

Tabella 6. Media±deviazione standard dei valori ematici del BHB riscontrati nel periodo pre-parto e nel periodo post-parto distinti nelle due aziende (azienda A e azienda B).

BHB (mmol/l)	AZIENDA A		AZIENDA B		PERIODO	
	PRE-PARTO	POST-PARTO	PRE-PARTO	POST-PARTO	PRE-PARTO	POST-PARTO
T0	0,57±0,12*	0,84±0,45**	0,64±0,31	0,74±0,24	0,60±0,19*	0,79±0,40**
T0 campo	0,65±0,65	0,81±0,52	0,59±0,32	0,72±0,32	0,62±0,57	0,76±0,47
T2	0,55±0,12*	0,86±0,43**	0,56±0,25	0,79±0,30	0,56±0,16*	0,83±0,39**
T5	0,56±0,11*	0,89±0,44**	0,56±0,25*	0,81±0,30**	0,56±0,16*	0,85±0,40**
T10	0,55±0,12*	0,88±0,44**	0,55±0,25*	0,81±0,31**	0,55±0,16*	0,84±0,41**
T15	0,54±0,12*	0,84±0,42**	0,53±0,25	0,75±0,28	0,54±0,16*	0,80±0,38**
T20	0,52±0,12*	0,81±0,40**	0,54±0,26	0,73±0,30	0,53±0,17*	0,77±0,37**
T30	0,51±0,13*	0,79±0,43**	0,52±0,25	0,70±0,29	0,52±0,17*	0,75±0,39**
T40	0,51±0,13*	0,68±0,36**	0,52±0,27	0,64±0,27	0,51±0,17*	0,66±0,34**
T60	0,52±0,14	0,63±0,31	0,51±0,26	0,59±0,22	0,52±0,18	0,61±0,28
T80	0,50±0,12*	0,62±0,30**	0,49±0,23	0,60±0,19	0,50±0,16*	0,61±0,27**
T100	0,51±0,11*	0,66±0,27**	0,50±0,19	0,65±0,19	0,50±0,14*	0,66±0,25**
T120	0,52±0,10*	0,70±0,29**	0,50±0,19	0,63±0,16	0,51±0,13*	0,66±0,26**
T140	0,51±0,09*	0,74±0,29**	0,52±0,24	0,66±0,18	0,52±0,15*	0,70±0,26**
T160	0,52±0,11*	0,73±0,28**	0,52±0,25	0,69±0,20	0,52±0,16*	0,71±0,26**

*, **: asterischi diversi nella stessa riga indicano differenze statisticamente significative (P<0,05) tra i due diversi periodi (pre-parto vs post-parto).

Gli andamenti nel periodo pre-parto e nel periodo post-parto dei valori del BHB distinti nelle due aziende sono rappresentati rispettivamente nei grafici 11 e 12.

Grafico 11. Valori ematici del BHB nel periodo pre-parto distinti tra le due aziende (azienda A vs azienda B).

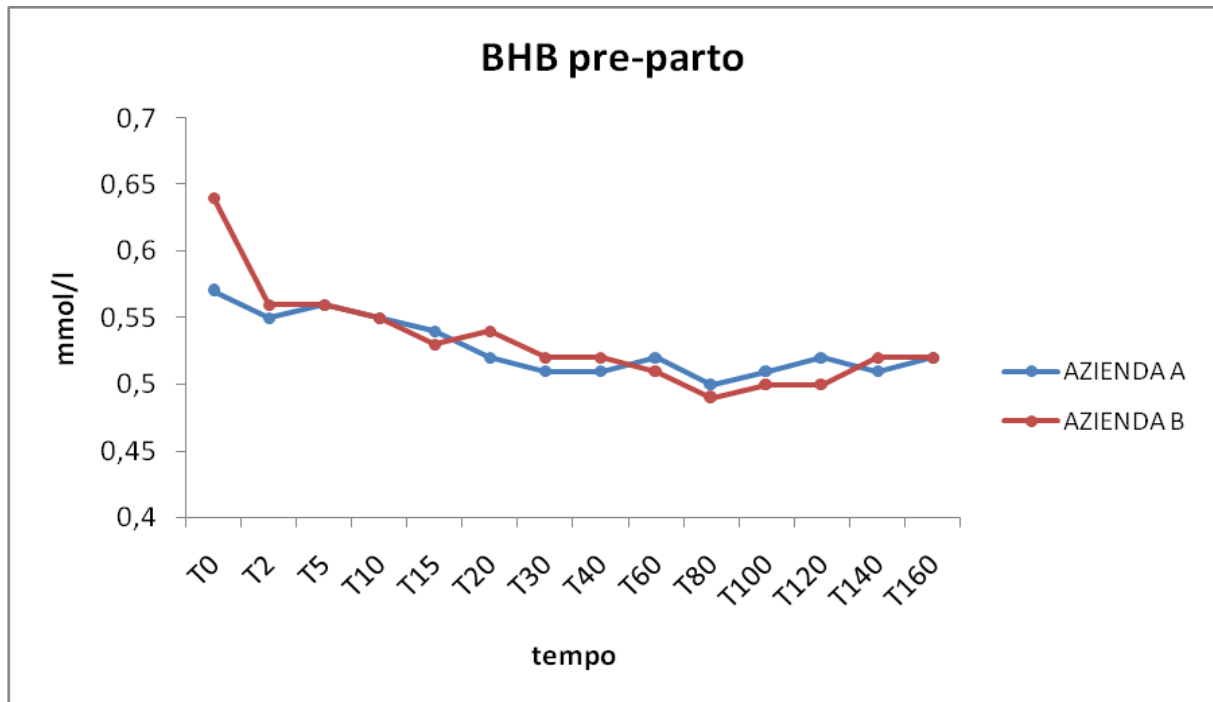
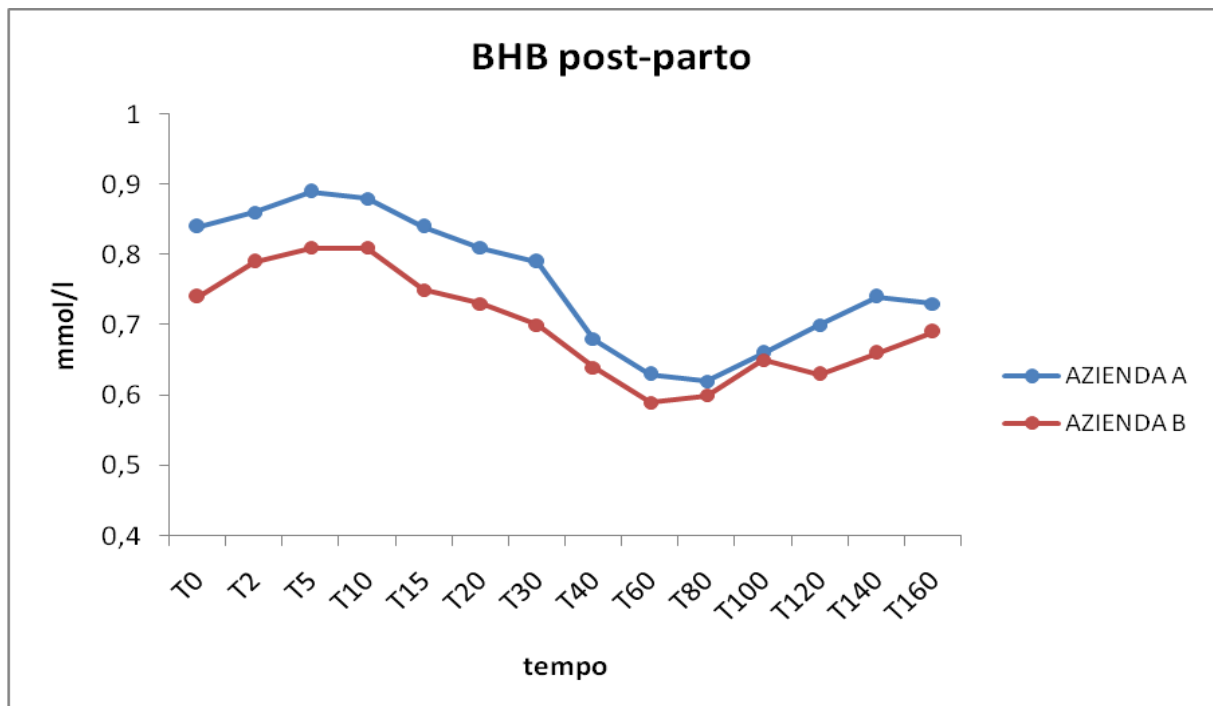


Grafico 12. Valori ematici del BHB nel periodo post-parto distinti tra le due aziende (azienda A vs azienda B).



Per tutti i parametri (glucosio, insulina, NEFA e BHB) è stata calcolata l'AUC (Area Under Curve). La tabella 7 mostra i valori di AUC totale del glucosio, espressa in mmol/l,

dell'insulina, espressa in pmol/l, dei NEFA, espressa in mEq/l e del BHB, espressa in mmol/l.

La tabella 8, invece, mostra i valori di AUC unitaria per minuto relativa agli stessi parametri.

Sia per quanto concerne l'AUC totale che unitaria, i valori relativi al glucosio e all'insulina sono risultati più elevati nel periodo pre-parto, mentre i valori relativi a NEFA e BHB si sono dimostrati essere maggiori nel periodo post-parto.

Tabella 7. Valori medi di AUC (Area Under Curve) totale±deviazione standard di glucosio, insulina, NEFA e BHB nel periodo pre-parto e nel periodo post-parto.

	AUC TOTALE GLUCOSIO (mmol/l)	AUC TOTALE INSULINA (pmol/l)	AUC TOTALE NEFA (mEq/l)	AUC TOTALE BHB (mmol/l)
PRE-PARTO	795,74±76,68	26412,46±2532,21	30,99±2,79	82,71±9,31
POST-PARTO	752,06±80,22	13973,52±1381,47	102,47±8,63	109,54±11,57

Tabella 8. Valori medi di AUC (Area Under Curve) unitaria per minuto±deviazione standard di glucosio, insulina, NEFA e BHB nel periodo pre-parto e nel periodo post-parto.

	AUC UNITARIA GLUCOSIO ((mmol/l)/minuto)	AUC UNITARIA INSULINA ((pmol/l)/minuto)	AUC UNITARIA NEFA ((mEq/l)/minuto)	AUC UNITARIA BHB ((mmol/l)/minuto)
PRE-PARTO	4,97±0,51	165,08±1,72	0,19±0,02	0,52±0,05
POST-PARTO	4,70±0,35	87,33±7,45	0,64±0,08	0,68±0,07

Al fine di evidenziare una corrispondenza tra la comparsa di patologie nel post-parto e alcuni dei parametri ematici nel periodo pre-parto, in tabella 9 sono riportati gli indici di correlazione tra glucosio, NEFA e BHB a varie tempistiche (T0, T80 e T160) e l'incidenza di mastite, metrite, collasso puerperale e zoppia. Tutte le correlazioni riportate sono risultate essere statisticamente significative. Inoltre sono risultate tutte positive, a eccezione della correlazione tra metrite e glucosio a T160, che si è mostrata essere negativa.

Tabella 9. Correlazioni di Pearson statisticamente significative ($P<0,05$) tra alcuni dei parametri ematici nel pre-parto a diverse tempistiche e l'incidenza di alcune delle patologie del periparto rilevate nel periodo post-parto.

TEMPISTICA	PARAMETRO	PATOLOGIA	INDICE DI CORRELAZIONE	P
T0	glucosio campo	mastite	+0,556	<0,001
	glucosio	zoppia	+0,595	<0,001
T80	NEFA	collasso puerperale	+0,312	0,04
	glucosio campo	mastite	+0,556	<0,001
T160	glucosio	metrite	-0,362	0,01
	BHB	mastite	+0,536	<0,001

Tabella 10. Percentuali dei dati clinici e Media \pm deviazione standard dei valori di BCS e dei dati produttivi riscontrati nel periodo del post-parto nell'azienda A e nell'azienda B.

PARAMETRI		AZIENDA A	AZIENDA B
BCS	PRE-PARTO	3,32 \pm 0,07	3,29 \pm 0,12
	POST-PARTO	3,03 \pm 0,43	3,06 \pm 0,28
RITENZIONE PLACENTA		27% a	1% b
METRITE		7%	9%
DISTOCIA		13%	1%
MASTITE		0%	8%
COLLASSO PUERPERALE		7%	1%
ZOPPIA		0%	8%
PRODUZIONE (kg/giorno)		35,29 \pm 2,21	32,47 \pm 3,02
CELL SOMATICHE (*1000/ml)		581,267 \pm 1156,50	323,167 \pm 697,931
GRASSO %		3,38 \pm 0,54b	4,22 \pm 0,70a
PROTEINE %		3,41 \pm 0,49	3,37 \pm 0,33

a,b: lettere diverse sulla stessa riga indicano differenze statisticamente significative ($P<0,05$).

I dati clinici e produttivi rilevati dopo il parto sono riportati in tabella 10 distinti all'interno delle due aziende, così come anche il valore del BCS determinato sia nel periodo del pre-parto che in quello del post-parto.

Prendendo in considerazione le patologie, solo per quanto riguarda la ritenzione della placenta è stata riscontrata una differenza significativa tra l'azienda A ($0,27 \pm 0,45$) e l'azienda B ($0,001 \pm 0,01$), anche se si sono evidenziate comunque differenze anche nella comparsa di distocia, mastite, collasso puerperale, metrite e zoppia, se pur non significative.

Il BCS ha mostrato valori più alti nel periodo del pre-parto rispetto a quello del post-parto, all'interno di entrambe le aziende.

Per quanto concerne i dati produttivi a livello di percentuale di grasso del latte è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa tra le due aziende. La media per capo di produzione latte, la percentuale di proteine e il numero di cellule somatiche non hanno mostrato differenze rilevanti.

Il grafico 13 mostra la suddivisione delle 40 bovine oggetto di studio in base al grado di infiltrazione lipidica epatocitaria, divise in grado 1, 2 e 3 secondo la gravità della lipidosi.

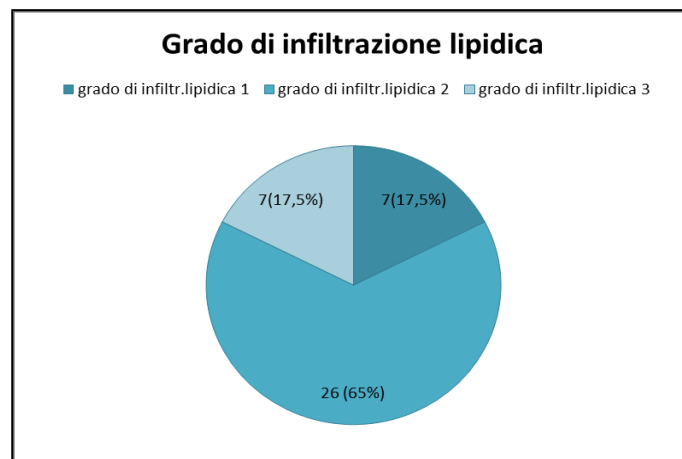


Grafico 13: Suddivisione delle bovine secondo il grado di infiltrazione lipidica epatica

Il grafico 14 rappresenta la suddivisione degli animali in base all'infiltrazione infiammatoria del parenchima epatico, suddivise in grado 0, 1 e 2 secondo il grado di interessamento.

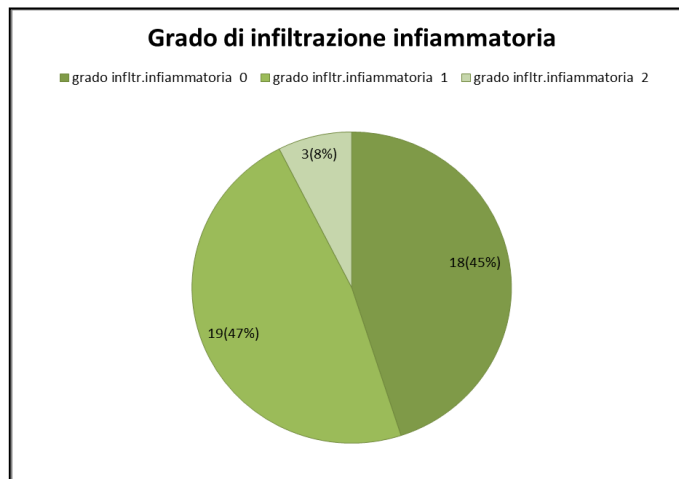


Grafico 14: Suddivisione delle bovine secondo il grado di infiltrazione infiammatoria del parenchima epatico.

Per quanto riguarda i parametri ematici, sono qui di seguito rappresentati in tabella 10 quelli direttamente correlati con l'infiltrazione lipidica ed infiammatoria degli epatociti, distinti in base al periodo pre e post parto e secondo soglie che li distinguono in animali sani e patologici, secondo quanto riportato in letteratura da Radostis (Radostis et al., 2007).

Inoltre, mostra le percentuali di animali con valori di BHB, NEFA, GOT, PT, globuline, nelle bovine in fase pre e post parto inferiori o superiori ai range di riferimento.

Tabella 10: Media \pm deviazione standard dei parametri ematobiochimici e valori statisticamente significativi riscontrati nell' Azienda A e Azienda B in funzione del Periodo. Percentuale di animali con valori di BHB, NEFA, Prot. Totali, Albumine, Globuline, Glucosio, Urea, AST, ALT, Ca, Na, Cl, K, Mg e P superiori ai ranges fisiologici di riferimento nel periodo del pre e post partum.

Parametri	Pre - Partum				Post - Partum			
	Azienda A	Azienda B	Range di riferimento	%animali con valori > range	Azienda A	Azienda B	Range di riferimento	%animali con valori > range
BHB (mmol/l)	0.57 \pm 0,12	0.64 \pm 0,31	0.6 mmol/l	57 %	0,84 \pm 0,45 [▲]	0,74 \pm 0,24	1,1 mmol/l	85 %
NEFA (mEq/l)	0,16 \pm 0,11	0,28 \pm 0,34	0.4 mEq/l	92%	0,81 \pm 0,40 [▲]	0,77 \pm 0,86 [▲]	0.6 mEq/l	70 %
Prot.Tot (g/dl)	6.81 \pm 0.72	6.76 \pm 0.46	5.9-7.7 g/l	45%	7.07 \pm 0.70	6.60 \pm 0.76	5.9-7.7 g/l	55 %
Albumine (g/dl)	3.30 \pm 0.18	3.22 \pm 0.16	2.7-4.3 g/dl	/	3.38 \pm 0.14	3.30 \pm 0.25	2.7-4.3 g/dl	/
Globuline (g/dl)	3.51 \pm 0.70	3.54 \pm 0.46	3.2-3.4 g/dl	78 %	3.69 \pm 0.71	3.30 \pm 0.71	3.2-3.4 g/dl	75 %
Glucosio (mmol/l)	80.13 \pm 6.75	80.84 \pm 6.06	45-85 mmol/l	/	75.55 \pm 8.08 [▲]	75.83 \pm 11 [▲]	45-85 mmol/l	/
Urea (mmol/l)	22.65 \pm 8.48	26.55 \pm 5.17	35 mmol/l	/	15.34 \pm 4.51 [▲]	21.43 \pm 5.6 [▲]	35 mmol/l	/
AST/GOT (U/l)	78.40 \pm 10.1	89.25 \pm 16.04	48-90 U/l	65 %	118.25 \pm 21 [▲]	114.3 \pm 25 [▲]	48-90 U/l	90 %
ALT/GPT (U/l)	21.29 \pm 7.03	18.21 \pm 5.75	17-37 U/l	/	19.82 \pm 5.40 [▲]	14.43 \pm 6 [▲]	17-37 U/l	/
Ca (mg/dl)	10.92 \pm 0.50	10.92 \pm 0.82	9-12 mg/dl	/	9.97 \pm 0.69 [▲]	9.89 \pm 1.43 [▲]	9-12 mg/dl	/
Na (mmol/l)	139.25 \pm 3.58	139.38 \pm 1.27	130-140mmol/l	/	140.75 \pm 3.68	139.73 \pm 3.0	130-140mmol/l	/
Cl (mmol/l)	105.38 \pm 7.5	106.65 \pm 13	90-104 mmol/l	/	98.55 \pm 3.24 [▲]	95.12 \pm 5.8 [▲]	90-104 mmol/l	/
K (mmol/l)	4.60 \pm 0.44	4.51 \pm 0.42	3.9-5.3 mmol/l	/	4.25 \pm 0.53 [▲]	4.02 \pm 0.6 [▲]	3.9-5.3 mmol/l	/
Mg (mg/dl)	2.72 \pm 0.49	2.57 \pm 0.19	2.2-2.7 mg/dl	/	2.62 \pm 0.41	2.32 \pm 0.65	2.2-2.7 mg/dl	/
P (mg/dl)	5.65 \pm 1.24	7.12 \pm 0.88	4-7 mg/dl	/	5.72 \pm 1.06	6.14 \pm 2.02	4-7 mg/dl	/

Significatività: [▲] Vs Pre-partum (effetto periodo: p<0.05)

Dai campioni ottenuti dalle 40 bovine oggetto di studio, sono poi state valutate le relazioni tra danno epatico provocato dall'infiltrazione lipidica e dall'infiltrazione infiammatoria e i parametri quali BHB, NEFA, GOT, PT, globuline e punteggio di BCS.

Nei grafici seguenti, dal numero 15 al numero 20, sono riportate le relazioni tra infiltrazione lipidica ed infiammatoria e i parametri sopra citati e al punteggio di BCS, considerando il periodo pre parto (7 ± 5 gg) e post parto (7 ± 5 gg).

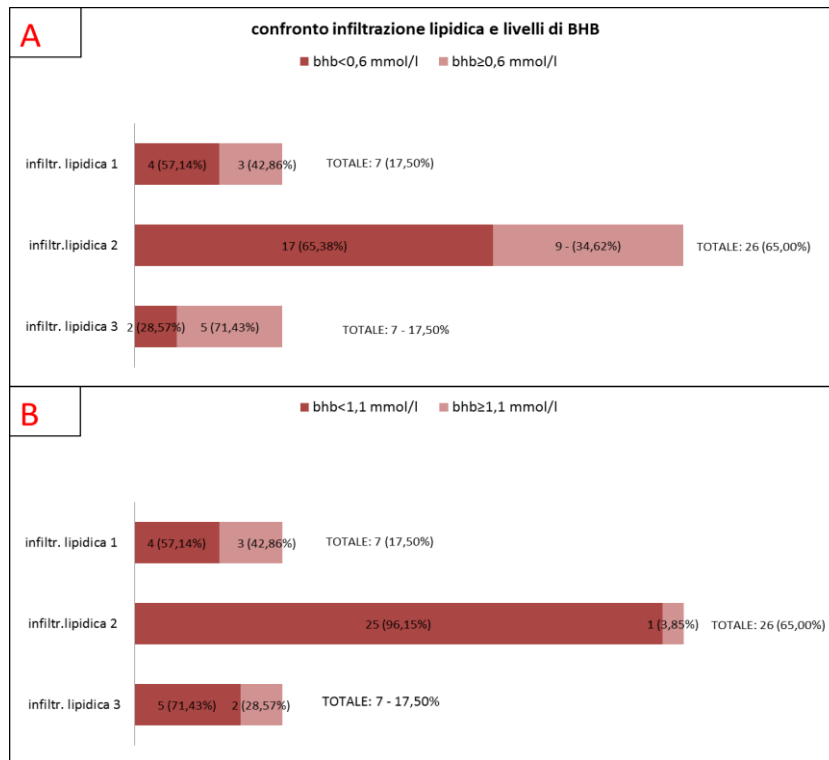


Grafico 15: Confronto tra gradi di infiltrazione lipidica e livelli di BHB nelle bovine nel pre parto (A) e nel post parto (B).

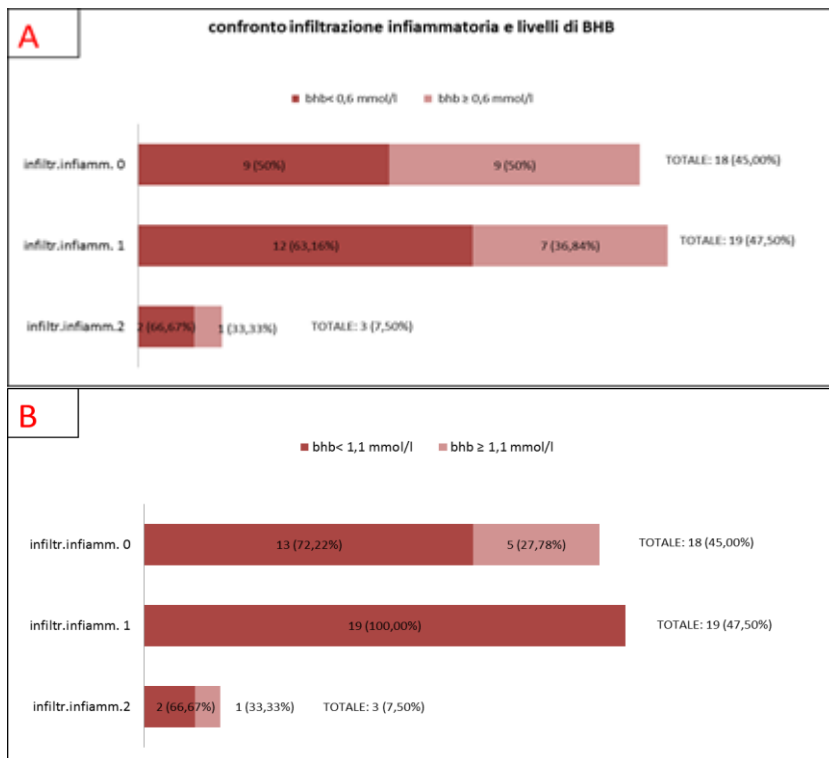


Grafico 16: Confronto tra gradi di infiltrazione infiammatoria e livelli di BHB nelle bovine in fase pre parto (A) e post parto (B).

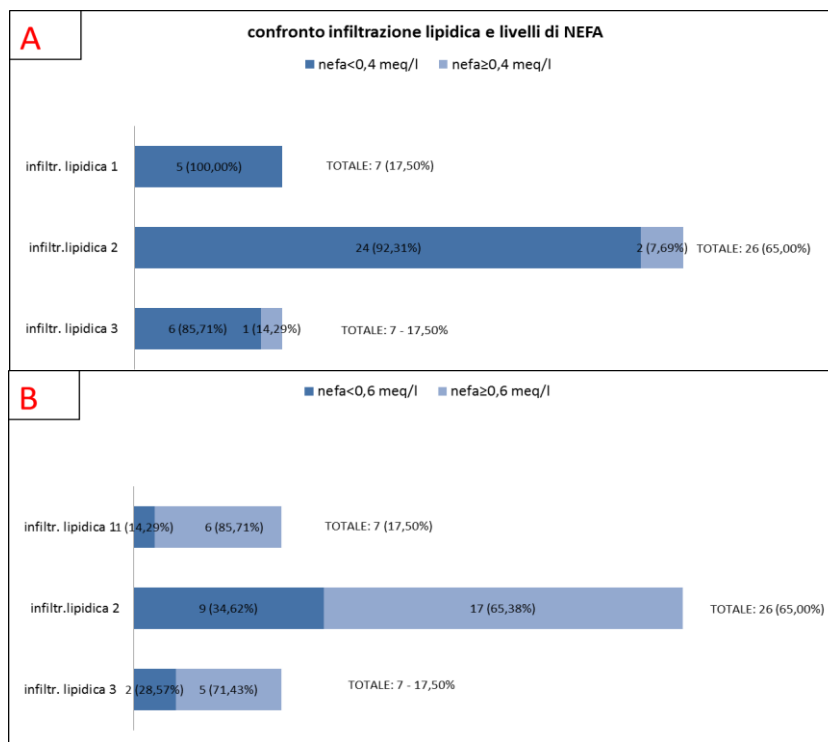


Grafico 17: Confronto tra gradi di infiltrazione lipidica e livelli di NEFA nelle bovine in fase pre parto (A) e post parto (B).

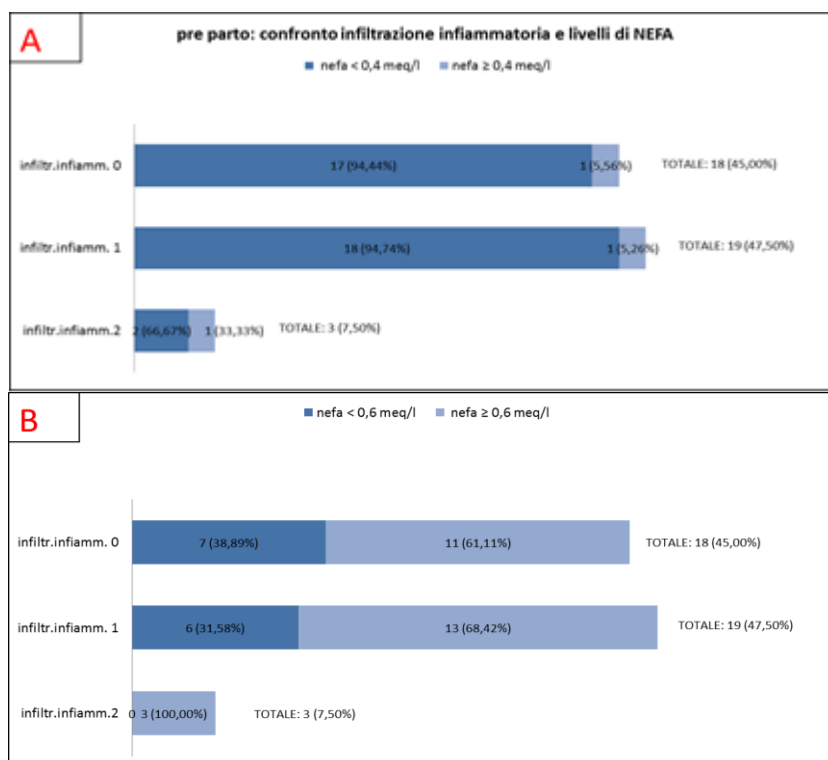


Grafico 18: Confronto tra gradi di infiltrazione infiammatoria e livelli di NEFA nelle bovine in fase pre parto (A) e post parto (B).

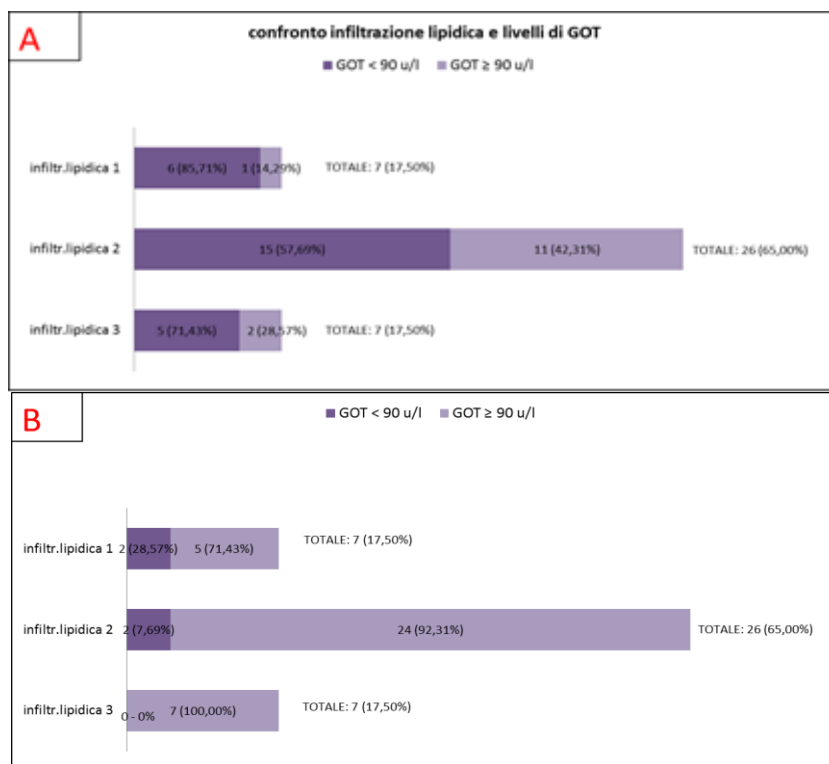


Grafico 19: Confronto tra gradi di infiltrazione lipidica e livelli di GOT nelle bovine in fase pre parto (A) e post parto (B).

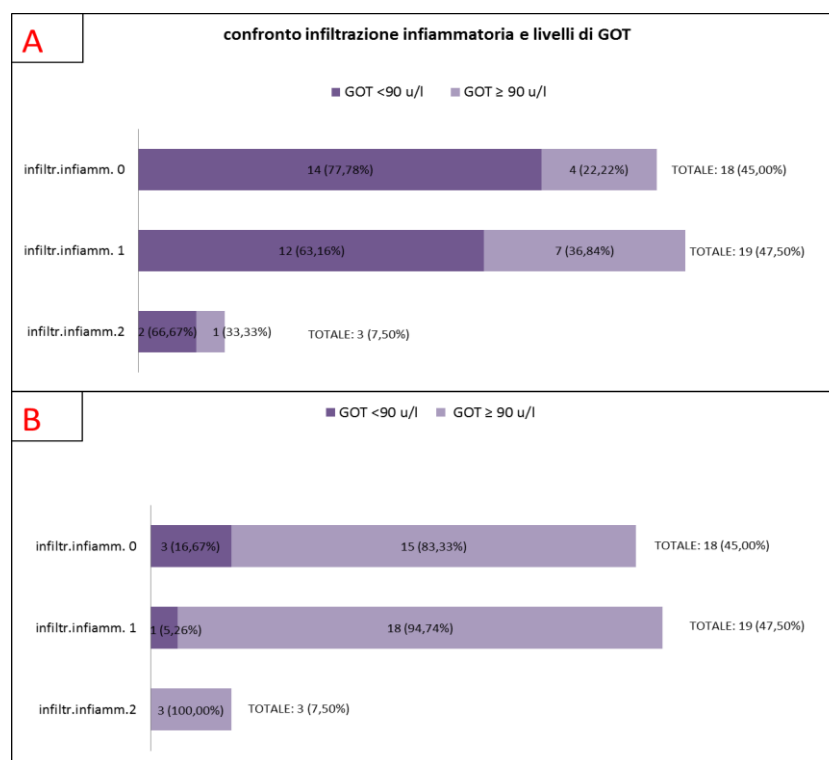


Grafico 20: Confronto tra gradi di infiltrazione infiammatoria e livelli di GOT nelle bovine in fase pre parto (A) e post parto (B).

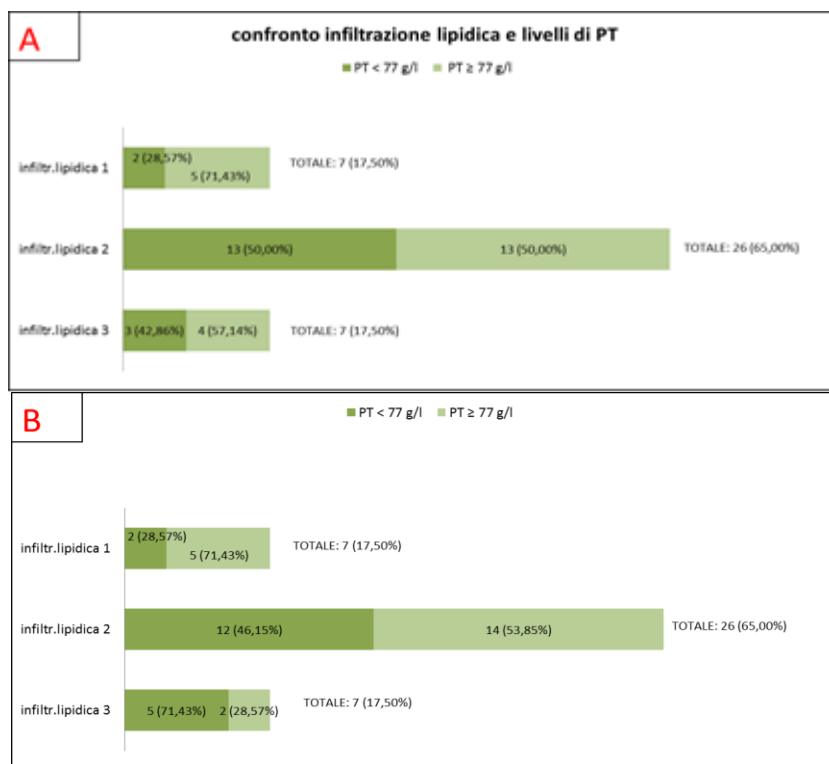


Grafico 21: Confronto tra gradi di infiltrazione lipidica e livelli di PT nelle bovine in fase pre parto (A) e post parto (B).

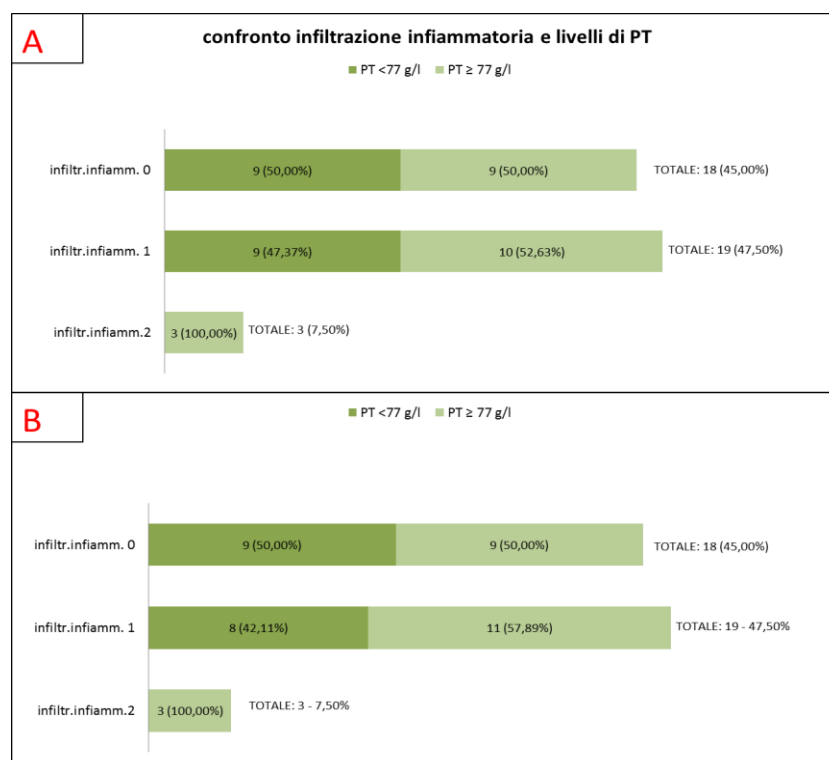


Grafico 22: Confronto tra gradi di infiltrazione infiammatoria e livelli di PT nelle bovine in fase pre parto (A) e post parto (B).

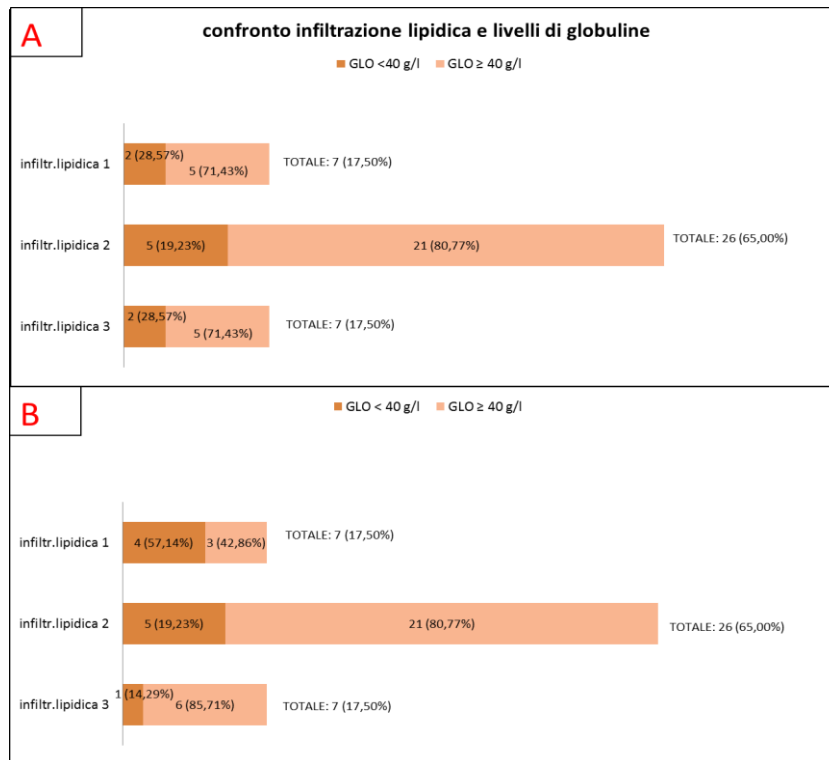


Grafico 23: Confronto tra gradi di infiltrazione lipidica e livelli di globuline nelle bovine in fase pre parto (A) e post parto (B).

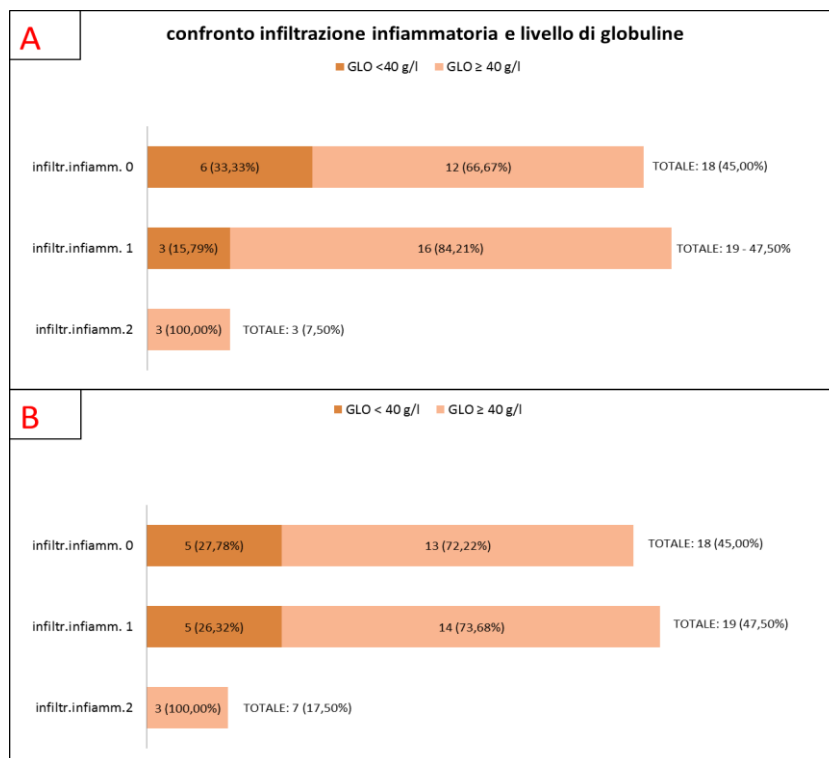


Grafico 24: Confronto tra gradi di infiltrazione infiammatoria e livelli di globuline nelle bovine in fase pre parto (A) e post parto (B).

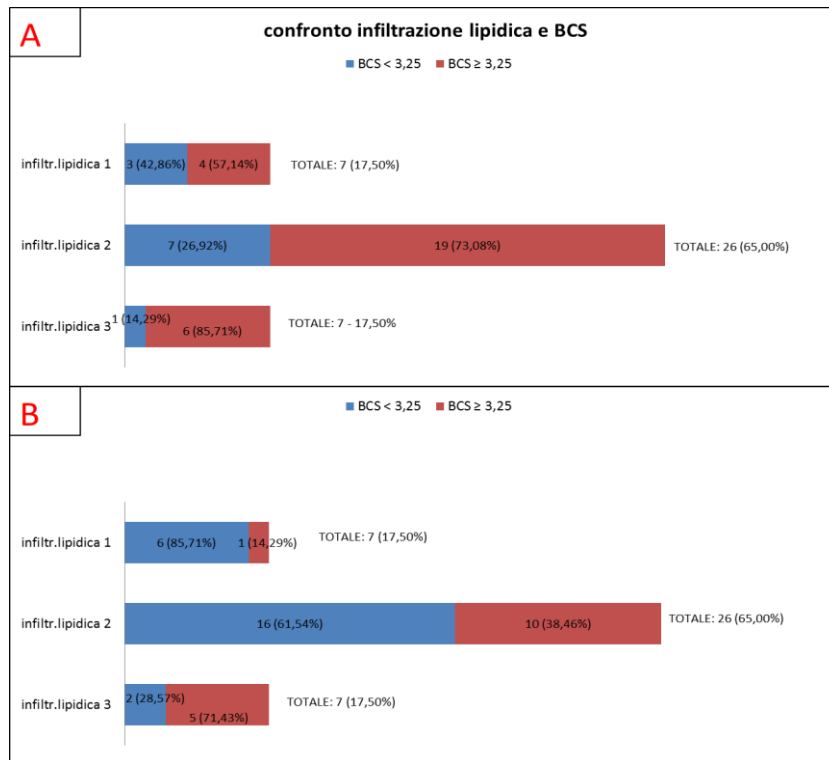


Grafico 25: Confronto tra gradi di infiltrazione lipidica e punteggio di BCS nelle bovine in fase pre parto (A) e post parto (B).

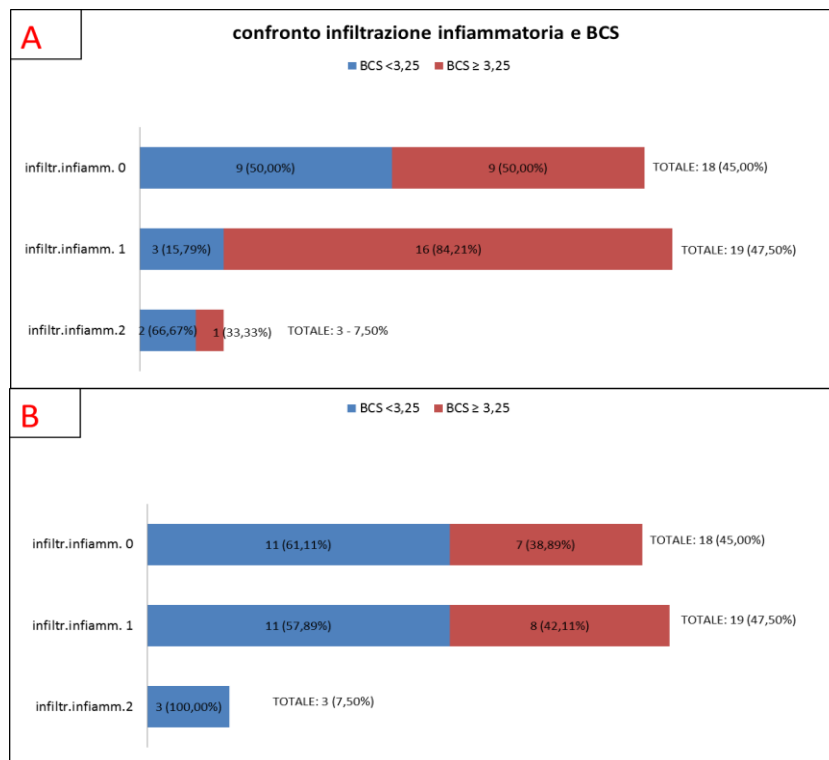


Grafico 26: Confronto tra gradi di infiltrazione infiammatoria e punteggio di BCS nelle bovine in fase pre parto (A) e post parto (B).

Per valutare una corrispondenza tra steatosi epatica e parametri ematici, sono state valutate le correlazioni tra indicatori di danno epatico, come l'infiltrazione lipidica epatocitaria e GOT, e valori di BHB, urea, PT e GTP com'è apprezzabile dalla tabella 11.

PARAMETRI		INDICE DI CORRELAZIONE	P
Grado infiltrazione lipidica	NEFA pre parto	+0,313	0,049
Grado infiltrazione lipidica	GTP pre parto	-0,376	0,049
Grado infiltrazione lipidica	PT post parto	+0,319	0,044
Grado infiltrazione lipidica	Urea post parto	-0,383	0,014
GOT pre parto	BHB pre parto	-0,309	0,05

Tabella 11: Correlazioni di Pearson statisticamente significative ($P < 0,05$) tra alcuni dei parametri epatici rilevati nel pre parto ed ematici rilevati nel pre e nel post parto.

7.DISCUSSIONI

7.1. RISPOSTA METABOLICA AL TEST DA CARICO DEL GLUCOSIO

Monitorando l'andamento di parametri ematici quali glicemia, NEFA, BHB e insulina in risposta al test da carico di glucosio si è notato che il periodo di transizione è un momento cruciale nella vita produttiva della vacca da latte ed è proprio in questo periodo che si decide la carriera produttiva e riproduttiva dell'animale.

La prova è stata effettuata su 40 bovine da latte di razza Frisona ad alta produzione sia prima del parto, che dopo il parto. La procedura prevista per l'effettuazione del test da carico, già descritta in precedenza, ha presentato degli svantaggi quali la durata dell'intervento e il numero dei prelievi. Per ovviare almeno in parte a questo problema, è risultato utile slegare l'animale, mantenerlo comunque in cattura ed effettuare di volta in volta il contenimento, almeno quando il tempo tra un prelievo e l'altro lo ha permesso.

Sulla base dei risultati ottenuti possiamo affermare che negli animali esaminati vi è stata una variazione nel profilo del metabolismo energetico in seguito a somministrazione del carico di glucosio e che questa alterazione ha presentato differenze tra i due periodi oggetto dello studio (pre-parto e post-parto).

Per quanto concerne la glicemia, i valori basali misurati prima della somministrazione di glucosio sia in campo (T0 campo) che con successive analisi di laboratorio (T0) sono risultati essere più elevati nel pre-parto ($2,90 \pm 0,37$ per T0 campo e $3,79 \pm 0,59$ per T0) che non nel post-parto ($2,46 \pm 0,40$ per T0 campo e $3,37 \pm 0,93$ per T0). La differenza è risultata essere statisticamente significativa ($P < 0,05$).

I valori di glucosio riscontrati nelle diverse tempistiche successivamente al test da carico si sono mantenuti più elevati nel periodo del pre-parto rispetto a quello del post-parto, come è possibile notare dalla tabella 7, in cui l'area sotto la curva nel periodo del pre-parto ($795,74 \pm 76,68$) è risultata maggiore rispetto a quella relativa al periodo del post-parto ($752,06 \pm 80,22$). Inoltre, è possibile osservare in tabella 3, che per alcune delle tempistiche

(T60, T80, T100, T120, T140, T160) le differenze sono risultate statisticamente significative ($P < 0,05$).

Questi dati riflettono quanto già confermato da altri studi (Drackley, 1999; Zhao and Keating, 2007), per cui nel periodo del parto e soprattutto nei primi giorni dopo il parto, in cui le richieste energetiche subiscono un aumento consistente, l'utilizzo del glucosio come fonte di energia viene deviato principalmente verso tessuti non insulino dipendenti, quali la ghiandola mammaria per la produzione di latte.

L'insulina sappiamo avere un ruolo chiave nel metabolismo energetico, essendo uno dei principali ormoni coinvolti nella regolazione della glicemia. I valori ematici di insulina a T0 non mostrano differenze tra i periodi: sia nel pre-parto che nel post-parto sono risultati essere $< 14,35$ e questo è dovuto al fatto che la metodica utilizzata per il dosaggio dell'insulina, rileva valori solo al di sotto di tale soglia. I valori dell'insulina in risposta al carico di glucosio, invece, sono risultati più bassi nel post-parto, a conferma di ciò che era emerso da altri studi: dal momento del parto la bovina, come avviene anche negli altri mammiferi, sviluppa un certo grado di insulino resistenza e la sua concentrazione ematica tende a diminuire (Holtenius 2003; Péré et al., 2000). Questo meccanismo inibisce l'utilizzo del glucosio a livello dei tessuti insulino dipendenti, come muscolo e tessuto adiposo e ciò consente all'animale di risparmiare glucosio e di indirizzarlo alla mammella. In questa indagine è stato quindi evidenziato che, nel periodo che va da pochi giorni prima del parto a pochi giorni dopo il parto, diminuisce la capacità di risposta dell'insulina al glucosio, in accordo con ciò che è stato osservato in letteratura. La diminuzione della risposta dell'insulina alla somministrazione di glucosio osservata nel post-parto può essere spiegata come una diminuita capacità di risposta delle cellule β pancreatiche ad uno stato di iperglicemia, causata da fattori che inibiscono il rilascio di insulina, quali i NEFA o il GH, i cui valori sono più elevati nel post-parto. Anche l'area sotto la curva (AUC) totale dell'insulina risulta nettamente maggiore per quanto riguarda il periodo del pre-parto ($26412,46 \pm 2532,21$) rispetto al valore riscontrato per il post-parto ($13973,52 \pm 1381,47$), come si può osservare in tabella 7.

L'aumento nella richiesta di energia appena dopo il parto si accompagna a una diminuzione di assunzione di sostanza secca da parte della bovina, che quindi si trova a dover far fronte a

uno stato di bilancio energetico negativo. Il bilancio energetico negativo costringe la bovina ad attingere alle proprie riserve corporee per la produzione di energia necessaria ai suoi fabbisogni; questo induce un processo di lipomobilizzazione, favorito anche da una minor concentrazione di insulina plasmatica. L'utilizzo delle riserve adipose è mostrato dal fatto che il BCS (Body Condition Score) determinato nel periodo del pre-parto è risultato essere maggiore di quello determinato al momento del post-parto sia nell'azienda A ($3,32 \pm 0,07$ vs $3,03 \pm 0,43$) che nell'azienda B ($3,29 \pm 0,12$ vs $3,06 \pm 0,28$). Questa variazione della condizione corporea dell'animale va a confermare quanto già riportato in letteratura (Drakley et al., 2001).

La conseguenza diretta del processo di lipomobilizzazione è l'aumento del livello ematico dei NEFA. I NEFA sono considerati l'indice più affidabile nella valutazione dello stato energetico dell'animale, in quanto ci forniscono un'indicazione del grado di mobilizzazione dei lipidi. In questa prova abbiamo riscontrato un aumento marcato e statisticamente significativo dei valori di NEFA al momento del post-parto rispetto a quelli rilevati nel pre-parto. Questo si è verificato per tutte le tempistiche prese in considerazione e per entrambe le aziende oggetto dello studio, il che può suggerire l'assenza di un eventuale effetto azienda. I valori di NEFA ottenuti sono risultati più elevati nel periodo successivo al parto, sia a livello basale (T0) che in risposta alla somministrazione di glucosio. Inoltre, in entrambi i periodi i valori di NEFA hanno subito un calo iniziale in risposta al carico di glucosio, calo che è risultato essere più marcato nel periodo del post-parto, in cui il valore più elevato è stato raggiunto a T5 ($0,86 \pm 0,40$) e quello minore a T60 ($0,42 \pm 0,26$); a tempistiche successive invece, si è riscontrato un progressivo innalzamento dei valori, che sono tornati a eguagliare quelli iniziali ($0,81 \pm 0,41$ a T160 e $0,79 \pm 0,56$ a T0 nel post-parto), nello stesso tempo in cui parallelamente i valori della glicemia hanno subito un calo progressivo. Questo suggerisce l'esistenza di una correlazione negativa tra NEFA e glicemia e confermerebbe l'ipotesi che in condizioni di bilancio energetico positivo (instaurato dal bolo di glucosio fornito) diminuisce la mobilizzazione dal tessuto adiposo di acidi grassi. In altre parole, i risultati ottenuti comprovano il ruolo chiave del bilancio energetico negativo come fattore importante nel favorire la lipomobilizzazione e si trovano in accordo con ciò che già Bell (1995) aveva dimostrato in uno studio, per cui a partire dall'ultimo periodo di gravidanza diminuisce

l'utilizzo del glucosio da parte dei tessuti periferici, aumenta la mobilizzazione di NEFA dal tessuto adiposo e il loro metabolismo epatico.

Se i NEFA indicano il grado di mobilizzazione lipidica, il beta-idrossibutirrato (BHB) ci dà informazioni riguardo il grado di ossidazione dei lipidi e della capacità del fegato di ossidarli; entrambi questi parametri (NEFA e BHB) rispecchiano la capacità della bovina di adattarsi al bilancio energetico negativo. Come è possibile osservare in tabella 7, i valori di BHB ottenuti in questo studio, al pari dei NEFA, sono più elevati nel periodo successivo al parto, sia a livello basale (T0) che in risposta alla somministrazione del carico di glucosio. Questa differenza è possibile osservarla anche in tabella 7, che riporta le AUC dei diversi parametri; per quanto concerne il BHB infatti il valore nel post-parto ($109,54 \pm 11,57$) è risultato più elevato di quello nel pre-parto ($82,71 \pm 9,31$). In particolare, a livello delle singole aziende, solo nell'azienda A la differenza tra i valori pre-parto e post-parto si è dimostrata statisticamente significativa per tutte le tempistiche. Nell'azienda B invece solo a T5 e T10 si sono riscontrate differenze significative tra i due periodi (rispettivamente $0,56 \pm 0,25$ e $0,55 \pm 0,25$ nel pre-parto mentre $0,81 \pm 0,30$ e $0,81 \pm 0,31$ nel post-parto). Questo potrebbe essere dovuto a una differenza tra i due allevamenti nella gestione delle bovine durante il periodo di transizione. Si sa infatti che per prevenire lo sviluppo della chetosi (ovvero di un aumento di BHB e di altri corpi chetonici nel sangue) è fondamentale una corretta gestione delle bovine dal punto di vista nutrizionale. In particolare risulta importante garantire alla bovina il giusto apporto di carboidrati fermentescibili che, attraverso la sintesi di propionato a livello ruminale, forniscono le molecole intermedie del ciclo di Krebs e permettono quindi la perpetuazione del ciclo stesso, evitando la formazione dei corpi chetonici, primo tra tutti il BHB. L'andamento del BHB è simile a quello dei NEFA, in quanto, come già è stato dimostrato, ad un aumento di questi ultimi consegue un aumento della chetogenesi negli epatociti (Cadorniga-Valiño et al., 1997).

Per quanto riguarda i dati clinici e produttivi rilevati nel periodo del post-parto, nella tabella 9 sono riportate alcune delle correlazioni individuate tra questi e alcuni valori relativi a parametri ematici riscontrati nel periodo del pre-parto. L'obiettivo è stato quello di valutare l'esistenza di un eventuale rapporto tra i dati ottenuti nel pre-parto circa i valori di glucosio, insulina, NEFA e BHB in risposta al test da carico e l'incidenza di alcune delle patologie più

frequenti che si sviluppano nei primi giorni di lattazione. Il collasso puerperale si è dimostrato essere correlato in maniera positiva con i valori di NEFA (+0,312) riscontrati a T80. All'aumentare dei valori ematici di NEFA è stato osservato, quindi, un aumento della comparsa del collasso puerperale. Dato che la concentrazione di NEFA rispecchia la capacità della bovina di adattarsi alle esigenze che caratterizzano il momento del parto, un aumento dei valori ematici di questo parametro indica uno stato di bilancio energetico negativo più marcato. Il disequilibrio nel metabolismo energetico che ne consegue favorisce quindi la comparsa delle patologie. A T160 l'indice di correlazione tra mastite e BHB è risultato positivo (+0,536). Si può supporre che negli animali che presentano la patologia sia presente un'alterazione del metabolismo che comporta una più rapida lipomobilizzazione con accumulo di metaboliti intermedi o una ridotta funzionalità epatica di clearance che risulta in una iperchetonemia. Lo squilibrio che viene a crearsi nel metabolismo energetico prima del parto, di cui è espressione l'aumento dei valori di BHB, ha quindi delle ripercussioni sullo stato di salute della bovina dopo il parto. I risultati ottenuti concordano, del resto, con studi già effettuati, in quanto è stato comprovato che la più alta incidenza di patologia da produzione si concentra nei primi 10 giorni dopo il parto (Ingvarsen et al., 2003) e che bovine con concentrazioni di BHB al di sopra di 1,0 o 1,4 mmol/l sono 3,2 e 4,3 volte più a rischio di malattie del parto (Van Saun, 2004). Anche la correlazione negativa tra la comparsa di metrite e i valori di glucosio a T160 portano alla stessa conclusione, in quanto valori minori di glicemia sono indicativi di un maggior deficit energetico. Questo però contrasta con il dato ottenuto analizzando la correlazione tra l'incidenza di zoppie e i valori della glicemia a T0; l'indice di correlazione in questo caso è risultato positivo (+0,595) e questo potrebbe essere dovuto al fatto che un animale con zoppia è descritto in letteratura come un animale tendente "all'appetito capriccioso".

Per quanto concerne l'incidenza di patologie nelle due aziende oggetto di studio, nella tabella 10 si può notare come la comparsa di metrite, mastite, collasso puerperale, zoppia, distocia e ritenzione placentare sia risultata diversa tra l'azienda A e l'azienda B. In particolare la differenza per quanto riguarda la ritenzione placentare è risultata statisticamente significativa ($0,27 \pm 0,45$ per l'azienda A e $0,001 \pm 0,01$ per l'azienda B). Questi dati possono essere giustificati dal fatto che nell'eziologia di queste malattie rivestono un

ruolo importante i fattori ambientali oltre che gestionali e manageriali adottati all'interno del singolo allevamento. Si può quindi affermare l'esistenza di un effetto azienda nel caso dell'incidenza di patologie del periparto.

Prendendo in considerazione i dati produttivi riportati sempre in tabella 10, l'unica differenza rilevante che è stata evidenziata tra le aziende riguarda la percentuale di grasso del latte che è risultata maggiore per l'azienda B ($4,22 \pm 0,70$) rispetto all'azienda A ($3,38 \pm 0,64$). Questo può essere spiegato in parte prendendo in esame la produzione media per capo, che è risultata essere minore per l'azienda B ($32,47 \pm 3,02$) rispetto all'azienda A ($35,29 \pm 2,21$); probabilmente la minor quantità di latte prodotto per capo nell'azienda B può essere la causa di una concentrazione di grasso più elevata.

7.2. VALUTAZIONE ISTOPATOLOGICA IN RELAZIONE AI PARAMETRI EMATICI

Nell'indagare in condizioni di campo la distribuzione e la gravità della lipidosi epatica e dell'infiltrazione infiammatoria del fegato nelle bovine in fase di transizione, più precisamente a 2 settimane dal parto, si è notato come le complicazioni a livello epatico compromettono lo stato clinico e produttivo nei primi giorni di lattazione.

L'oggetto del nostro studio sono stati i campioni bioptici epatici prelevati nel pre-parto conservati in formalina, giudicati idonei per essere esaminati e valutati, ed i campioni ematici, anch'essi prelevati nel pre-parto e anche 7 ± 5 giorni dopo il parto, conservati in modo corretto e sottoposti ad analisi.

Dopo aver inciso allo spessore di 3-4 μm i campioni bioptici ed averli colorati con ematossilina ed eosina (HE), sono stati analizzati, per ogni animale, 5 campi microscopici al microscopio ottico, assegnando punteggi in base all'infiltrazione lipidica epatocitaria.

È stato così riscontrato che su 40 bovine solo il 17,5 % presentavano lipidosi epatica lieve, con infiltrazione lipidica del parenchima epatico $< 30\%$, da epatociti caratterizzati principalmente da una lieve rarefazione idropica, mentre in pochi lobuli si è apprezzata assenza di lesioni. Mentre, il 65% del gruppo di studio presentava lipidosi da lieve a moderata con il parenchima epatico interessato per il 30-60% da infiltrazione lipidica, con lobuli caratterizzati per la gran parte da degenerazione idropica con marcata rarefazione citoplasmatica. Solo 7 bovine (17,5%) presentava lipidosi epatica moderata, con un coinvolgimento del parenchima maggiore del 60%, con lobuli presentanti piccoli vacuoli intra-citoplasmatici e marcata degenerazione idropica.

Per quanto riguarda l'infiltrazione infiammatoria del parenchima epatico, costituita soprattutto da cellule del Kupffer attivate e infiltrazioni di granulociti neutrofili, per il 45 % delle bovine non è stata riscontrata; il 47%, era presente in maniera lieve; e nell'8% una moderata infiammazione solo in 3 bovine (8%); assente una marcata infiltrazione infiammatoria.

Per quanto concerne le analisi svolte sui campioni ematici, sono state valutate le concentrazioni di BHB, NEFA, glucosio, albumine, globuline, GOT, GTP, proteine totali e urea.

Esaminando il BHB, tale parametro fornisce informazioni riguardo il grado di ossidazione dei lipidi e della capacità del fegato di ossidarli; le analisi di laboratorio riportano che il 57% degli animali presentano concentrazioni minori alle 0,6 mmol/l, il restante 43%, invece, presentava BHB pari o maggiore alla soglia. Di queste ultime, solo 2 bovine avevano valori pari a 1,15 mmol/l e 1,17 mmol/l e quindi solo questi animali dimostravano di avere una chetosi subclinica, secondo la soglia della chetosi subclinica che inizia dalla soglia delle 1,0-1,2 mmol/L (Andersson, 1984).

Facendo riferimento al grafico 15 si può apprezzare come nel pre-parto all'aumentare del grado di infiltrazione lipidica sembra corrispondere un aumento numero di bovine con livelli di BHB $\geq 0,6$ mmol/l.

Per quanto riguarda il periodo post parto, le bovine sono state divise secondo la soglia delle chetosi subcliniche pari a 1,1 mmol/l (come riportato da Radostis, 2007) e nella tabella 10 si può vedere come l'85% delle bovine siano al di sopra di tale soglia. Nel grafico 15 si può vedere come l'andamento riscontrato nel pre-parto non sia qui rispettato: il livello di BHB, infatti, non sembra essere correlato ad un aumento del grado di infiltrazione lipidica, come ci si dovrebbe aspettare.

Anche per quanto concerne l'infiltrazione infiammatoria, i livelli di BHB sembrano non esserne correlati, come si può apprezzare nel grafico 16, dove risulta che nel pre-parto le vacche con BHB $\geq 0,6$ mmol/l siano equamente suddivise tra le categorie di infiltrazione lipidica. Nel post-parto appare invece che la maggior parte delle bovine con BHB $\geq 1,1$ mmol/l (83,3%) sia concentrata nel gruppo di bovine con infiltrazione infiammatoria 0, ovvero assente.

Passando ad analizzare i NEFA, questi sono considerati l'indice più affidabile nella valutazione dello stato energetico dell'animale, in quanto forniscono un'indicazione del grado di mobilizzazione dei lipidi. Nella tabella 10 si può vedere come nel pre-parto il 92% (37) bovine presentino livelli di NEFA superiori ai 0,4 meq/l, quindi sembra sia rispettato l'andamento previsto per il pre-parto. Nel post parto invece, la situazione è radicalmente capovolta: il 70% delle bovine (28 capi) presenta livelli di NEFA $\geq 0,6$ meq/l, mentre solo il 12% resta sotto la soglia. Questo dimostra che nel post parto è presente una lipomobilizzazione imponente che esita, come si può vedere al grafico 17, in aumento dei

valori di NEFA indipendentemente dal grado di infiltrazione lipidica osservato nel pre-parto. Infatti, le vacche con livelli di NEFA $\geq 0,6$ meq/l sono distribuite equamente nei tre gruppi determinati dall'infiltrazione lipidica. Questo non accade, invece, se si osserva il rapporto dei NEFA con il grado di infiltrazione infiammatoria: come si vede al grafico 18, sembra che all'aumentare del grado di infiammazione epatica nel pre-parto, corrisponda un aumento delle concentrazioni di NEFA. Infatti le bovine con infiltrazione infiammatoria moderata, hanno tutte livelli di NEFA superiori alle 0,6 meq/l (una bovina di questo gruppo presentava concentrazioni di NEFA pari a 1,86 meq/l). Questo potrebbe essere giustificato dal fatto che elevate concentrazioni di NEFA e BHB compromettono le funzioni fisiologiche del fegato, a causa della loro tossicità e per i loro effetti metabolici (Cardòniga –Valino et al., 1997).

Prendendo in considerazione l'aspartato aminotrasferasi (GOT), esso è un enzima presente principalmente nel tessuto epatico e muscolare, ed è localizzato prevalentemente a livello mitocondriale. La sua concentrazione ematica aumenta in caso di danno (reversibile o irreversibile) sia epatico che muscolare.

Dalla tabella 10 si può apprezzare come già nel pre-parto, il 35% delle bovine esaminate (14 capi), presenti livelli di GOT ≥ 90 u/l, confermando così il dato relativo all'infiltrazione infiammatoria a livello di parenchima epatico (visibile al grafico 2), poichè il GOT aumenta in caso di danno epatico dovuto a stati infiammatori. Infatti nel post-parto, ben il 90% delle vacche presenta livelli di GOT ≥ 90 u/l, dimostrando che il danno epatico è presente e che bovine che nel pre-parto presentavano lipidosi epatica moderata, sembrano essere le più soggette ad un innalzamento dei livelli di GOT nel post-parto.

Ancor più evidente è la correlazione tra stato infiammatorio del fegato nel pre parto e livelli di GOT nel post parto: al grafico 19, si vede come le bovine con livelli di GOT superiori alla soglia delle 90 u/l, siano tutte concentrate nei gruppi con infiammazione epatica lieve e moderata. Quindi la concentrazione della GOT nel pre parto sembra essere un buon indicatore predittivo di lipidosi epatica e di infiltrazione infiammatoria del parenchima; infatti ad alti livelli dell'enzima nel pre parto, sembra corrisponderne un aumento vertiginoso nel post parto, dovuto ad accumulo di trigliceridi a livello epatocitario per gli alti livelli di NEFA circolanti, che vanno, inoltre, a compromettere la funzionalità del fegato a causa della loro tossicità.

Passando ad esaminare il profilo proteico, prendiamo in considerazione inizialmente le Proteine Totali: esse sono macromolecole costituite da aminoacidi e sono componenti fondamentali di ogni cellula o tessuto. La quantità totale è data da due classi proteiche principali: albumina e globuline. La concentrazione varia in relazione al contenuto proteico della razione, in relazione al funzionamento epatico e renale (produzione/perdita di albumina) e allo stato immunitario generale (globuline).

Nella tabella 10 si può notare come, nel pre parto, il 55% delle bovine presenti valori superiori ai 77 g/l, indicati come soglia fisiologica. Nel post parto, si mantengono le stesse quote individuate nel pre parto: il 53% degli animali sono oltre la soglia di proteine totali. Questo è un dato in contro tendenza rispetto a ciò che avviene normalmente: infatti, si prevede una diminuzione dopo il parto per aumento del fabbisogno proteico durante la lattazione. Al grafico 22 si può notare come, sia nel pre che nel post parto, ad un aumento del grado di infiltrazione infiammatoria del parenchima epatico, corrisponda un aumento della quota di bovine con concentrazione di PT \geq 77 g/l, tanto che tutte le bovine con livelli di infiammazione epatica moderata presentano PT sopra la soglia. Dal grafico 21 sembra, però, che le PT non siano correlate con il grado di infiltrazione lipidica: infatti sembra che le bovine con PT \geq 77 g/l sia nel pre che nel post parto siano distribuite uniformemente tra i gruppi con vari gradi di steatosi.

Prendendo in considerazione le globuline, queste rappresentano un'importante componente delle proteine totali sono rappresentate da enzimi, anticorpi e molte altre proteine e vengono suddivise in frazioni alfa, beta e gamma. Sono responsabili della risposta infiammatoria e immunitaria umorale sistemica e mucosale.

Sempre nella Tabella 10 è possibile vedere come già nel pre parto ben il 78% delle vacche presentasse livelli di globuline oltre la soglia dei 40 g/l, per poi abbassarsi leggermente 75% nel post parto.

Contrariamente al loro comportamento previsto nel pre parto, ovvero dovrebbero abbassarsi, nella nostra prova abbiamo rilevato una contro tendenza. Anch'esse provano l'esistenza di uno stato infiammatorio e sono chiaramente correlate al grado di infiltrazione infiammatoria a livello epatico, com'è apprezzabile dal grafico 23, sia nel pre che nel post parto. Sembrano, invece, essere indipendenti dal grado di infiltrazione lipidica perché le

bovine con globuline ≥ 40 g/l sono distribuite uniformemente tra i gruppi con vari gradi di steatosi sia nel pre che nel post parto.

Infine è stato esaminato il BCS per ogni bovina: l'aumento nella richiesta di energia appena dopo il parto si accompagna a una diminuzione di assunzione di sostanza secca da parte della bovina, che quindi si trova a dover far fronte a uno stato di bilancio energetico negativo. Il bilancio energetico negativo costringe la bovina ad attingere alle proprie riserve corporee per la produzione di energia necessaria ai suoi fabbisogni; questo induce un processo di lipomobilizzazione.

L'utilizzo delle riserve adipose è mostrato dal fatto che il BCS determinato nel periodo del pre-parto è risultato essere maggiore di quello determinato al momento del post-parto: si può vedere nella tabella 10 nel pre partum la media del BCS è pari a 3,25 punti o più. Dopo 15 giorni dal parto il BCS diminuisce a un punteggio pari o inferiore a 3,0. Andando ad osservare i confronti nel grafico 23, si può vedere come all'aumentare del grado di infiltrazione lipidica corrisponda un aumento del numero di bovine con BCS $\geq 3,25$, sia nel pre che nel post parto. Questo sembra significare che le bovine più grasse abbiano anche maggiori difficoltà nel ossidare i NEFA e che sia maggiore la quota di questi ultimi destinata ad essere ri-esterificata e stoccata nel fegato come trigliceridi. Il BCS sembra invece non essere correlato all'infiltrazione infiammatoria epatica in quanto, com'è apprezzabile dal grafico 24, le bovine con BCS $\geq 3,25$ punti si distribuiscono tra i vari gruppi in modo uniforme.

Per quanto riguarda gli altri parametri ematici esaminati, ovvero glucosio, GTP, albumine ed urea, questi sono stati messi in relazione all'infiltrazione lipidica ed infiammatoria epatiche ma non sono emersi risultati degni di nota.

Il GTP nel pre parto, secondo le analisi, è risultato correlato negativamente con il grado di infiltrazione lipidica e la quasi totalità delle bovine presentava concentrazioni fisiologiche sia nel pre che nel post parto.

Per quanto concerne le albumine e l'urea, anch'essi avevano valori nella norma e non sono emerse correlazioni significative con infiltrazione lipidica ed infiammatoria, se non nel caso dell'urea post parto e il grado di lipidosi epatica, ma sembrano essere due parametri non collegabili.

8.CONCLUSIONI

L'indagine ha permesso di constatare che i parametri del metabolismo energetico delle bovine da latte hanno subito variazioni in seguito alla somministrazione del carico di glucosio e che tali variazioni sono risultate differenti tra il periodo del pre-parto e del post-parto.

Il test da carico del glucosio ha permesso di evidenziare il ridotto rilascio di insulina nel periodo del post-parto rispetto al pre-parto e quindi una diminuzione della risposta dell'insulina in seguito ad una condizione di iperglicemia.

Dopo il parto la bovina sviluppa un grado variabile di insulino resistenza per garantire la deviazione delle fonti di energia (glucosio) dal muscolo e dal tessuto adiposo verso la ghiandola mammaria, che aumenta drasticamente le richieste energetiche per l'inizio della lattazione. A conferma di questo, anche i valori della glicemia sono risultati inferiori nel post-parto. E' probabile inoltre che la minore insulinemia dei soggetti gestanti, dopo la somministrazione del bolo di glucosio, sia conseguenza di un'inibizione del rilascio di insulina da parte di NEFA e GH, i cui valori aumentano dopo il parto. Anche gli altri parametri ematici hanno subito delle variazioni dopo il test da carico. In particolare NEFA e β -idrossibutirrato (BHB) hanno subito un calo probabilmente perché, dopo la somministrazione del glucosio, viene sfruttato questo come fonte energetica principale, permettendo la riduzione dei processi di lipomobilizzazione e di produzione di corpi chetonici che erano in atto. Dopo poche ore dal test, però, i valori di questi metaboliti ritornano al livello iniziale. Il calo di NEFA e BHB dopo il carico di glucosio è più marcato nel post-parto e questo può significare che, dopo il parto, il deficit di glucosio risulta più elevato. In condizioni di deficit più marcato la bovina sfrutta in maniera più pronunciata il glucosio somministrato e questo si riflette in un calo più elevato di NEFA e BHB.

Questo studio ha evidenziato inoltre alcune correlazioni tra parametri ematici riscontrati nel pre-parto e lo sviluppo di patologie nel post-parto, quali zoppia, ritenzione placentare, mastite, metrite, distocia e collasso puerperale. Il collasso puerperale è risultato essere correlato positivamente con i valori di NEFA nel pre-parto, così come la mastite ha mostrato una correlazione positiva con il BHB, mentre tra l'incidenza di metrite e i valori di glicemia registrati nel pre-parto si è osservato un indice di correlazione negativo.

L'aumento dei valori di NEFA e BHB e il calo della glicemia sono indici della difficoltà della bovina nel far fronte all'aumento delle richieste energetiche che caratterizza il periodo di fine gravidanza e inizio della lattazione e sono diretta conseguenza del bilancio energetico negativo. Questi squilibri metabolici propri del periodo del periparto favoriscono quindi lo sviluppo di patologie nel momento successivo al parto. Ad ogni modo la comparsa di tali patologie nel post-parto è risultata variabile tra le due aziende oggetto di studio, suggerendo l'importanza di fattori gestionali e manageriali nella loro eziologia.

Per quanto concerne la funzionalità epatica, durante il periodo che va dal pre parto fino al parto, è indispensabile mantenere un'assunzione energetica compatibile con la richiesta da parte del bovino. Si deve inoltre puntare ad aumentare tale offerta di energia durante le prime fasi di lattazione, quando la domanda diventa massima. Al contempo, un sovracondizionamento e un eccesso di tessuto adiposo nelle bovine al momento del parto è controproducente, poiché comporta una predisposizione allo sviluppo della steatosi epatica (Jorritsma et al., 2000). Altri fattori che predispongono allo sviluppo di lipidosi epatica sono l'alta produzione di latte, gli intervalli interparto lunghi (Stoßer and Scholz, 1991), il sistema immunitario compromesso (Mehrzaad et al., 2002), o uno stato antiossidante molto basso (Gilbert et al., 1993). A questi si aggiungono anche la mancanza di spazio e la carenza di esercizio nel periparto, condizioni sanitarie precarie, elevate temperature ambientali ed alta umidità con scarsa ventilazione (Stoßer and Scholz, 1991; Gerloff, 2000). Queste sono tutte condizioni a cui l'allevatore dovrebbe porre grande attenzione, per diminuire il rischio di sviluppare steatosi epatica e salvaguardare in questo modo la produttività delle bovine.

Dal nostro studio è emerso un notevole aumento delle concentrazioni di NEFA e GOT dal pre parto rispetto al post parto; inoltre questi parametri sono risultati fortemente correlati al grado di lipidosi epatica. Quindi si può supporre che nel post parto ad elevate concentrazioni di GOT e NEFA, riscontrabili attraverso analisi dei prelievi ematici, corrisponda, con buona probabilità, uno stato di lipidosi epatica da lieve a moderata. Questa ipotesi può essere ancor più resa valida se correlata ad alla presenza di $BCS \geq 3,25$ punti nel post parto.

Per quanto riguarda lo stato infiammatorio del fegato, dallo studio si potrebbe evincere che ad alti livelli di NEFA e di GOT nel post parto, corrisponda quasi sicuramente un'infiltrazione infiammatoria da moderata a grave a livello di parenchima epatico. Inoltre, si può supporre

che anche rilevando concentrazioni di globuline elevate sia nel pre che nel post parto, corrisponda un'infiltrazione infiammatoria del fegato.

In futuro, lo studio potrebbe essere ulteriormente approfondito attraverso una valutazione dell'effetto azienda o dell'effetto della tipologia di alimentazione correlati al grado di infiltrazione lipidica e al grado di infiltrazione infiammatoria epatiche.

Inoltre sarebbe molto interessante verificare le condizioni epatiche nel post parto, tramite biopsie eco-guidate da eseguirsi nelle prime 4-6 settimane di lattazione.

9. BIBLIOGRAFIA

Alsemgeest, S.P., Taverne, M.A., Boosman, R., van der Weyden, B.C., and Gruys, E.1993. Peripartum acute-phase protein serum amyloid-A concentration in plasma of cows and fetuses. *Am. J. Vet. Res.* 54:164-167.

Ametaj B. N., Bradford B. J., Bobe G., Nafikov R. A., Lu Y., Young J. W., Beitz D. C., 2005. Strong relationship between mediators of the acute phase response and fatty liver in dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science* 85: 165–175.

Ametaj, B. N., Bradford, B. J., Bobe, G., and Beitz, D. C. 2002. Acute phase response indicates inflammatory conditions may play a role in the pathogenesis of fatty liver in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85: 189.

Andersson, L. 1984. Concentrations of Blood and Milk Ketone Bodies, Blood Isopropanol and Plasma Glucose in Dairy Cows in Relation to the Degree of Hyperketonaemia and Clinical Signs. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A.* 31:683–693.

Annison E. F., Bickerstaffe R., Linzell J. L., 1974. Glucose and fatty acid metabolism in cows producing milk of low fat content. *Journal of Agricultural Science* 82: 87-95.

Arias, I.M., Jakoby, W.B., Popper, H., Schachter, D., and Shafritz, D.A. 1988. *The liver: biology and pathophysiology*, Raven Press. 19: 205-220.

Baird G. D., Van der Walt J. G., Bergman E. N., 1983. Whole-body metabolism of glucose and lactate in productive sheep and cows. *British Journal of Nutrition* 50: 249-265.

Bauchart, D., Durand, D., Laplaud, P. M., Forgez, P., Goulinet, S. and Chapman, M. J.. 1989. Plasma lipoproteins and apolipoproteins in the preruminant calf, *Bos spp*: density distribution, physicochemical properties, and the in vivo evaluation of the contribution of the liver to lipoprotein homeostasis. *Journal of Lipid Research* 30:1499-1514.

Bauman D. E., Currie W. B., 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science* 63: 1514-1529.

Bauman D. E., Peel C. J., Steinhour W. D., Reynolds P. J., Tyrrell H. F., Brown A. C. G., Haaland G. L., 1988. Effect of bovine somatotropin on metabolism of lactating dairy cows: Influence on rates of irreversible loss and oxidation of glucose and nonesterified fatty acids. *The Journal of Nutrition* 118: 1031-1040.

Bauman D. E., Vernon R. G., 1993. Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation. *Annual Review of Nutrition* 13: 437-461.

Beam S. W., Butler W. R., 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biology of Reproduction* 56: 133-142.

Bell A. W., 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science* 73: 2804-2819.

Benson J. A., Reynolds C. K., Aikman P. C., Lupoli B., Beever D. E., 2002. Effects of abomasal long chain fatty acid infusion on splanchnic nutrient metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 85: 1804-1814.

Bertics, S.J., Grummer, R., Cadorniga-Valino, C., Stoddard, E. 1992. Effect of Prepartum Dry Matter Intake on Liver Triglyceride Concentration and Early Lactation, *Journal of Dairy Science*. 75: 1914-1922

Bertoni G., Calamari L., Trevisi E., 2000. Alterazioni della funzionalità epatica nel puerperio e conseguenze sulla fertilità della bovina. *La Riproduzione in Zootecnica*. G. Enne, and R. Rossi, ed. Ministero Politiche Agricole Forestali, Milan, Italy 3: 195–223

Bertoni, G., Trevisi, E., Lombardelli, R. 2009. Some new aspects of nutrition, health conditions and fertility of intensively reared dairy cows. *Ital J. Anim Sci*; 8: 491-518.

Bionaz M., Trevisi E., Calamari L., Librandi F., Ferrari A., Bertoni G., 2007. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions and liver function in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90: 1740–1750.

Bobé, G., Young, J.W., Beitz, D.C. 2004. Invited Review: Pathology, Etiology, Prevention, and Treatment of Fatty Liver in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 87:3105-3124.

Braden T. D., Fry C., Sartin J. L., 1998. Effects of interleukins on secretion of luteinizing hormone from ovine pituitary cells. *American Journal of Veterinary Research* 59: 1488–1493.

Bradford, B.J. and Allen, M.S. 2005. Phlorizin administration increases hepatic gluconeogenic enzyme mRNA abundance but not feed intake in late-lactation dairy cows. *J Nutr* 35:2206-2211.

Breukink, H. J., and Wensing, V. 1997. Pathophysiology of the liver in high yielding dairy cows and its consequences for health and production. *Isr. J. Vet. Med.* 52:66–72.

Butler W. R., 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Animal Reproduction Science* 60-61: 449-457.

Butler, W.R.. 2010. Energy metabolism and insulin resistance in dairy cattle. *Large Animal Review*; 16: 301-304.

Cadorniga-Valino, C., Grummer, R. R., Armentano, L. E., Donkin, S. S. and Bertics, S. J. 1997. Effects of fatty acids and hormones on fatty acid metabolism and gluconeogenesis in bovine hepatocytes. *J. Dairy Sci.* 80:646–656.

Calamari L., Maianti M. G., Bertoni G., 1997. Relazioni fra potenzialità produttiva, problemi nel puerperio e fertilità nella vacca da latte. *Studio Della Efficienza Riproduttiva degli Animali di Interesse Zootecnico–9° Meeting Nazionale*, Bergamo, Italy. A. Galli and C. Previtali, ed. Coop. Paolo VI, Gorgonzola, Milan, Italy pages 99–103

Cappa V., Trevisi E., Bertoni G., 1989. Variazioni ematiche e produttive nel 1° mese di lattazione in bovine di allevamenti con o senza problemi “post-partum”. *Zootecnia e nutrizione Animale* 15: 645–660.

Catalano P. M., Tyzbir E. D., Roman N. M., Amini S. B., Sims E. A., 1991. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in non-obese pregnant women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 165: 1667-1672.

Chagas L. M., Lucy M. C., Back P. J., Blache D., Lee J. M., Gore P. J., Sheahan A. J., Roche J. R., 2009. Insulin resistance in divergent strains of Holstein-Friesian dairy cows offered fresh pasture and increasing amounts of concentrate in early lactation. *Journal of Dairy Science* 92: 216-222.

Chapinal N., Carson M., LeBlanc S. J., Leslie K. E., Godden S., Capel M., Santos J. E. P., Overton M. W., Duffield T. F., 2012. The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. *Journal of Dairy Science* 95: 1301–1309.

Cools S., Bossaert, P. , Caluwaerts, T., Hostens, M. , Opsomer, G. and de Kruif, A. 2008. De economische gevolgen van een verlenging van de tussenkalftijd bij hoogproductief melkvee. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 77:402-409.

Dellmann, H.D., Eurell, J.A. 1998. Textbook of veterinary histology. 10:262-267

Deluyker H. A., Gay J. M., Weaver L. D., Azari A. S., 1991. Change of milk yield with clinical diseases for a high producing dairy herd. *Journal of Dairy Science* 74: 436–445.

Doepel L., Lapierre H., Kennelly J. J., 2002. Peripartum Performance and Metabolism of Dairy Cows in Response to Prepartum Energy and Protein Intake. *Journal of Dairy Science* 85: 2315-2334.

Drackley J. K., 1999. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier?. *Journal of Dairy Science* 82: 2259-2273.

Drackley J. K., Dann H. M., Douglas G. N., Janovick Gurtezy N. A., Litherland N. B., Underwood J. P., Looor J. J., 2005. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Italian Journal of Animal Science* 4: 323–344.

Drackley J. K., Overton T. R., Douglas G. N., 2001. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science* 84: 1231-1237.

Drackley, J. K., Beitz, D. C. and Young, J. W.. 1991. Regulation of in vitro metabolism of palmitate by carnitine and propionate in liver from dairy cows. *Journal of Dairy Science* 74:3014-3024.

Duffield T. F., 1997. Effects of a monensin controlled release capsule on energy metabolism, health, and production in lactating dairy cattle. DVSc Thesis. University of Guelph, Ontario, Canada.

Duffield T. F., 2000. Subclinical ketosis in lactating dairy cattle: Metabolic disorders of ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 16: 231–253.

Duffield, T., Bagg, R., DesCoteaux, L., Bouchard, E., Brodeur, M., Tremblay, D., Keefe, G., LeBlanc, S., Dick, P. 2002. Prepartum monensin for the reduction of energy associated disease in postpartum dairy cows. *J Dairy Sci* 85: 397-405.

Duffield, T.F., Lissemore, K.D., McBride, B.W., Leslie, K.E. 2009. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *Journal of Dairy Sci* 92: 571-580.

Dunsha F. R., Harris D. M., Bauman D. E., Boyd R. D., Bell A. W., 1992. Effect of porcine somatotropin on in vivo glucose kinetics and lipogenesis in growing pigs. *Journal of Dairy Science* 70: 141-151.

Edbrooke, M.R., Foldi, J., Cheshire, J.K., Li, F., Faulkes, D.J., and Woo, P. 1993. Constitutive and NF-kappa B-like proteins in the regulation of the serum amyloid A gene by interleukin 1. *Cytokine*. 3:380-388.

Edmonson A. J., Lean D., Weaver I. D., Farver T., Webster G., 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 72: 68-78.

Enemark, J. M. D., 2008. The monitoring, prevention and treatment of subacute ruminal acidosis (SARA) – a review. *The Veterinary Journal* 176: 32–43.

Erb H. N., Smith R. D., Oltenacu P. A., Guard C. L., Hilman R. B., Powers P. A., Smith M. C., White M. E., 1985. Path model of reproductive disorders and performance, milk fever, mastitis, milk yield, and culling in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 68: 3337–3349.

Fauci, A. S., Braunwald, E., Kasper, D.L. and Stephen L. Hauser. 1998. *Harrison's principles of internal medicine*, ed. A. New York, McGraw-Hill. 1721-1725.

Fedele D., 1999. *Diabete e malattie del metabolismo*. Pacini Editore Medicina pg 6.

Filar J., 1979. Über den Gehalt an b-Hydroxybutyrat, Azetazetat und Aceton im Blut von gesunden und an Ketoseerkrankten Kuhén. *Wien. Tierärztl. Monatsschr* 66: 377–380.

Fleck A., 1989. Clinical and nutritional aspects of changes in acute phase proteins during inflammation. *Proceedings of Nutrition Society* 48: 347–354.

Freinkel N., Metzger B.E., 1979. *Pregnancy metabolism, diabetes and fetus*. *Excerpta medica*, Amsterdam pages 3-208.

Geishauser T., Leslie K., Kelton D., Duffield T., 2001. Monitoring for subclinical ketosis in dairy herds. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 23: 65–71.

Gerloff, B.J., Herdt, T.H., Emery, R.S.. 1986. The relationship of hepatic lipodosis to health and performance in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 188: 845-850.

Gilbert, R. O., Grohn, Y. T., Miller, P. M. and Hoffman, D. J. 1993. Effect of parity on periparturient neutrophil function in dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 36:75–82.

Goff J. P., Horst R. L., 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *Journal of Dairy Science* 80: 1260-1268.

Gonzàles C., Alonso A., Alvarez N., Dìaz F., Martínez M., Fernandèz S., Patterson A.M., 2000. Role of 17 β -estradiol and/or progesterone on insulin sensivity in the rat: implications during pregnancy. *Journal of Endocrinology* 166: 283-291.

Grimble R. F., 1990. Nutrition and cytokine action. *Nutrition Research Reviews* 3: 193–210.

Grummer R. R., 1993. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* 76: 3882–3896.

Grummer R. R., 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition cow. *Journal of Animal Science* 73: 2820–2833.

Grummer R. R., 2008. Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *The Veterinary Journal* 176: 10-20.

Grummer R. R., Mashek D. G., Hayirli A., 2004. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 20: 447–470.

Hart I., Bines C., J. A., Morant S. V., Ridley J. L., 1978. Endocrine control of energy metabolism in the cow: Comparison of the levels of hormones (prolactin, growth hormone, insulin and thyroxine) and metabolites in the plasma of high- and low yielding cattle at various stages of lactation. *Journal of Endocrinology* 77: 333.

Herd T. H., 2000. Ruminant adaptation to negative energy balance. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 16: 215–230.

Herdt T. H., 2006. The history and influence of the ICPD. Proceedings of the 12th International Conference on Production Diseases in Farm Animals. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands pg 7.

Hippen, A. R., She, P., Young, J. W., Beitz, D. C., Lindberg, G. L., Richardson, L.F., and Tucker, R. W. 1999. Alleviation of fatty liver in dairy cows by 14-day intravenous infusions of glucagon. *J. Dairy Sci.* 82:1139–1152.

Hirvonen, J., Eklund, K., Teppo, A.M., Huszenicza, G., Kulcsar, M., Saloniemi, H., and Pyorala, S. 1999. Acute phase response in dairy cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Acta Vet. Scand.* 40:35-46.

Hirvonen, J., Pyorala, S., and Jousimies-Somer, H. 1996. Acute phase response in heifers with experimentally induced mastitis. *J. Dairy Res.* 63:351-60.

Hoffman, J.S., and Benditt, E.P. 1982. Changes in high density lipoprotein content following endotoxin administration in the mouse. Formation of serum amyloid protein-rich subfractions. *J. Biol. Chem.* 257:10510-10517.

Holtenius K., Agenas S., Delavaud C., Chilliard Y., 2003. Effects of Feeding Intensity during the Dry Period. Metabolic and Hormonal Responses. *Journal of Dairy Science* 86: 883-891.

Holtenius, P., and Traven, M. 1990. Impaired glucose tolerance and heterogeneity of insulin responses in cows with abomasal displacement. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe A* 37:445.451.

Houe H., Ostergaard S., Thilsing-Hansen T., Jorgensen R. J., Larsen T., Sorensen J. T., Agger J. F., Blom J. Y., 2001. Milk fever and subclinical hypocalcaemia – an evaluation of parameters on incidence risk, diagnosis, risk factors and biological effects as input for a decision support system for disease control. *Acta Veterinaria Scandinavica* 42: 1–29.

Hove K., 1978. Insulin secretion in lactating cows: Responses to glucose infused intravenously in normal, ketonemic, and starved animals. *Journal of Dairy Science* 61: 1407-1413.

Ingvarsen K. L., Dewhurst R. J., Friggens N. C., 2003. On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle. *Livestock Production Science* 83: 277–308.

Jaster E. H., and Wegner T. N., 1981. Beta-adrenergic receptor involvement in lipolysis of dairy cattle subcutaneous adipose tissue during dry and lactating state. *Journal of Dairy Science* 64: 1655.

Jesse, B.W. , Emery, R.S. , Thomas,J.W. 1986. Aspects of the Regulation of Long-Chain Fatty Acid Oxidation in Bovine Liver. *Journal of Dairy Science*, 69:2298-2303.

Jorritsma, R., César, M.L., Hermans, J.T., Kruitwagen, C.L.J.J., Vos, P.L.A.M., Kruip, T.A.M. 2004. Effects of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells and developmental potential of oocytes in vitro. *Animal Reproduction Science*, 81: 225-235.

Jorritsma, R., H. Jorritsma, Y. H. Schukken, and G. H. Wentink. 2000. Relationships between fatty liver and fertility and some periparturient diseases in commercial Dutch dairy herds. *Theriogenology* 54:1065–1074.

Jorritsma, R., H. Jorritsma, Y. H. Schukken, P. C. Bartlett, T. Wensing, and G. H. Wentink. 2001. Prevalence and indicators of postpartum fatty infiltration of the liver in nine commercial dairy herds in the Netherlands. *Livest. Prod. Sci.* 68:53–60.

Kahn C. R., 1978. Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. *Metabolism* 27: 1893-1902.

Kalaitzakis, E., Roubies, N., Panousis, N., Pourliotis, K., Kaldrymidou, E., Karatzias, H.2007. Clinicopathologic evaluation of hepatic lipidosi in periparturient dairy cattle. *J Vet Intern Med* 21: 835-845.

Kasper D., Braunwald E., Fauci A., Hauser S., Longo D., Jameson J. L., 2005. Harrison, Principi di Medicina Interna. Mc Graw Hill pages 2427-2458.

Katoh N., 2002. Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows. *The Journal of Veterinary Medical Science* 64: 293–307.

Kelton D. F., Lissemore K. D., Martin R. E., 1998. Recommendations for recording and calculating the incidence of selected clinical diseases of dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 81: 2502–5209.

Knight C. H., France J., Beever D. E., 1994. Nutrient metabolism and utilization in the mammary gland. *Livestock Production Science* 39: 129-137.

Kumar V., Abbas A. K., Fausto N., 2006. *Le Basi Patogenetiche delle Malattie*. Elsevier pages 1189-1205.

Kushibiki S., Hodate K., Ueda Y., Shingu H., Mori Y., Itoh T., Yokomizo Y., 2000. Administration of recombinant bovine tumor necrosis factor- α affects intermediary metabolism and insulin and growth hormone secretion in dairy heifers. *Journal of Animal Science* 78: 2164–2171.

Kushner, I. 1982. The phenomenon of the acute phase response. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 389:39-48.

Kushner, I. 1988. The acute phase response: an overview. *Methods Enzymol.* 163:373-383.

Le Blanc S. J., 2008. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance – A review. *Veterinary Journal* 176: 102-114.

Le Blanc S. J., Leslie K. E., Duffield, T. F., 2005a. Metabolic predictors of displaced abomasums in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 88: 159–170.

Le Blanc S. J., Lissemore K. D., Kelton, D. F., Duffield T. F., Leslie K. E., 2005b. Major advances in disease prevention in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 89: 1267–1279.

LeBlanc, S. J. 2010. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J. Reprod. Dev.* 56:29–35.

Leng R. A., 1970. Glucose synthesis in ruminants. *Advances in Veterinary Science* 14: 209-260.

Markusfeld, O. 1985. Relationship between overfeeding, metritis and ketosis in high yielding dairy cows. *Vet. Rec.* 116:489-491.

Mc Gavin, D., Zachary, J. 2007. *Pathologic basis of veterinarian disease.* Elsevier. 8:115-158.

McNamara J. P., 2000. Integrating genotype and nutrition on utilization of body reserves during lactation of dairy cattle. *Symposium on Ruminant Physiology.* P. B. Cronje, ed. CAB Int., London, UK pages 353–370

Mehrzad, J., Duchateau, V., Pyörälä, S. and Burvenich, V. 2002. Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparous and pluriparous dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactation. *J. Dairy Sci.* 85:3268–3276.

Mertens, M. 1992. *Leberbiopsie beim rind: Histologische und enzymhistochemische auswertung von Biopaten aus kuhen mit dislocatio abomasi sinistra.* Hannover, Germany: Tierärztliche Hochschule;Dissertation.

Morrow, D. A., Hillman, D., Dade, A. W. and Kitchen, V. 1979. Clinical investigation of a dairy herd with the fat cow syndrome. *JAVMA* 174:161–167.

Oikawa S., Oetzel G. R., 2006. Decreased insulin response in dairy cows following a four-day fast to induce hepatic lipidosis. *Journal of Dairy Science* 89: 2999-3005.

- Ospina P. A., Nydam D. V., Stokol T., Overton T. R., 2010. Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level. *Journal of Dairy Science* 93: 3595-3601.
- Père M. C., Etienne M., Dourmad J. Y., 2000. Adaptations of glucose metabolism in multiparous sows: Effects of pregnancy and feeding level. *Journal of Dairy Science* 78: 2933–2941.
- Petersen, H. H., Nielsen, J. P., and Heegaard, P. M. H.. 2004. Application of acute phase protein measurement in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research* 35:163.187.
- Pires J. A. A., Souza A. H., Grummer R. R., 2007. Induction of hyperlipidemia by intravenous infusion of tallow emulsion causes insulin resistance in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 90: 2735-2744.
- Pryce, J. E., Coffey M. P., Simm G., 2001. The relationship between body condition score and reproductive performance. *Journal of Dairy Science* 84: 1508–1515.
- Pryce, J. E., Royal, M. D., Garnsworthy, P. C., and Mao, I. L. 2004. Fertility in the high-producing dairy cow. *Livestock Production Science* 86:125-135.
- Puppione, D. L. 1978. Implications of unique features of blood lipid transport in the lactating cow. *Journal of Dairy Science* 61:651-659.
- Radostis, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D. 2007. *Veterinary medicine – a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*, 10th edn. Saunders Elsevier, New York, NY. 7: 383-386, 29: 1011-1016.
- Rajala-Schultz P. J., Grohn Y. T., McCulloch C. E., 1999. Effects of milk fever, ketosis, lameness on milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 82: 288–294.

Rehage, J., Qualmann, K., Meier, C., Stockhofe-Zurwieden, N., Hoeltershinken, M. and Pohlenz, J. 1999. Total serum bile acid concentrations in dairy cows with fatty liver and liver failure. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 106:126–129.

Reinhardt T. A., Lippolis J. D., McCluskey B. J., Goff J. P., Horst R. L., 2011. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *The Veterinary Journal* 188: 122–124

Reynolds C. K., 1995. Quantitative aspects of liver metabolism in ruminants. *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction: Proc. 8th Int. Symp. Ruminant Physiol.* W. v. Engelhardt, S. Leonhard-Marek, G. Breves and D. Giesecke, ed. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Germany pages 351-371

Reynolds C. K., Aikman P. C., Lupoli B., Humphries D. J., Beever D. E., 2003. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *Journal of Dairy Science* 86: 1201-1217.

Reynolds C. K., Harmon D. L., Cecava M. J., 1994. Absorption and delivery of nutrients for milk protein synthesis by portal-drained viscera. *Journal of Dairy Science* 77: 2787-2808.

Reynolds L. P., Ferrell C. L., Robertson D. A., Ford S. P., 1986. Metabolism of the gravid uterus, foetus and utero-placenta at several stages of gestation in cows. *Journal of Agricultural Science* 106: 437.

Reynolds, C.K., Aikman, P.C., Lupoli, B., Humphries, D.J., Beever, D.E. 2003. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation to early lactation. *J Dairy Sci* 86: 1201-1217.

Rhoads R. P., Kim J. W., Leury B. J., Baumgard L. H., Segole N., Frank S. J., Bauman D. E., Boisclair Y. R., 2004. Insulin increase the abundance of the growth hormone receptor in liver and adipose tissue of periparturient dairy cows. *The Journal of Nutrition* 134: 1020-1027.

Robson, J.S., Passmore, R.. 1968. *A companion to medical studies 1° vol.*, Oxford-Edinburgh, Blackwell.

Rose M. T., Obara Y., Itoh F., Hashimoto H., Takahashi Y., 1997. Non-insulinand insulin-mediated glucose uptake in dairy cows. *Journal of Dairy Research* 64: 341-353.

Rukkwamsuk, T., Kruip, T.A., and Wensing, T. 1999. Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period. *Vet. Q.* 3:71-77.

Sakumoto, R., Shibaya, M., Okuda, K. 2003. Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) inhibits progesterone and estradiol-17beta production from cultured granulosa cells: Presence of TNFalpha receptors in bovine granulosa and theca cells. *Journal of Reproduction and Development*; 49: 441-449.

Sato S., Suzuki T., Okada K., 1995. Suppression of mitogenic response of bovine peripheral blood lymphocytes by ketone bodies. *The Journal of Veterinary Medical Science* 57: 183–185.

Schiff, E.R. 1999. "Annals of Internal Medicine", 130, pp. 52-57.

Schrack F. N., Hockett M. E., Saxton A. M., Lewis M. J., Dowlen H. H., Oliver S. P., 2001. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *Journal of Dairy Science* 84: 1407–1412.

Sechen S. J., Dunshea F. R., Bauman D. E., 1990. Somatotropin in lactating cows: effect on response to epinephrine and insulin. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 258: 582-588.

Stober, M., and H. Scholz. 1991. Treatment of dairy cow for lipomobilization syndrome. *Mh. VetMed.* 46:563–566.

Stockdale C. R., 2001. Body condition at calving and the performance of dairy cows in early lactation under Australian conditions: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 41: 823–839.

Sweeney, R.W, Divers, T.J., Whitlock, R.H., Acland, H.M., Tulleners, E.P., and Palmer, J.E. 1988. Hepatic failure in dairy cattle following mastitis or metritis. *J. Vet. Intern. Med.* 2:80-84

Van Arendonk, J.A.M., Nieuwhof, G.J., Vos, H., Korver, S.. 1991. Genetic aspects of feed intake and efficiency in lactating dairy heifers, *Livestock Production Science*, 29:263-275.

Van Den Top A. M., Wensing T., Geelen M. J. H., Wentink G. H., Van Klooster A. T., Beynen A. C., 1995. Time trends of plasma lipids and enzymes synthesizing hepatic triacylglycerol during postpartum development of fatty liver in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 78: 2208-2220.

Van Den Top, A. M., T. Wensing, M. J. H. Geelen, G. H. Wentink, A. T. Van .t Klooster, and A. C. Beynen. 1995. Time trends of plasma lipids and enzymes synthesizing hepatic triacylglycerol during postpartum development of fatty liver in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 78:2208-2220.

Van Kneysel, A. T. M., van den Brand, H., Graat, E. A. M., Dijkstra, J., Jorritsma, R., Decuyper, E. , Tamminga, S. and Kemp, B. 2007. Dietary energy source in dairy cows in early lactation: metabolites and metabolic hormones. *Journal of Dairy Science* 90:1477-1485.

Van Saun J. R., 1991. Dry cow nutrition: The key to improve fresh cow performance. *Veterinary Clinics of North America* 7: 599–620.

Van Saun J. R., 2004a. Health status and time relative to calving effects on blood metabolite concentrations, in *Proc 23rd World Buiatrics Congress (Poster Abstracts)*, Quebec, Canada, July 11-16 pg 87.

Van Saun J. R., 2004b. Metabolic profiling and health risk in transition cows. *Proceedings of the American Association for Bovine Practice* 37: 212-213.

Veenhuizen, J. J., Drackley, J. K., Richard, M. J., Sanderson, T. P., Miller, L.D. and Young, J. W. 1991. Metabolic changes in blood and liver during development and early treatment of experimental fatty liver and ketosis in cows. *J. Dairy Sci.* 74:4238–4253.

Wensing, T., Kruij, T., Geelen, M. J. H. , Wentink, G. H. and van den Top, A. M. 1997. Postpartum fatty liver in high-producing dairy cows in practice and in animal studies. The connection with health, production and reproduction problems. *Comp. Haematol. Int.* 7:167–171.

Werling, D., Sutter, F., Arnold, M., Kun, G., Tooten, P.C., Gruys, E., Kreuzer, M., and Langhans, W. 1996. Characterisation of the acute phase response of heifers to a prolonged low dose infusion of lipopolysaccharide. *Res. Vet. Sci.* 61:252-257.

West, H.J. 1990. Effect on liver function of acetonaemia and the fat cow syndrome in cattle. *Res. Vet. Sci.* 48:221-227.

Wright, R. 1985. *Liver and biliary disease: pathophysiology, diagnosis, management*, Philadelphia, Saunders, 24:1229-1233.

Zhao F. Q., Keating A. F., 2007. Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland. *Journal of Dairy science* 90: 76-86.

Zhao F. Q., Moseley W. M., Tucker H. A., Kennelly J. J., 2006. Regulation of glucose transporter gene expression in mammary gland, muscle, and fat of lactating cows by administration of bovine growth hormone and bovine growth hormone-releasing factor. *Journal of Animal Science* 74: 183-189.