



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIP. DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in

MEDICINA VETERINARIA

TESI DI LAUREA

**RELAZIONE TRA ALIMENTAZIONE, FUNZIONALITA'
DELL'ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-SURRENE E
FUNZIONE RIPRODUTTIVA NELLA BOVINA DA LATTE**

Relatore: Gianfranco Gabai

*Laureanda: Giulia Stella
Matricola n°1004166/MV*

Anno Accademico 2015-2016

*Dedicata a mio zio Sergio
che anche se non c'è più mi ha insegnato
a sorridere sempre
e a prendere la vita con filosofia*

Indice

Indice	i
Premessa	1
Scopo della tesi.....	5
FISIOLOGIA DELL'APPARATO RIPRODUTTORE DELLA BOVINA DA LATTE E FATTORI CHE INFLUENZANO L'ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-GONADI (HPG)	7
1.1 Fisiologia dell'apparato riproduttore nella bovina da latte.....	7
1.2 Onde follicolari e crescita del follicolo.....	9
1.3 Modello di crescita follicolare	11
1.4 Formazione del corpo luteo (CL) e importanza dell'LH per il mantenimento del CL	13
1.5 Importanza dell'LH per lo sviluppo del CL	14
1.6 Regolazione dell'asse HPG.....	14
1.7 Alterazioni del processo ovulatorio	15
1.7.1 Manze prepuberi	16
1.7.2 Vacche nel post-partum	17
1.7.3 Anovulazione in presenza di corpo luteo	18
1.8 Fattori patologici che alterano la normale funzionalità ovarica.....	19
1.8.1 Iponutrizione, cisti follicolari ed endotossine	19
1.9 Cisti follicolari	19
1.9.1 Induzione sperimentale delle cisti follicolari.....	21
1.9.2 Risoluzione delle cisti follicolari.....	22
L'ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-SURRENE, STRESS E FERTILITA'	25
2.1 Lo stress	25
2.2 Situazioni stressanti che riducono la fertilità.	25
2.3 Asse HPA (ipotalamo-ipofisi-surrene).....	27
2.4 Il cortisolo	28
2.5 Asse HPA e HPG	28
2.6 Relazione tra stressor e HPG	30
2.6.1 Stressor acuti e asse HPG	31
2.6.2 Endotossine, stressor acuto	33
2.6.3 ACTH e asse HPG	35
2.6.4 Stressor cronici e asse HPG	35
ALIMENTAZIONE, REGOLAZIONE DEL METABOLISMO E ASSE HPG	37

3.1	Stato metabolico della bovina da latte e fertilità	37
3.2	Il bilancio energetico negativo (NEB)	38
3.3	Leptina	39
3.4	Insulina.....	43
3.5	Insulino-resistenza.....	46
3.6	IGF-1	47
3.7	Dieta iperproteica e il suo effetto sull'apparato riproduttore	49
3.8	La dieta lipidica e il suo effetto sull'apparato riproduttore	53
	STRESS, NUTRIZIONE E FERTILITA' NELLA BOVINA DA LATTE	57
4.1	Effetti integrati di nutrizione e stress sulla fertilità della bovina da latte	57
4.2	Legame tra cortisolo, bilancio energetico e fertilità nella bovina da latte.....	59
4.3	Le cisti ovariche come esempio di legame tra stress, nutrizione inadeguata e fertilità	61
4.4	Stress, bilancio energetico e comportamento alimentare	63
	ACCORGIMENTI NUTRIZIONALI, MANAGERIALI E AMBIENTALI PER MIGLIORARE L'EFFICIENZA RIPRODUTTIVA DELLA BOVINA.....	67
5.1	Cambiamenti metabolici durante il periodo di asciutta e di transizione	67
5.2	Strategie del pre e peri-parto per migliorare la fertilità della bovina nel post-partum	69
5.2.1	Effetti di diete differenti in asciutta/ periodo di transizione.....	73
5.3	Strategie manageriali al momento del parto	75
5.4	Strategie per il mantenimento della fertilità effettuate nel post-partum	75
5.4.1	Esempio di dieta nel post-partum	76
	CONCLUSIONI	79
	Bibliografia.....	83
	Webgrafia	106
	Ringraziamenti.....	107

Premessa

Il beneficio economico di una mandria da latte è correlato alla sua capacità produttiva, ovvero alla sua efficienza riproduttiva.

I punti critici della riproduzione sono molteplici, ma sicuramente il più importante è rappresentato dalla rilevazione del calore e dell'anestro, fattori che maggiormente limitano le performance riproduttive della mandria, impedendo o ritardando il concepimento e, più in generale, rappresentano la causa principale di infertilità individuale nel bovino da latte. Si tratta di una "condizione" che interessa il 20-28% delle bovine ad alta produzione tra i 65 e i 75 giorni di lattazione.

Dopo il parto la bovina, oltre a subire l'involutione uterina, va incontro ad una graduale ripresa dell'attività ciclica ovarica. Il normale svolgersi di questi processi, nell'allevamento intensivo, è necessario per la successiva manifestazione ed osservazione dei calori e quindi per una nuova fecondazione.

L'anestro è la mancata espressione del calore nel periodo atteso e le cause possono essere associate alla presenza di cisti ovariche, ad un bilancio energetico negativo o ad un ovaio inattivo.

Si può parlare di anestro solo se in assenza persistente (≥ 10 giorni) di un corpo luteo: in tal caso avremo un quadro endocrinologico caratterizzato da una modificata sensibilità dell'ipotalamo all'estradiolo.

Gli effetti delle variazioni alimentari durante questo periodo possono avere un ruolo fondamentale sulla ripresa dell'ovulazione (Roche *et al.*,2000). Inoltre, il mutamento della dieta produce dei risultati più acuti nelle bovine specializzate nella produzione di latte a causa dell'aumentata richiesta energetica necessaria per la lattazione.

Il punteggio di condizione corporea, o *body condition score* (BCS), è lo strumento pratico che può fornire una funzionale verifica dello stato energetico e quindi delle conseguenti prestazioni produttive e riproduttive dell'animale (Nebel e McGilliard,1993).

La chetosi primaria rappresenta una patologia metabolica importante nel post-partum nelle bovine da latte e l'eziologia risiede in una eccessiva produzione di corpi chetonici, che sono il prodotto dell'esagerato catabolismo dei grassi in assenza di una corretta mobilizzazione glucidica. Il loro aumento nel circolo ematico avviene quando, per soddisfare l'elevata

richiesta produttiva dell'inizio della lattazione, si registrano la rapida mobilizzazione e il catabolismo dei grassi di riserva.

Il periparto o periodo di transizione è un secondo momento critico nella vita della bovina da latte e comprende un lasso di tempo tra le tre settimane precedenti e successive al parto.

E' caratterizzato da un aumento del rischio di sviluppare patologie (Stevenson e Lean,1998) e si stima che il 75% delle stesse si manifesti durante questo periodo, producendo problematiche sia di interesse epidemiologico che economico (Gnemmi *et al.*,2005).

Uno dei fattori principali per la corretta gestione del periparto è il controllo dello stato di ingrassamento corporeo attraverso la valutazione del *body condition score* (BCS). Le bovine da latte ad alta produzione dovrebbero affrontare il periodo di asciutta con un BCS compreso tra 3,5 e 3,75 (Roche *et al.*,2000). Altri autori suggeriscono un punteggio più basso, tra 3 e 3,25 (Melendez e Risco,2005).

Punteggi superiori a questi sono spesso causa di epatopatie, diminuita ingestione, prolungamento del periodo di anaestrosi e aumento degli insuccessi fecondativi (Grummer,1993). Per raggiungere questi obiettivi è stato suggerito che la razione di preparazione al parto venga introdotta almeno quattro settimane prima del parto stesso, in modo che la microflora ruminale si possa adattare alla dieta del post-partum (Goff e Horst,1997; Van Saun,1997).

Inoltre è necessario massimizzare l'ingestione di alimento attraverso l'uso di cibi ad alta palatabilità, l'aumento dello spazio utile in mangiatoia e della frequenza della distribuzione della razione (Grant e Albright,1995).

Infine, la gestione dello stress e dell'immunosoppressione è raggiungibile attraverso la corretta gestione delle tecniche d'allevamento, l'integrazione con vitamina E, selenio e il controllo del bilancio cationi-anioni nella dieta per diminuire l'incidenza delle malattie metaboliche (Roche *et al.*,2000).

Gli adattamenti del metabolismo che avvengono in questo periodo possono talvolta non avere un risultato positivo e perciò causare disordini dell'omeostasi che includono l'ipocalcemia, la sindrome della vacca a terra, l'ipomagnesemia, la chetosi, le metriti e l'ipofertilità (Gnemmi *et al.*,2005). Queste patologie sono spesso correlate tra loro e, considerato che si manifestano assieme a profondi cambiamenti endocrini e metabolici del parto e dell'inizio della lattazione, fanno del periodo di transizione una delicata fase della vita produttiva della bovina (Mulligan e Doherty,2008).

A causa di queste problematiche e al fine di aumentare le produzioni, la sanità e le prestazioni riproduttive, la manipolazione nutrizionale e metabolica della bovina peripartoriente, è divenuto un argomento di grande interesse della ricerca scientifica in medicina veterinaria.

Scopo della tesi

Lo scopo della presente tesi è di rivisitare i fattori ambientali e nutrizionali in grado di influenzare la ripresa della ciclicità e l'ovulazione nella bovina da latte. In particolare, si prederanno in considerazione i fattori in grado di agire sulla maturazione finale del follicolo ovarico e sull'ovulazione influenzando l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (HPG), quali ad esempio l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) e gli effetti a livello ipotalamico del bilancio energetico (BE). Si cercherà di mettere in risalto quando l'attivazione dell'asse HPA e il BE producono effetti simili e/o sinergici sulla sfera riproduttiva e si tenterà di dare alcune indicazioni sulle possibilità di utilizzare alcuni accorgimenti per migliorare la fertilità della bovina da latte.

CAPITOLO 1

FISIOLOGIA DELL'APPARATO RIPRODUTTORE DELLA BOVINA DA LATTE E FATTORI CHE INFLUENZANO L'ASSE IPOTALAMO-IPOFISIGONADI (HPG)

1.1 Fisiologia dell'apparato riproduttore nella bovina da latte

Tratto da:

Wiltbank MC, Gümen A, Sartori R, 2002, "PHYSIOLOGICAL CLASSIFICATION OF ANOVULATORY CONDITIONS IN CATTLE", *Theriogenology*. 57: 21-52.

Il ciclo estrale negli animali si caratterizza dal susseguirsi di periodi di recettività sessuale, definiti estro, che si ripetono ad intervalli di tempo caratteristici per ciascuna specie. La lunghezza del ciclo estrale della bovina è mediamente di 21 giorni (da 18 a 24 giorni) e il ciclo riproduttivo può essere suddiviso in 4 fasi:

- PROESTRO**: dura circa tre giorni ed è caratterizzato dal rapido accrescimento follicolare che precede l'estro;
- ESTRO**: dura circa 12-16 ore (range dalle 3 alle 28 ore) ed è il periodo di recettività sessuale al termine del quale avviene l'ovulazione;
- METAESTRO**: è il periodo durante il quale inizia lo sviluppo del corpo luteo;
- DIESTRO**: è la fase di attività luteale matura che si instaura circa 4 giorni dopo l'ovulazione e si esaurisce con la regressione del corpo luteo.

Durante il normale ciclo estrale delle bovine avvengono vari cambiamenti a livello di morfologia ovarica. Il follicolo pre-ovulatorio si ingrandisce avvicinandosi al momento dell'estro e, producendo quantità di estradiolo via via crescenti, induce il picco di LH (ormone leutinizzante) e l'ovulazione.

Le dimensioni del follicolo ovulatorio è molto variabile tra le vacche. Per esempio, manze di razza Frisona ovulano follicoli di $14.0 \pm 0.2 \text{ mm}$, mentre vacche da latte adulte ovulano follicoli di circa $17.4 \pm 0.5 \text{ mm}$ (Sartori *et al.*, 2000).

Capitolo 1

Valori follicolari di 16.4 mm vengono rilevati in manze che presentano due onde follicolari durante il ciclo estrale (Ginther *et al.*,1989) mentre negli animali che presentano tre onde follicolari i valori medi sono di 13.9 ± 0.4 mm.

Dopo circa 24-32 ore dal picco di LH avviene l'ovulazione.

A seguire avremo la formazione del corpo luteo (CL) che è composto delle cellule follicolari rimanenti ed è associato ad un aumento di progesterone circolante che si mantiene durante tutta la vita del CL rappresentando la condizione fondamentale per la crescita embrionale e per il mantenimento di una eventuale gravidanza. Il progesterone circolante blocca inoltre altri picchi di LH e altre ovulazioni non gradite.

La regressione del corpo luteo è determinata dalla $PGF2\alpha$ che è un ormone secreto dallo stesso CL in vacche non gestanti e dai placentomi (nei bovini, la placenta è attaccata all'utero attraverso le caruncole materne ed i cotiledoni fetali che assieme formano appunto i placentomi) negli animali gravidi.

Ad esempio, nelle vacche da carne non cicliche la prima ovulazione è composta da una fase luteale corta ($\sim 7d$) a causa della secrezione precoce di $PGF2\alpha$ da parte dell'utero (Garverick *et al.*,1986; Hunter,1991; Short *et al.*,1990). In questo caso, il pretrattamento con il progesterone provoca una secrezione di $PGF2\alpha$ ritardata al 16°-18° giorno del ciclo estrale che permette una durata regolare del ciclo.

La gravidanza è accompagnata da una diminuzione della secrezione di $PGF2\alpha$ e dal mantenimento del corpo luteo (Spencer *et al.*,1995).

Al momento del parto avremo un progressivo calo di progesterone e un incremento di estrogeni, il tutto regolato dalla corteccia surrenalica del feto. L'ipofisi fetale infatti, la induce a produrre cortisolo che porterà alla sintesi di estrogeni, preparando così l'utero al parto.

Gli estrogeni, assieme all'ossitocina, sono importanti fattori che inducono la liberazione di $PGF2\alpha$ che precede di 24-36 ore il parto.

Le azioni principali della $PGF2\alpha$ sono la regressione del corpo luteo e l'aumento della contrattilità uterina. Inoltre ha un effetto indiretto sull'utero rendendo le cellule del miometrio più sensibili all'ossitocina, che ne stimola la contrattilità (Stabenfeldt *et al.*,1978).

Gli estrogeni (secreti principalmente dall'ovaio in risposta allo stimolo di un ormone ipofisario chiamato FSH) e il progesterone generano inoltre un feedback a livello di ipofisi e di ipotalamo. Generalmente gli estrogeni producono un feedback positivo stimolando l'asse

HPG (ipotalamo-ipofisi-gonadi) mentre il progesterone induce un feedback negativo inibendo l'asse HPG.

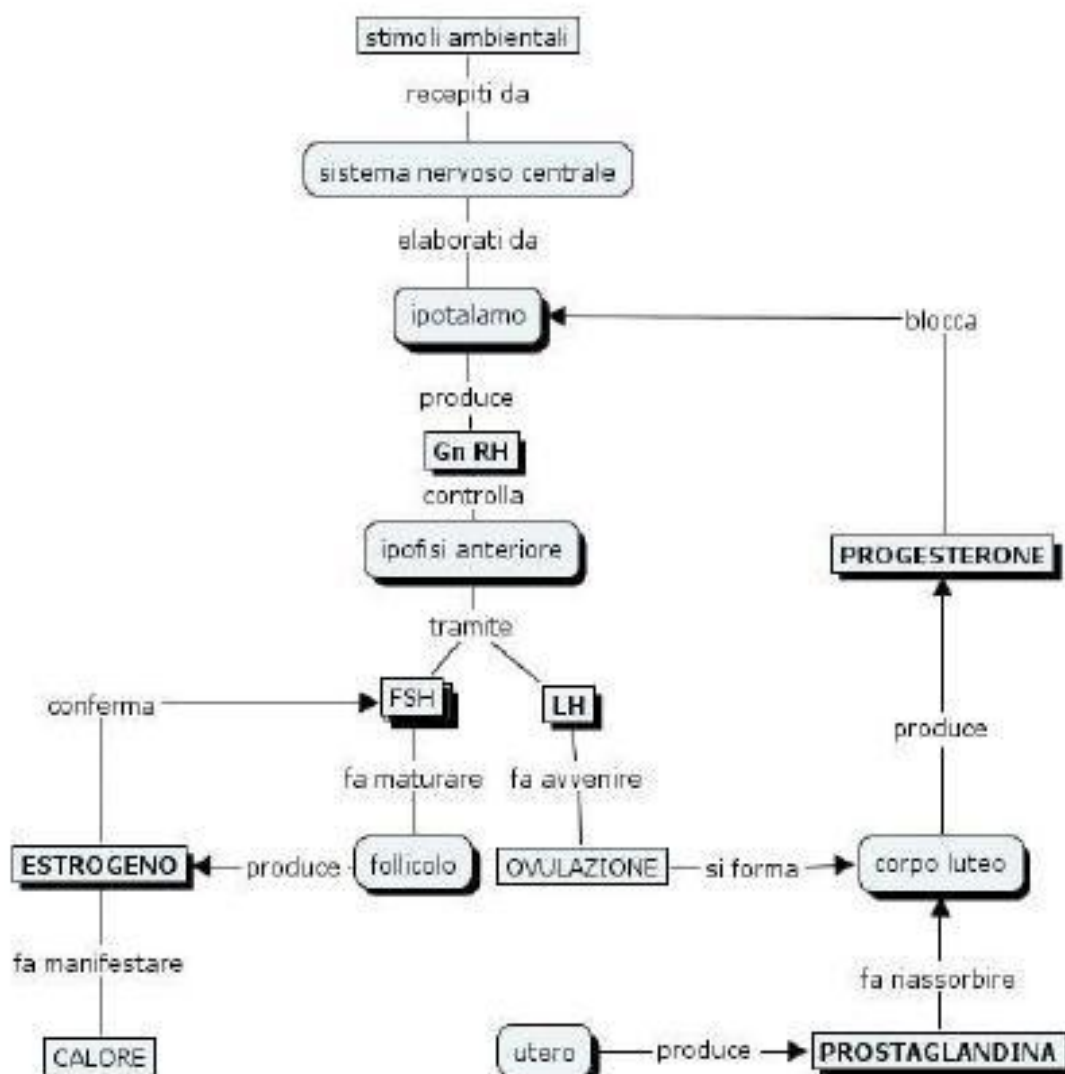


Figura 1.0 [Regolazione ormonale dell'asse HPG]
 (www.zootecnica.wikispaces.com/cicli+estrali)

1.2 Onde follicolari e crescita del follicolo

In figura 1.1 sono riportati i principali ormoni presenti nel ciclo estrale della bovina, inoltre il grafico permette di focalizzare l'attenzione sulle varie onde follicolari che si sviluppano durante i ventuno giorni di ciclo estrale.

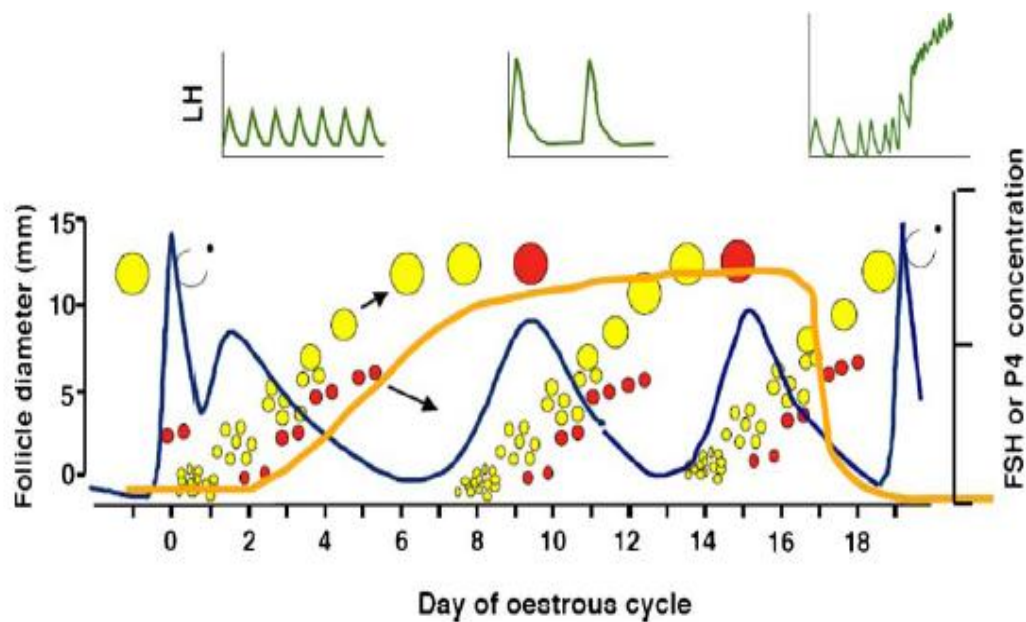


Figura 1.1 [*Onde follicolari durante il ciclo estrale della bovina da latte*]
(Medicine » Obstetrics and Gynecology » "Gonadotropin", Jorge Vizcarra;2013)

Il follicolo passa attraverso vari stadi di crescita prima di raggiungere quello finale: emergenza (~ 4 mm), deviazione (~9 mm) e ovulazione (~ 10-20 mm).

Dopo l'ovulazione, un piccolo gruppo di follicoli comincia a crescere, dando origine ad un'onda follicolare; quando è presente un corpo luteo nell'ovaio che produce progesterone, il follicolo non completa il suo sviluppo e degenera in quanto questo ormone non permette il picco di LH pre-ovulatorio. Quando le concentrazioni di progesterone circolante calano, il follicolo dominante appartenente alla seconda onda follicolare termina il suo sviluppo e ovula.

Alcuni animali presentano tre onde follicolari invece di due.

Uno studio condotto in cinque stazioni di ricerca (Cornell University, Ithaca, NY; The Ohio State University, Columbus, OH; Pennsylvania State University, University Park, PA; University of Connecticut, Storrs, CT e University of New Hampshire, Durham, NH) ha preso in considerazione 106 vacche di razza Frisone concludendo che il 68% degli animali presenta due onde follicolari mentre il restante 30%, tre.

È stato dimostrato che il ciclo estrale nelle vacche con due onde e con una fase luteale più corta dura meno rispetto agli animali che presentano tre onde follicolari ed una fase luteale più estesa (Ginther *et al.*,1989b; Taylor and Rajamahendran,1991). Nel caso siano presenti

solo due onde follicolari al momento della luteolisi, il follicolo dominante continua a crescere diventando follicolo ovulatorio (Ginther *et al.*,1898b) che presenta dimensioni maggiori rispetto a quello presente nel ciclo di tre onde follicolari.

Non è stata evidenziata una relazione tra la differente lunghezza del ciclo estrale e la fertilità, né un legame con il tasso di concepimento tra gli animali con due o tre onde follicolari.

L'FSH ha un ruolo fondamentale tra gli ormoni implicati nella crescita del follicolo.

Sia la prima onda follicolare che la seconda sono precedute da un aumento della concentrazione di FSH (Adams *et al.*,1992) e, in concomitanza con il periodo di estro, sono evidenti altri due picchi dello stesso ormone difficili da distinguere tra loro in quanto molto ravvicinati. Il primo corrisponde al picco di GnRH-LH che induce l'ovulazione, mentre il secondo avviene pressoché al momento dell'ovulazione ed è generalmente associato con l'emergenza della prima onda follicolare del nuovo ciclo estrale.

Dopo l'emergenza, il follicolo continua a crescere e l'FSH circolante decresce fino al momento della deviazione in cui raggiunge il suo livello più basso. Infatti, dopo la deviazione, il follicolo produce maggiori quantità di estradiolo secreto dai follicoli ovarici in accrescimento che agisce sinergicamente con l'inibina prodotta dai follicoli di tutte le grandezze. Sono entrambi importanti inibitori della sintesi di FSH.

La crescita del follicolo e l'estradiolo liberato dallo stesso sono regolati da *pulse* di LH: si è visto infatti che negli animali dove i *pulse* vengono soppressi tramite un trattamento cronico con GnRH-agonisti, il follicolo smette di svilupparsi oltre i 9 mm (Gong *et al.*,1995), (vedi paragrafo 1.3).

I follicoli quindi, dopo la deviazione, hanno bisogno di *pulse* di LH per aumentare di dimensione e per svilupparsi.

Le basse concentrazioni di progesterone circolante sono legate all'aumento del numero di *pulse* di LH e al prolungamento della crescita e del diametro massimo del follicolo dominante (Bergfeld *et al.*,1996; Lucy *et al.*,1992).

1.3 Modello di crescita follicolare

Di seguito è riportato un modello per sottolineare l'importanza dell'FSH e dell'LH durante la crescita follicolare.

Capitolo 1

Lo studio condotto da Crowe et al (2001) ha utilizzato manze immunizzate nei confronti del GnRH a cui vengono forniti: FSH (singoli boli da 1.5 mg pFSH), *pulse* di LH (150 µg pLH i.v ogni 4h) o entrambi i trattamenti, FSH e LH.

Negli animali trattati con il solo LH il follicolo non cresce oltre i 5 mm. Il trattamento con l'FSH causa invece lo sviluppo del follicolo fino ad una dimensione di 5-9.5 mm, mentre la crescita oltre il momento della deviazione (>10mm) avviene solo nelle manze trattate con FSH e LH.

Dunque, l'emergenza e la crescita dell'onda follicolare è imprescindibile dalla presenza di FSH e le concentrazioni di questo declinano fino a raggiungere i livelli più bassi in concomitanza con la deviazione. A questo punto il follicolo procede nello sviluppo solo se è supportato da *pulse* di LH e continua fino a che le concentrazioni di estradiolo sanguigno non sono sufficienti per indurre il picco di LH e l'ovulazione.

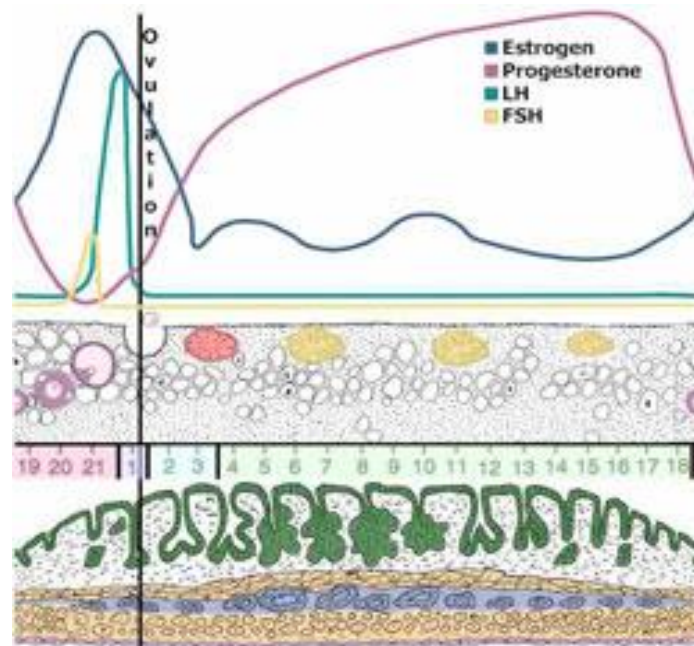


Figura 1.2 [Variazioni delle gonadotropine durante il ciclo estrale della bovina da latte]
(The Adverse Effect of Phytoestrogens on the Synthesis and Secretion of Ovarian Oxytocin in
Cattle, Mlynarczuk J et al; 2009)

1.4 Formazione del corpo luteo (CL) e importanza dell'LH per il mantenimento del CL

Il CL è una ghiandola endocrina che si sviluppa a partire dal follicolo di Graaf dopo l'ovulazione ed è fondamentale per supportare la gravidanza nei mammiferi.

L'LH è l'ormone essenziale per il mantenimento della produzione di progesterone da parte delle cellule luteali in molte specie ed è il principale ormone luteotropo nella vacca (Simmons e Hansel, 1984). In questi animali, il rilascio dei *pulse* di LH è maggiore nella fase follicolare (circa 7 *pulse* in 12 ore) in confronto ai *pulse* liberati a metà della fase luteale (circa 3 *pulse* in 12 ore), (Cupp *et al.*, 1995).

In questo secondo momento, i *pulse* di LH sono legati alla secrezione di progesterone (Walters *et al.*, 1984) da parte del corpo luteo, mentre non esiste una relazione tra i due eventi durante la fase luteale precoce (Rhodes *et al.*, 1995).

La relazione tra il progesterone e i *pulse* è stato studiato da Peters *et al.* (1994) nelle pecore tramite l'abolizione dei *pulse* di LH al sesto giorno del ciclo estrale utilizzando un antagonista del GnRH (Giorno 0 = estro). Il risultato è stata una leggera diminuzione del progesterone nel sangue.

Se gli animali però venivano trattati con il GnRH-antagonista il tredicesimo giorno del ciclo, la secrezione di progesterone diminuiva drasticamente con la regressione immediata del corpo luteo e la perdita della gravidanza in atto.

Nelle vacche invece, i *pulse* di LH sono importanti per lo sviluppo del corpo luteo, ma non sono fondamentali per il mantenimento delle funzioni luteiniche (Peters *et al.*, 1994).

Infatti se il trattamento con antagonisti GnRH viene eseguito tra il secondo e il settimo oppure tra il settimo e il dodicesimo giorno del ciclo estrale, avremo una diminuzione delle funzioni luteali rispetto agli animali del gruppo di controllo. Se l'iniezione viene fatta tra il dodicesimo e il diciassettesimo giorno questo non accade e le concentrazioni di progesterone in circolo rimangono elevate (Peters *et al.*, 1994).

Il rilascio episodico di LH prima del momento ovulatorio è importante per avere un'ottimale maturazione del follicolo ovarico dominante (Hunter, 1991) e la presenza dei *pulse* di LH prima e dopo l'ovulazione è fondamentale per lo sviluppo e per il funzionamento ottimale del CL nella vacca (Quintal-Franco *et al.*, 1999), (vedi paragrafo 1.5).

1.5 Importanza dell'LH per lo sviluppo del CL

Quintal-Franco et al., (1999) in uno studio eseguito sulle bovine dimostrano come l'abolizione dei *pulse* di LH, in momenti diversi del ciclo estrale, influenzi lo sviluppo del corpo luteo partendo dal presupposto che nella bovina da latte esiste una netta differenza tra lo sviluppo funzionale e strutturale del CL.

E' stato evidenziato che l'inibizione del rilascio episodico di *pulse* di LH nelle 48 h precedenti al picco ovulatorio porta allo sviluppo di un corpo luteo più piccolo di diametro e con una secrezione di progesterone minore rispetto agli animali del gruppo di controllo.

Allo stesso modo, il rilascio episodico di *pulse* di LH dopo il picco ovulatorio è importante per lo sviluppo di un corpo luteo funzionale nella bovina. Il diametro del CL, sviluppatosi senza il rilascio di questi *pulse*, è del 60% rispetto a quello degli animali del gruppo di controllo e la secrezione del progesterone risulta inibita del 25%. L'LH rilasciato durante il picco pre-ovulatorio infatti non è sufficientemente luteotropico per poter supportare la secrezione adeguata di progesterone da parte del corpo luteo.

Le cellule luteali della teca e della granulosa richiedono infatti la stimolazione di *pulse* di LH durante tutta la fase peri-ovulatoria per lo sviluppo di una struttura luteale con un diametro corretto e con capacità steroidogeniche appropriate (Quintal-Franco *et al.*, 1999).

1.6 Regolazione dell'asse HPG

Herbison (1997,1998) e Smith e Jennes (2001) hanno approfondito il ruolo di differenti aree del cervello e, in particolare, dell'ipotalamo nel controllo e nel mantenimento dei normali profili ormonali all'interno dell'asse HPG.

Il sito più importante di regolazione della produzione di GnRH sono i neuroni presenti nell'area preottica mediale dell'ipotalamo (MPOA).

Il controllo preciso della frequenza dei pulsati di GnRH e della loro ampiezza è un requisito fondamentale per la produzione e per l'adeguata secrezione di GnRH-LH e l'alterazione di questo meccanismo può avere effetti deleteri sul generarsi di un normale picco di LH portando ad una riduzione della fertilità.

Esiste una chiara relazione tra le cellule neuronali e la soppressione della secrezione di GnRH da parte del MPOA (Herbison, 1998). Tutte le cellule GABA-ergiche che creano sinapsi con i neuroni GnRH hanno recettori steroidei e sono estremamente sensibili a questi ormoni.

Durante la prima fase follicolare, in presenza di concentrazioni di progesterone in declino, l'estradiolo inibisce il sistema auto-inibitore delle cellule GABA quindi concentrazioni elevate di questo sono rilevate nell'MPOA, che mantiene la soppressione della secrezione di GnRH-LH.

L'esposizione più prolungata all'estradiolo durante la fase follicolare media aumenta la noradrenalina nell'MPOA che culmina nella fase follicolare finale appena prima del picco di GnRH-LH (Robinson *et al.*,1991).

La diminuzione dell'influenza del GABA a favore della noradrenalina porta ad un picco della secrezione di GnRH (Herbison,1998) e spiega le osservazioni riportate da Narayana e Dobson (1979) nelle pecore su come questo neurotrasmettitore somministrato nella tarda fase follicolare stimoli la secrezione di LH, mentre gli antagonisti ne bloccano il picco. Nella fase luteale infine il progesterone aumenta il tono del GABA mantenendo una bassa frequenza dei pulsii di GnRH.

Per concludere è chiaro che l'attività del GABA e del GnRH nella MPOA sono modulate dai neuroni responsivi alla noradrenalina in risposta a cambi di concentrazione dell'estradiolo.

	LIVELLI DI PROGESTERONE	LIVELLI DI ESTRADIOLO	LIVELLI DI GABA/ NORADRENALINA	CONSEGUENZE
FASE FOLLICOLARE PRECOCE	Bassi	In aumento	In aumento GABA	Soppressione dei <i>pulse</i> di GnRH/LH
FASE FOLLICOLARE MEDIA	Bassi	Alti	In aumento NORADRENALI NA	Diminuisce la soppressione dei <i>pulse</i> GnRH/LH che culmina con il picco di LH ovulatorio
FASE LUTEALE	Alti	Bassi	In aumento GABA	Bassa frequenza dei <i>pulse</i> di GnRH/LH

Figura 1.3 [Relazione tra GABA, noradrenalina ed estradiolo sui pulsii di GnRH/LH]

1.7 Alterazioni del processo ovulatorio

La crescita dei follicoli dall'emergenza alla deviazione è legata a cambiamenti dell'FSH che, come già descritto, raggiunge il picco al momento dell'emergenza. Si pensa che il mancato

sviluppo follicolare sia dovuto ad una carenza di FSH però le cause non sono ancora state chiarite in maniera esaustiva. Questa situazione risulta invece evidente durante il bilancio energetico negativo marcato del periodo post-partum (vedi capitolo 3).

Sono molto più comuni le situazioni legate al passaggio del follicolo dalla fase di deviazione a quella di ovulazione (Adams *et al.*,1994; Evans *et al.*,1994; Melvin *et al.*,1999) e quelle relative al periodo di lattazione che segue il parto, in cui gli animali presentano ovaie piccole senza corpo luteo o il follicolo presenta dimensioni inadatte per ovulare. In ogni caso avviene la crescita del follicolo e lo sviluppo di onde follicolari anche durante questi periodi.

Il periodo pre-pubere e il post-partum vengono trattati nei prossimi paragrafi in quanto, pur essendo condizioni fisiologiche nella vita degli animali, sono entrambe caratterizzate dall'inibizione dell'estradiolo sulla secrezione di GnRH che porta ad un'alterazione a livello ovulatorio (Schillo,1992).

1.7.1 Manze prepuberi

È stato molto difficile riuscire a studiare la dinamicità ovarica negli animali prepuberi a causa dei problemi legati all'esecuzione di ultrasonografie trans-rettali in soggetti ancora poco sviluppati. Certamente il follicolo cresce oltre la deviazione (8.5 mm).

Negli animali prepuberi le onde sono precedute da un aumento dell'FSH (Adams *et al.*,1994) e sono caratterizzate dalla deviazione e dalla crescita del follicolo dominante (Evan *et al.*,1994). La massima dimensione di questo follicolo aumenta dalle 2 alle 34 settimane di vita da 8.5 mm a 11.9 mm e il follicolo subordinato aumenta dalle 2 alle 8 settimane di vita dell'animale dai 6 mm ai 7 mm, poi le sue dimensioni rimangono costanti.

Questo dimostra che la deviazione follicolare durante il periodo prepubere avviene come nelle vacche adulte.

Prima della deviazione il diametro massimo del follicolo raggiunge i 14 mm (Evan *et al.*,1994), mentre avvicinandosi alla pubertà aumentano il tasso di crescita, le dimensioni (Melvin *et al.*,1999) e le concentrazioni di estradiolo prodotte dal follicolo che inducono il picco di GnRH-LH e l'ovulazione.

L'ipotalamo in questi periodo è estremamente sensibile all'inibizione dell'estradiolo prodotto dal follicolo (Day *et al.*,1987; Melvin *et al.*,1999). Man mano che ci si avvicina alla pubertà

l'inibizione dell'estradiolo sull'asse ipotalamo-ipofisario diminuisce e la sua concentrazione in circolo aumenta.

Quindi, in vacche prepuberi, le ridotte concentrazioni di estradiolo sono estremamente inibitorie per la secrezione di LH, perché riducono i *pulse* di GnRH. Avvicinandosi alla pubertà, il numero di recettori per l'estradiolo nella parte mediale basale dell'ipotalamo diminuisce, determinando una possibile riduzione del feedback negativo dell'estradiolo sul rilascio dei *pulse* (Day *et al.*,1987).

La successiva crescita nella frequenza dei *pulse* di LH permette lo sviluppo del follicolo dominante e la conseguente ovulazione.

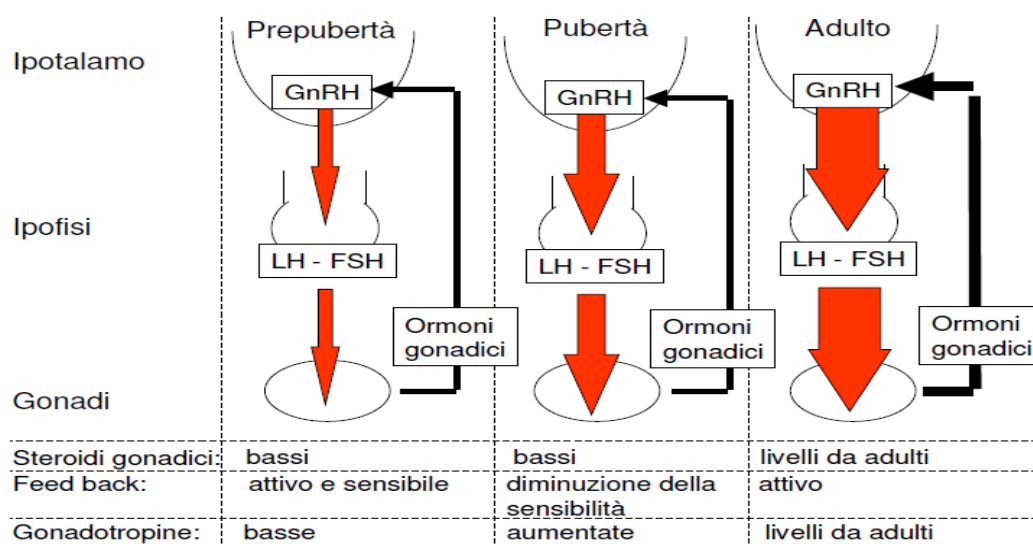


Figura 1.4 [Variazioni ormonali nei periodo pre-pubere, pubere e adulto, -modificata-]

1.7.2 Vacche nel post-partum

Nel post-partum le vacche si trovano a dover affrontare un periodo di bilancio energetico negativo. Aumentando l'ingestione di alimento secco le vacche si riportano in bilancio positivo o neutro dopo più o meno otto settimane dal parto (Roche *et al.*,2000). Il momento della prima ovulazione è variabile tra gli animali ed è legato alla durata del bilancio energetico negativo di ciascun animale (Staples *et al.*,1990), (vedi capitolo 3).

Quando la vacca ritorna ad avere un bilancio energetico positivo o nullo, ricominceranno a prodursi i *pulse* di LH e il follicolo ritornerà ad avere dimensioni tali da poter ovulare (Butler *et al.*,2000).

Ovviamente in questo caso è utile fornire all'animale una dieta ottimale che gli permette di raggiungere condizioni favorevoli il più velocemente possibile dopo il parto, ristabilendo così i fisiologici *pulse* di LH e l'ovulazione.

1.7.3 Anovulazione in presenza di corpo luteo

Una delle cause più comuni di mancata ovulazione è la presenza di tessuto luteinico nelle ovaie.

Un esempio tipico è ciò che accade durante la gravidanza in cui si sviluppano onde follicolari ma chiaramente i follicoli non ovulano (Ginther *et al.*,1989; Ginther *et al.*,1996). Questo, è un avvenimento fisiologico e non viene considerato un problema riguardante l'efficienza riproduttiva degli animali a meno che le vacche non presentino un corpo luteo persistente in assenza di una gravidanza.

Una situazione frequente è quella in cui l'animale ovula e si forma un corpo luteo che però non regredisce fino al trentottesimo giorno del ciclo estrale. La concentrazione di progesterone sierico si mantiene elevata, superiore a 1.5 ng/ml, dal sesto al trentottesimo giorno del ciclo. Questi animali presentano solo tre onde follicolari durante questo arco di tempo e il follicolo che ovula è quello appartenente alla terza onda follicolare.

Bulman e Lamming (1977) hanno stimato che l'1.5% su un totale di 300 animali presentava persistenza del corpo luteo; Bulman e Wood (1980) hanno ugualmente rilevato una bassa incidenza del problema (1,9% su 533 animali) in vacche con un ciclo estrale superiore ai 30 giorni e con una concentrazione di progesterone nel latte superiore a 3 ng/ml. Ball e McEwan (1998) hanno evidenziato invece una incidenza più spiccata di persistenza del corpo luteo (> di 24 giorni) in vacche che ovulano nei 25 giorni dopo il parto rispetto a quelle che ovulano tra i 25 e i 45.

Il problema è più frequente quando la persistenza del corpo luteo si associa ad anomalie anatomiche uterine, alla presenza di infezioni a questo livello o alla mancata involuzione uterina, fattori che possono ridurre la produzione di PGF2 α o il trasporto di PGF2 α all'ovaio permettendo la persistenza di un corpo luteo.

La persistenza di tessuto luteinico può essere inoltre legata alla presenza di cisti follicolari o luteiniche la cui differenza è difficilmente evidenziabile mediante palpazione rettale (Farin *et al.*,1992) e la risoluzione più efficace di questo problema è un trattamento con PGF2 α .

1.8 Fattori patologici che alterano la normale funzionalità ovarica

Dopo aver analizzato i fattori fisiologici che portano ad una alterazione del normale ciclo estrale nella bovina da latte, trattiamo i fattori patologici e le condizioni che alterano la normale fisiologia del suo apparato riproduttore.

1.8.1 Iponutrizione, cisti follicolari ed endotossine

In caso di estrema iponutrizione il follicolo emergente non riesce a svilupparsi oltre il momento della deviazione, anche se a questo livello non sono purtroppo disponibili ulteriori approfondimenti.

Ciò che invece impedisce il passaggio del follicolo dalla fase di deviazione a quella di ovulazione è l'iponutrizione legata al pronunciato feedback negativo dell'estradiolo sul picco di GnRH-LH (vedi capitolo 3).

Un'altra condizione non ovulatoria frequente nelle vacche da latte è la presenza di cisti follicolari o di dimensioni follicolari superiori al normale.

Queste condizioni sono legate all'insensibilità dell'ipotalamo al feedback positivo generato dall'estradiolo. Un aumento del progesterone circolante risulta essenziale per aumentare i pulsii di GnRH-LH permettendo la crescita del follicolo o resettando la mancata risposta dell'ipotalamo all'effetto di feedback positivo dell'estradiolo (Vedi paragrafo 1.9).

Le endotossine vengono inoltre prese in considerazione nel corso di questo lavoro in quanto provocano stress e liberazione degli ormoni dell'asse HPA (ipotalamo-ipofisi-surrene) che agiscono negativamente a livello di sfera riproduttiva e fertilità degli animali. La presenza di endotossine porta inoltre ad un ritardo nell'ovulazione (vedi capitolo 2).

1.9 Cisti follicolari

Le cisti follicolari sono strutture di diametro superiore ai 2,5cm che rimangono a livello ovarico per più di 10 giorni in assenza di un corpo luteo (CL).

Hanno un'incidenza tra il 6 e il 9% nelle vacche da latte (Garverick,1997) mentre nelle primipare e nelle vacche da carne si presentano più raramente.

Esistono due tipi di cisti: benigne e patologiche; entrambe si suddividono in luteiniche e in follicolari.

Capitolo 1

Le prime (benigne luteiniche) presentano un CL con una cavità interna mentre quelle follicolari sono difficili da rilevare e vengono diagnosticate, il più delle volte, accidentalmente.

Le cisti patologiche follicolari sono caratterizzate da una parete sottile, producono estradiolo, possono essere leutinizzate tramite somministrazione di GnRH e non rispondono alla PGF2 α ; esistono poi le cisti patologiche luteiniche caratterizzate da parete con spessore maggiore di 3mm, producono progesterone e regrediscono tramite iniezione con PGF2 α .

I fattori legati al rischio di sviluppo di cisti ovariche sono:

- Variazioni nel periparto
- Stagione del parto
- Patologie puerperali (ritenzione placenta, metrite, ecc)
- Stress produttivo con ipersurrenalismo e β -endorfine
- Età e numero dei parti
- Genetica
- Alimentazione (transizione scorretta con crisi energetica grave essenziale o mediata da ipocalcemia subclinica).

I sintomi legati alla presenza di cisti sono: anestro, ninfomania e irregolarità nella ciclicità ovarica.

La diagnosi viene eseguita tramite palpazione rettale ed esame ecografico oppure tramite la misurazione del progesterone nel sangue o nel latte.

Al giorno d'oggi la valutazione del progesterone porta alla conclusione che le vacche ad alta produzione presentano un ritardo nel ritorno alla ciclicità e che il 49% degli animali soffra di disfunzioni ovariche nel post-partum (Atti della Conferenza SIET, 2-3 Ottobre, Abano Terme).

Gli animali che presentano cisti hanno concentrazioni elevate di estradiolo (Yoshioka *et al.*,1998) ma non presentano un picco di LH, dovuto al fatto che l'asse ipotalamo-ipofisario in questo momento è meno responsivo all'estradiolo (Kesler *et al.*,1979).

Altri studi mostrano che il picco di LH non si verifica in presenza di iniezioni di estradiolo esogeno (Dobson *et al.*,1987; Gümen *et al.*,2001; Gümen e Wiltbank,2000; Ribadu *et al.*,1999)

In passato si è visto che animali con follicoli di dimensioni superiori alla media e condizioni anovulatorie presentavano bassi livelli di progesterone circolante (<0.2 ng/ml) (Gumen e

Wiltbank,2001); al contrario, Hatler et al (2000) riscontrarono concentrazioni di progesterone intermedie (0.1-1 ng/ml) o più consistenti (1-2 ng/ml) in molte vacche con cisti follicolari.

Altri studi infine evidenziarono lo sviluppo di grandi follicoli persistenti quando gli animali venivano trattati in modo da mantenere basse concentrazioni di progesterone (Lee *et al.*,1988; McDowell *et al.*, 1998; Noble *et al.*,2000).

Quando siamo in presenza di un follicolo ovulatorio nell'ovaio si può comunque generare un picco di GnRH/LH anche se le concentrazioni di progesterone circolante non sono adeguate (Gümen *et al.*,2001; Gümen e Wiltbank.,2000).

Le cisti dunque sono il risultato di un blocco del normale feedback positivo dell'estradiolo a livello di GnRH (Gümen *et al.*,2001;Ribadu *et al.*,1994; Yoshioka *et al.*,1998). L'ipotalamo diventa quindi insensibile all'effetto di feedback positivo dell'estradiolo fino a che la riesposizione al progesterone non resetta la mancata risposta.

Questo dimostra che la presenza di cisti o di follicoli di dimensioni maggiori al normale è legata ad un blocco a livello ipotalamico più che a livello ovarico.

1.9.1 Induzione sperimentale delle cisti follicolari

I trattamenti di induzione delle cisti follicolari solitamente utilizzano estrogeni e progesterone. Questi trattamenti sono normalmente seguiti da un periodo in cui non avviene l'ovulazione e successivamente dallo sviluppo di cisti ovariche in alcuni animali.

In questi studi, il follicolo dominante viene aspirato due giorni dopo la regressione del corpo luteo con PGF2 α e poi l'animale viene trattato con estradiolo benzoato o valerato due giorni dopo l'aspirazione, allo scopo di leutinizzare le cisti o i follicoli presenti.

Gümen et al. (2001) hanno trattato sette bovine in questa maniera. Di queste, tre hanno sviluppato delle strutture simili a cisti follicolari e non hanno ovulato, mentre le altre quattro bovine hanno sviluppato tessuto luteale ed hanno prodotto progesterone. Questi ultimi soggetti hanno mantenuto l'attività ciclica ed hanno ovulato. È ipotizzabile che la presenza di tessuto luteale attivo sia un prerequisito per il mantenimento dell'attività ciclica ovarica.

Dopo 40 giorni durante i quali le onde follicolari si susseguivano regolarmente, le vacche furono trattate con un dispositivo CIDR o PRID (spirale contenente progesterone). Questo trattamento non causava la regressione dell'onda follicolare però, dopo la rimozione del dispositivo, il follicolo dominante ovulava.

L'emergenza, la deviazione e la crescita del follicolo fino a dimensioni pre-ovulatorie non risultano alterate in questi animali, anche se il risultato è la presenza di una ciste.

Ciò che si verifica è l'aumento di estradiolo non relazionato al picco di GnRH-LH.

Questo studio evidenzia la presenza di un problema a livello ipotalamico che non permette la normale secrezione di GnRH conseguente alla crescita dell'estradiolo. L'ipofisi risulta invece normalmente responsiva al GnRH (Ribadu *et al.*,1994), nuovamente sottolineando l'importanza del problema esistente a livello ipotalamico.

1.9.2 Risoluzione delle cisti follicolari

Una possibilità per risolvere questo problema è aspettare la risoluzione spontanea anche se evidentemente comporta effetti negativi a livello economico per l'allungamento del periodo parto-prima fecondazione artificiale (FA), per il parto-primario concepimento e per l'aumento del numero di FA per gravidanza (Hooijer *et al.*,2001; Lopez-Gatius *et al.*,2002). Si stima che una risoluzione spontanea del problema avvenga nel 40-70% dei casi nei primi 50 giorni dopo il parto (PP) e quindi alcuni ricercatori ritengono inefficace intervenire in questo intervallo di tempo (Grunert *et al.*,1992; Jou *et al.*,1999). Un altro intervento possibile è il trattamento immediato del problema (Hooijer *et al.*,2001; Hooijer *et al.*,1999; Dinsmore *et al.*,1989) individuando il momento ideale intorno ai 45 giorno PP per avere la massima sicurezza di successo (Grunert *et al.*,1992; Lopez-Gatius *et al.* 2002).

La rimozione del contenuto delle cisti può avvenire invece tramite rottura manuale o aspirazione con lo scopo di interrompere l'interferenza degli steroidi o dei metaboliti presenti nei fluidi cistici sulla funzionalità dei neuroni ipotalamici secernenti GnRH (Borykzo *et al.*,1995). Contrariamente a quanto riportato da Vasquez et al (1984) secondo cui un aumento della progesteronemia entro 7 giorni dalla rottura delle cisti dipenderebbe dall'aumentato rilascio di LH, sembra che i prodotti delle cisti non interferiscano sulla liberazione di LH e che non siano coinvolti nella formazione e nel mantenimento delle cisti stesse (Nanda *et al.*,1989).

Questo metodo di rottura manuale delle cisti è da effettuarsi solo nel caso di formazioni a parete molto sottile e di piccole dimensioni; altrimenti si può agire tramite aspirazione alla cieca o eco guidata.

Eventualmente per rimuovere le cisti si può procedere con trattamenti ormonali utilizzando:

- Progesterone (P4): CIDR o PRID per 9-14 giorni. Questa terapia avrebbe la capacità di modulare l'azione dell'asse ipotalamo-ipofisario riducendo la pulsatilità dell'LH e

sincronizzando nuove ondate follicolari che producono follicoli preovulatori al termine della sua azione.

- HCG: causa la leutenizzazione delle cisti o l'ovulazione di follicoli compresenti con conseguente aumento della progesteronemia.
- GnRH: induce la liberazione netta e rapida di un picco di LH entro i sessanta minuti dall'iniezione EV con ritorno a livelli basali in settantadue ore. E' in grado di determinare la leutenizzazione della cisti e l'ovulazione di follicoli compresenti con successiva insorgenza di una fase luteale.

Tratto da: www.ruminantia.it/cisti-follicolari-nella-bovina-da-latte

La strategie per ridurre l'incidenza di cisti è sicuramente basata sulle misure di prevenzione nei confronti di infezioni uterine (Erb *et al.*,1981; Erb *et al.*,1973) e di infusioni intrauterine di endotossine che sono correlate con la presenza di alte concentrazioni di cortisolo che provoca la soppressione del picco di LH (Bosu *et al.*,1987; Peter *et al.*,1989).

Altri studi hanno dimostrato che il trattamento con ACTH può indurre la formazione di cisti follicolari nelle manze (Ribadu *et al.*,2000; Ribadu *et al.*,1999).

Quindi la riduzione dello stress e delle infezioni può essere una misura efficiente per aiutare a prevenire l'inizio di condizioni patofisiologiche che degenerano nella produzione di cisti follicolari.

Inoltre si suggerisce un trattamento profilattico con GnRH nel periodo post-partum (Britt *et al.*,1974; Britt *et al.*,1977).

CAPITOLO 2

L'ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-SURRENE, STRESS E FERTILITA'

2.1 Lo stress

Lo stress è un'alterazione dell'omeostasi fisiologica dell'organismo che dipende da un sovraccarico di stimoli che comportano usura e scompenso psico-fisico. Tradotto nella realtà dell'allevamento animale è causa di molti problemi, inclusa l'infertilità (Dobson e Smith, 2000).

Se si volesse dare una sommaria definizione di stress si potrebbe generalizzare definendolo con l'incapacità di un soggetto di interagire con il suo ambiente, fenomeno che si concretizza con la mancata realizzazione del pieno potenziale genetico, in particolare per quanto riguarda la produzione di latte, la resistenza alle malattie, il tasso di crescita e la fertilità.

Molti agricoltori e veterinari hanno a che fare con questa condizione intangibile, ma spesso non sono in grado di attribuire allo stress cause ben precise e specifiche che sono invece dimostrabili a livello neuro-endocrino (vedi paragrafo 2.6).

2.2 Situazioni stressanti che riducono la fertilità.

L'aumento della produzione di latte è associato ad una riduzione della fertilità nelle vacche lattifere (Butler *et al.*, 2000). Inoltre, un calo della stessa, può verificarsi in concomitanza di cambiamenti ambientali o in situazione di alterazioni delle condizioni fisiologiche, quali zoppie, ipocalcemia e soprattutto mastiti.

Le mastiti possono essere cliniche o sub-cliniche, acute o croniche. Sono un evento doloroso e quelle sub-cliniche di solito vengono diagnosticate tramite l'aumento delle cellule somatiche nel latte (>400.000 cells/ml). Le mastiti hanno un'incidenza molto elevata nell'allevamento della bovina da latte con circa il 20-40% degli animali che presenta infezioni batteriche della mammella, molto spesso in forma subclinica. Circa il 30% delle bovine con questa mastite mostra un ritardo nell'ovulazione, nel restante 70% dei casi invece il tempo intercorrente tra l'estro e l'ovulazione non varia. Le vacche con mastite sub-clinica presentano una

concentrazione più bassa di estradiolo nel plasma prima della comparsa dell'estro. Sorprendentemente in questi soggetti, diversamente da quanto registrato negli animali con mastite clinica, i livelli più bassi di estradiolo non sono associati ad alcuna alterazione della secrezione pulsatile di LH o della concentrazione di cortisolo. Un altro studio però ha dimostrato che circa un terzo delle bovine con mastite subclinica presenta un contenuto ridotto di steroidi (estradiolo e androstenedione) nel liquido dei follicoli preovulatori e che tale riduzione è associata ad una ridotta espressione dei geni coinvolti nella sintesi di questi ormoni. Inoltre, nelle bovine con mastite si osserva una qualità più bassa degli ovociti. Questo trova riscontro nella ridotta percentuale di blastocisti nel caso in cui gli ovociti di bovine affette da mastite vengano utilizzati per la produzione di embrioni in vitro. Tuttavia le ragioni per cui tutto ciò si verifica solo nel 30% delle bovine restano ancora da chiarire.

Tratto da: www.ruminantia.it/le-mastiti-alterano-l'efficienza-riproduttiva-e-riducono-il-tasso-di-concepimento-nella-bovina-da-latte/

La fertilità è minore anche dopo un parto cesareo. Un ritardo nell'involuzione uterina dopo un parto distocico è associato a ciclicità ovarica anormale e a un ritardo nell'instaurarsi della successiva gravidanza (Dobson *et al.*,2001). In tale situazione, l'intervallo parto-concepimento può allungarsi di circa 13/14 giorni e sono richiesti 0.5 interventi di inseminazione in più rispetto alla media perché l'animale resti gravido (Dobson e Smith,2000).

La fertilità può essere alterata anche da cambiamenti "sociali" all'interno della mandria. Le vacche che incrementano il loro stato sociale sono più fertili e hanno una migliore produzione di latte (Dobson e Smith,2000) rispetto a quelle che invece scendono di livello nella scala gerarchica del gruppo.

Uno dei fattori principali che verrà trattato nel corso di questo lavoro è come l'utilizzo di una adeguata nutrizione abbia effetti diretti sulla riproduzione (Butler,2000) e altrettanti effetti indiretti alterando le risposte allo stress e quindi la fertilità dell'animale (Forhead *et al.*,1997). Una evidenza del fatto che gli stressor sociali influenzano l'efficienza riproduttiva nelle vacche da latte è stata raccolta confrontando i dati di fertilità di vacche normali con quelli ottenuti da mandrie che soffrono condizioni di stress clinici (Dobson e Smith, 2000).

	Vacche	Parto- 1° FA		Parto-Concepimento		Inseminazioni per concepire	
		Controllo	Soggetti stressati	Controllo	Soggetti stressati	Controllo	Soggetti stressati
Mastite	95	61	67	75	88	1.2	1.7
Cisti ovariche	73	63	78	77	142	1.3	3.2
Febbre	9	72	69	76	157	1.3	3.1
Zoppie	427	68	72	86	100	1.7	32.1

Tabella 2.0 [Situazioni stressanti che influenzano la fertilità] (“What is stress, and how does it affect reproduction?”, Dobson e Smith; 2000)

2.3 Asse HPA (ipotalamo-ipofisi-surrene)

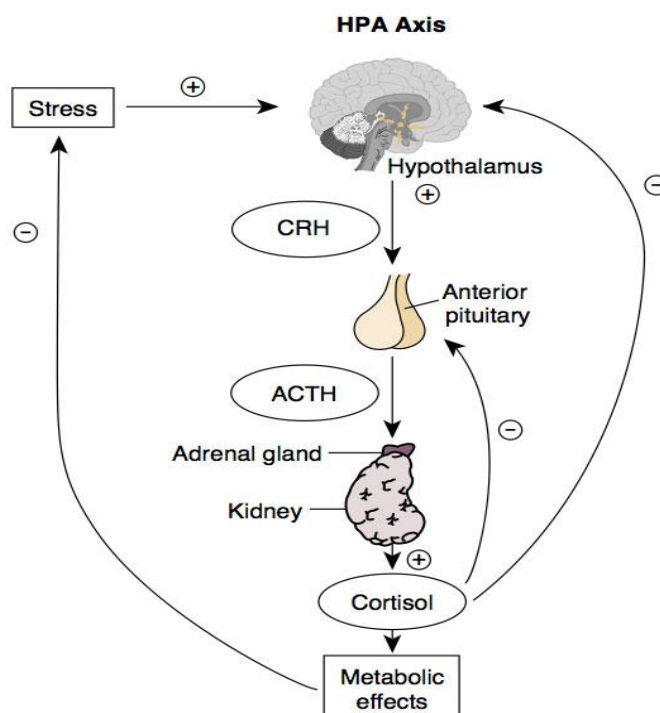


Figura 2.1 [Regolazione dell'asse HPA]

(www.thepaleomom.com/2014/08/chronic-stress-leads-hormone-imbalance.html)

Capitolo 2

L'asse HPA è un sistema neuroendocrino interessato nella risposta allo stress, attraverso la regolazione della secrezione di cortisolo (Levine e Billington,1997). Questo asse gioca un ruolo importante nella regolazione del bilancio energetico e del peso corporeo dell'animale.

L'ipotalamo rilascia il CRH (Ormone rilasciante la corticotropina), che stimola l'ipofisi a liberare ACTH (Ormone Adrenocorticotropo) prodotto da una proteina precursore, la proopiomelanocortina (POMC), che stimola a sua volta le ghiandole surrenali a secernere cortisolo.

2.4 Il cortisolo

Il glucocorticoide più importante e conosciuto è il cortisolo anche se ne esistono altri, come il corticosterone e il cortisone.

Il cortisolo influisce su vari aspetti dell'organismo quali: il controllo del metabolismo, la sensibilità all'insulina, il sistema immunitario e il flusso sanguigno. L'aumento della concentrazione di glucosio (glicemia) nel sangue è importante per assicurare la corretta attività cerebrale anche in situazioni di stress. Il cortisolo stimola l'aumento della glicemia tramite l'incremento della produzione di glucosio a partire da alcuni aminoacidi e attraverso la diminuzione del suo utilizzo periferico.

Il cortisolo agisce legando e attivando due tipi di recettori intracellulari, il recettore dei glucocorticoidi (GR) e quello dei mineralcorticoidi (MR). Il recettore attivato dal glucocorticoide agisce da fattore di trascrizione attivante, stimolando così la trascrizione di determinati geni e la sintesi di specifiche proteine.

I livelli fisiologici del cortisolo seguono un ritmo circadiano: presentano un picco a inizio mattinata, una rapida decrescita nelle ore successive e poi un declino graduale durante il giorno fino alla raggiunta di livelli minimi verso sera (Kurina *et al.*, 2005).

Eccessi di cortisolo, che si possono verificare in presenza prolungata di stressor, portano ad un aumento del rilascio di insulina da parte del pancreas, riducendo la sensibilità del tessuto muscolare e adiposo alla stessa (vedi paragrafo 3.5).

2.5 Asse HPA e HPG

Tratto da: www.thepaleomom.com/2014/08/chronic-stress-leads-hormone-imbalance

L'asse HPA e quello HPG (trattato nel primo capitolo) non sono sistemi endocrini isolati, ma hanno un legame molto forte tra loro.

Il progesterone attiva l'asse HPA mentre il cortisolo inibisce l'asse HPG a tutti i livelli: riduce la produzione di GnRH da parte dell'ipotalamo, riduce la produzione di FSH e LH da parte dell'ipofisi e le funzioni ovariche quali la secrezione di estrogeni e progesterone. Questo accade perché con l'attivazione del sistema simpatico o "combatti e fuggi", la riproduzione non è prioritaria, cosa che si verifica anche quando siamo in presenza di elevati livelli di stress.

Gli estrogeni e il progesterone diminuiscono e addirittura quest'ultimo funge da substrato per la sintesi di cortisolo.

Nella figura 2.2 viene illustrato come il colesterolo venga convertito in pregnenolone, a sua volta trasformato in DHEA o in progesterone. Il DHEA (Dehydroepiandrosterone) viene convertito in testosterone ed estrogeni, mentre il progesterone viene convertito in cortisolo e in aldosterone. Quando l'organismo è stressato inizia a utilizzare il progesterone per produrre cortisolo e se le quantità non sono sufficienti utilizza anche il pregnenolone come substrato.

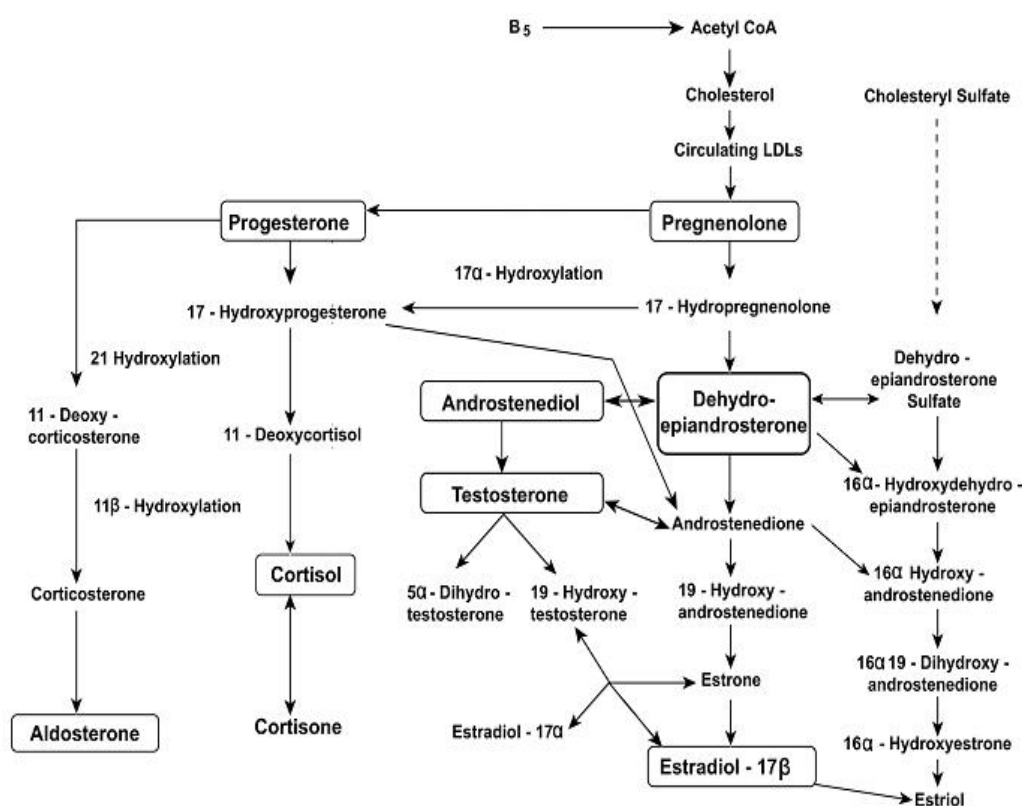


Figura 2.2 [Relazione tra asse HPG e asse HPA]

(www.thepaleomom.com/2014/08/chronic-stress-leads-hormone-imbalance).

Lo stress è quindi una sindrome di adattamento agli stressor (sollecitazioni) che possono essere di due tipi: acuti o cronici. Molti studi si sono concentrati sugli stressor cronici, mentre i meccanismi di base che mettono in relazione lo stress e la riproduzione sono relativi agli stressor acuti che possono essere più facilmente definiti e controllati.

2.6 Relazione tra stressor e HPG

La stimolazione surrenalica indotta dallo stress ritarda o inibisce il picco preovulatorio di GnRH-LH e i glucocorticoidi sono i fondamentali mediatori degli effetti inibitori dello stress sulla riproduzione (Tilbrook *et al.*,2000).

A livello di GnRH-LH abbiamo una riduzione dei pulsii nei 5-10 minuti successivi all'esposizione allo stimolo stressante, che indica un probabile effetto non genomico sulla polarizzazione delle membrane degli interneuroni. In seguito all'esposizione a stressor intensi, come un'endotossina (vedi paragrafo 2.6.2), oppure ad elevate dosi di insulina (vedi paragrafo 2.6.1) durante la fase di attivazione, il picco di LH viene ritardato di circa 10 ore.

Molti studi condotti in differenti specie animali hanno rilevato che i glucocorticoidi possono influenzare le funzioni riproduttive inibendo la secrezione di LH a vari stadi:

- A livello di ipotalamo, interagendo con gli steroidi gonadali e sopprimendo la secrezione di GnRH (Tilbrook *et al.*,2000; Dobson *et al.*,2003)
- A livello ipofisario, riducendo la sensibilità delle gonadotropine al GnRH (Breen e Kersch,2004)
- A livello ovarico, alterando la sintesi di androgeni (Spicer e Chamberlain, 1998).
- I glucocorticoidi possono inoltre aumentare la vita del corpo luteo inibendo la sintesi di PGF₂ α (Dobson *et al.*,1987).

In ogni caso, la concentrazione di glucocorticoidi deve mantenersi elevata nel plasma per un periodo di tempo abbastanza prolungato per poter avere un'influenza sulla funzionalità riproduttiva (Tilbrook *et al.*,2000).

L'effetto principale dell'interazione tra l'asse HPA e l'asse HPG, che porta alla perdita del suo equilibrio, si riferisce ad un disturbo a livello ipotalamico (Dobson *et al.*,2000; Photgat *et al.*,1997).

Durante la fase follicolare di un ciclo estrale normale, una corretta secrezione di GnRH da parte dell'ipotalamo comporta un aumento del rilascio pulsatile di LH da parte dell'ipofisi (Moenter *et al.*,1990). In sinergia con l'FSH, questo permette la crescita del follicolo e la produzione di estradiolo, che alla fine porta al picco pre-ovulatorio di LH e alla conseguente ovulazione (McNeilly *et al.*,1991).

In caso di stress è stata osservata una riduzione della fertilità perché gli stressor (acuti o cronici) interferiscono con i meccanismi che regolano la precisa tempistica degli eventi durante la fase follicolare. Il rilascio pulsatile normale di GnRH e la conseguente ampiezza e frequenza dei pulsali di LH secreti dall'ipofisi in questa situazione sono ridotti; il risultato è il ritardo o l'abolizione del picco di LH e, di conseguenza, funzioni ovariche anormali.

Gli animali rispondono in maniera distinta agli eventi stressanti e hanno sviluppato diverse strategie per ammortizzare lo stress e per compensare la perdita nel funzionamento dei meccanismi di mantenimento dell'omeostasi.

Per limitare la sovra stimolazione dell'asse dello stress e i suoi effetti negativi ci sono vari meccanismi di controllo dell'HPA, incluso il feedback negativo che il cortisolo attua a livello ipotalamico oppure ipofisario, che ne modera la risposta. Però esiste anche un meccanismo opposto (facilitazione) nell'HPA, quindi la risposta dello stesso non viene inibita completamente (Dalmann *et al.*,1992).

Riassumendo, gli stressor regolano la riproduzione a vari livelli e il sistema endocrino sembra essere un metodo ideale per coordinare l'omeostasi in tutto l'organismo (Dobson and Smith,2000).

Di seguito viene descritto ciò che avviene a livello dell'asse HPG in presenza di stressor acuti (vedi paragrafo 2.6.1), in caso di somministrazione di ACTH (vedi paragrafo 2.6.3) e in presenza di stressor cronici (2.6.4).

2.6.1 Stressor acuti e asse HPG

In uno studio condotto da Dobson e Smith (2000) viene presa in considerazione la risposta dell'organismo nei confronti di due situazioni stressanti che causano la liberazione di cortisolo: il trasporto (stress cognitivo) e l'ipoglicemia indotta dall'infusione di un bolo di insulina (stress non cognitivo).

Durante il trasporto si verifica un costante aumento sia dell'arginina-vasopressina (AVP) che dell'ormone rilasciante nel sangue corticotropina (CRH). L'ormone adrenocorticotropico (ACTH) raggiunge le concentrazioni massime nelle prime ore dall'esposizione allo stimolo

mentre le concentrazioni di cortisolo risultano più elevate durante le ore successive (Smith *et al.*, 1997).

Dopo l'iniezione del bolo di insulina avremo invece una risposta da parte del sistema HPA (crescita di AVP, CRH e ACTH) solo quando la concentrazione di glucosio si è abbassata sotto la soglia di 3 mmol/l. Avvengono cambiamenti simili al caso precedente nell'AVP, CRH e ACTH ma si verifica una diminuzione nella secrezione di AVP e CRH mentre il glucosio si mantiene a livelli elevati. Le concentrazioni di cortisolo plasmatico rimangono elevate a causa del prolungato tempo di emivita dello steroide in circolo, però se l'input stressante continua si verificherà un abbassamento delle concentrazioni di AVP/CRH a livello ipotalamico.

Questi esempi evidenziano che un input a livello ipotalamico è costante durante entrambi gli stimoli mentre l'output finale (misurato a livello di cortisolo plasmatico) è variabile in base alla situazione.

Comparando i casi sopracitati risulta che il feedback opera principalmente a livello di ipofisi per quanto riguarda il trasporto e a livello di ipotalamo per quanto concerne l'ipoglicemia indotta dal bolo di insulina. La differenza rilevata può essere legata alla risposta ipofisaria a differenti concentrazioni e rapporti AVP/CRH che vengono secreti in risposta a stimoli diversi.

	AVP	CRH	ACTH	CORTISOLO	AZIONE CORTISOLO
Trasporto	Aumenta	Aumenta	Aumenta nelle prime ore dalla presenza dello stimolo	Aumenta nelle ore successive dall'introduzione dello stimolo	Feedback negativo sull'ipofisi
Bolo di insulina	Aumenta	Aumenta	Aumenta	Aumenta e i suoi livelli rimangono elevati in circolo	Feedback negativo sull'ipotalamo

Figura 2.3 [Risposta dell'asse HPA a differenti stimoli stressanti]

Alla luce di quanto descritto, possiamo trarre la conclusione che gli stressor riducono la fertilità andando ad interagire con i meccanismi che regolano gli eventi della fase follicolare.

Gli stressori acuti (entrambi quelli che sono stati presi in considerazione) agiscono a livelli ben precisi alterando l'asse HPG. Il trasporto di 4 o 8 h riduce la frequenza e l'ampiezza dei *pulse* di LH appena si introduce lo stimolo sia nelle pecore ovariectomizzate che negli animali interi, durante la tarda fase follicolare (Dobson *et al.*,1999b; Phogat *et al.*,1999b). La riduzione della frequenza dei *pulse* di LH suggerisce un effetto di entrambi gli stressori sul GnRH, quindi a livello ipotalamico.

Gli effetti dei *pulse* di LH però possono essere mediati sia dall'ipotalamo che dall'ipofisi.

È chiaro che l'attivazione dell'asse HPA da parte degli stressor riduce la pulsatilità del GnRH/LH tramite azione a livello di ipotalamo e di ipofisi e che l'ovaio non risulta provvisto di un supporto adeguato di LH per poter svolgere le sue funzioni correttamente. Questo porta ad una ridotta produzione di estradiolo da parte dei follicoli che si sviluppano in maniera più lenta del normale. Questa ipotesi viene supportata attraverso la riduzione della frequenza dei pulsati di LH esogeno con conseguente diminuzione del cortisolo secreto in un modello di autotrapianto ovarico (Dobson *et al.*, 1999a).

La prova degli effetti di uno stressor acuto sul GnRH è stata descritta da Battaglia (1997) dopo l'amministrazione di endotossine (vedi paragrafo 2.6.2).

2.6.2 Endotossine, stressor acuto

Le endotossine possono interferire con l'attività neuroendocrina riproduttiva agendo a livello di risposta ipofisaria al GnRH e sopprimendola. Gli studi di Nappi e Rivest (1997) hanno dimostrato che l'endotossina sistemica inibisce l'espressione del recettore per il GnRH nella parte anteriore dell'ipofisi dei ratti. Gli studi eseguiti da Battaglia *et al.* (1997) sulle pecore hanno messo in luce che non sempre esiste una correlazione tra la soppressione del GnRH e dell'LH infatti in casi estremi può esserci un blocco della secrezione di LH ma con una lieve o addirittura nulla abolizione a livello di GnRH, sia endogeno che esogeno.

Il primo esperimento effettuato sulle pecore evidenzia che l'endotossina inibisce la risposta dell'ipofisi ai pulsati di GnRH endogeno, mentre il secondo studio evidenzia la stessa cosa in presenza di GnRH esogeno, tramite uso di una diversa dose di endotossina.

Il primo trattamento dimostra che non esiste una relazione tra la stimolazione di GnRH e i pulsati di LH, ma in particolare che l'endotossina provoca un blocco nella risposta dell'ipofisi al GnRH (Battaglia *et al.*,1997).

Nel secondo caso, in cui viene utilizzato GnRH esogeno, si osserva allo stesso modo che dosi elevate di endotossina provocano il blocco della risposta dell'ipofisi al GnRH, ma che si

Capitolo 2

verifica anche una minima inibizione a livello dei pulsali di GnRH, probabilmente dovuta alle dosi elevate di endotossina (Battaglia *et al.*,1997; Harris *et al.*,2000).

In tutte le pecore questa stimola la produzione di cortisolo nei 30-60 minuti successivi alla somministrazione e induce la febbre.

A livello neuroendocrino le endotossine stimolano nel contempo gli ormoni dell'asse dello stress: arginina-vasopressina, CRH, ACTH, cortisolo e progesterone (Coleman *et al.*,1993; Dobson *et al.*,1988). Ognuno di questi ormoni può essere un mediatore della soppressione indotta dall'endotossina sul GnRH e sull'LH.

Williams *et al.* (2001) hanno presentato uno studio in cui viene testata l'ipotesi che il cortisolo funga da mediatore per gli effetti inibitori dell'endotossina sulla secrezione pulsatile di GnRH e LH nelle pecore.

Si cerca di capire se un aumento di cortisolo non associato alla presenza di endotossine, sia sufficiente a sopprimere i pulsali di LH e in secondo luogo se il suo aumento in presenza di endotossine sia necessario per la soppressione del GnRH-LH.

Nel primo studio, un relativo aumento di cortisolo, atto a mimare la presenza di una bassa dose di endotossine, riduce le concentrazioni di LH plasmatico del 28%. La stessa cosa avviene con concentrazioni elevate di cortisolo, atte a mimare una dose elevata di endotossina, che porta ad una diminuzione del 45% di LH plasmatico comparato con il 40% in presenza di endotossine.

L'analisi è stata effettuata durante la stagione di anestro quando la risposta al feedback negativo degli steroidi ovarici è più elevata rispetto alla stagione riproduttiva (Robinson *et al.*,1985).

Per la prima volta è stato dunque dimostrato come i livelli di cortisolo indotti dallo stress senza la presenza di endotossine, possano inibire la secrezione pulsatile di LH in maniera acuta, ossia nel giro di 1-2 ore.

Nel secondo studio il cortisolo viene bloccato durante l'inoculo dell'endotossina tramite metipirone; comunque viene registrata la presenza di un valore basale di cortisolo nel sangue (6-16 ng/ml) ma questo è troppo basso per indurre un blocco nella secrezione di LH, che in ogni caso non risulta essenziale per l'endotossina al fine di sopprimere l'attività neuroendocrina riproduttiva.

2.6.3 ACTH e asse HPG

La somministrazione cronica di ACTH risulta in un effetto simile a quello svolto dagli stressor acuti. Il pattern pulsatile dell'LH viene disturbato, la secrezione di estradiolo risulta minore del normale, il picco di LH è ritardato e l'ovulazione può essere posticipata o abolita del tutto (Dobson *et al.*,2000).

La somministrazione di ACTH nelle vacche nel periodo del diestro risulta inoltre in un ritardo nel declino del progesterone (Kawate *et al.*,1996; Dobson *et al.*,2000; Ribadu *et al.*,2000). In manze con estro sincronizzato tramite trattamenti con progesterone (P4) e estradiolo (E2), la somministrazione di ACTH durante la fase follicolare risulta in livelli più elevati di P4 nel plasma, mentre ciò non avviene quando forniamo cortisolo succinato (Stoebel e Moberg,1982).

Inoltre è stato osservato che il P4 nel plasma declina circa un giorno prima negli animali trattati con ACTH durante la tarda fase follicolare (Li e Wagner,1983).

2.6.4 Stressor cronici e asse HPG

Si possono osservare gli stessi effetti trattati per gli stressor acuti a livello di sistema riproduttore in animali esposti a stressor cronici quali lo sviluppo di mastiti spontanee da Gram negativi nei 15-18 giorni dopo il parto (Huszenicza *et al.*,1998).

In questi animali inoltre la ripresa dell'attività ciclica è ritardata e il periodo in cui il progesterone si mantiene a livelli estrali è prolungato (14.7 ± 7.4 vs 9.1 ± 2.2 giorni).

CAPITOLO 3

ALIMENTAZIONE, REGOLAZIONE DEL METABOLISMO E ASSE HPG

La nutrizione nelle vacche da latte è legata alle funzioni riproduttive ma gli esatti meccanismi secondo cui una nutrizione inadeguata causa infertilità non sono sempre ben chiari.

In particolare nel corso di questo capitolo verranno trattati i fattori metabolici che mediano l'effetto della nutrizione sull'asse HPG e quindi sulla riproduzione.

3.1 Stato metabolico della bovina da latte e fertilità

La produzione media di latte nelle vacche è aumentata esponenzialmente durante la decade passata. Ugualmente è stato riscontrato un aumento dell'incidenza di disordini metabolici e riproduttivi (Opsomer *et al.*,2000; Lucy,2001) nelle vacche da latte ad alta produzione e ciò è causa di ingenti perdite economiche (Shrestha *et al.*,2004b).

Le vacche da latte di razza Frisona, ad esempio, hanno una vita media produttiva di massimo tre lattazioni (Hare *et al.*,2006) e l'abbattimento di questi animali a causa di infertilità rimane, al giorno d'oggi, la maggior causa di morte. Una correlazione genetica negativa tra la produzione di latte e il tasso di concepimento è stato evidenziato nelle vacche di razza Frisona (Boichard *et al.*,1998; Berry *et al.*,2003; Konig *et al.*,2008) e si sospetta che l'inadeguata nutrizione sia un fattore limitante per l'efficienza riproduttiva. Sia la qualità degli ovociti che degli embrioni infatti può essere messa in relazione con un'adeguata nutrizione (Leroy *et al.*,2008 a e b).

Le cause di infertilità, come già descritto precedentemente, possono essere molteplici ma tutte portano alla conclusione che l'animale si trova in uno stato metabolico inadatto per poter sostenere la gravidanza e di conseguenza viene abbattuto.

La maggior parte di questi animali soffre di disfunzioni ovariche post-partum (Opsomer *et al.*,2000) che sfociano in un diminuito tasso di concepimento e in un periodo di interparto più lungo del normale (Shrestha *et al.*,2004b).

Un pronunciato bilancio energetico negativo nelle vacche si sviluppa a causa dell'insufficiente disponibilità di alimento per far fronte alle necessità del post-partum e

questo comporta una mobilitazione di lipidi dal tessuto adiposo bianco (WAT) (Bauman e Currie 1980; Bell 1995, Barber *et al.*,1997, Bauman,2000).

I ruminanti cercano di adattarsi a questa situazione “stressante” tramite l’aumento della secrezione di GH (vedi paragrafo 3.5), la diminuzione della risposta muscolare all’insulina (Bell e Bauman,1997; Vernon e Pond,1997; Etherton e Bauman,1998) (vedi paragrafo 3.5) e cambiamenti a livello di concentrazioni plasmatiche di leptina (Zhang *et al.*,1994, Friedman e Halaas,1998, Ji *et al.*,1998, Ahima e Flier,2000) (vedi paragrafo 3.3).

3.2 Il bilancio energetico negativo (NEB)

Le vacche da latte al giorno d’oggi sperimentano un periodo di carenza nutrizionale (NEB) nella prima fase di lattazione dopo il parto (Lucy,2001; Whates *et al.*,2008b). E’ importante ricordare che la fertilità è influenzata anche dalle condizioni corporee (BCS) prima del parto e la condizione principale per determinare il BCS risulta essere il quantitativo di materia secca assunta dall’animale (Hayirli *et al.*,2002)

Il NEB post-partum induce cambiamenti nelle concentrazioni nel plasma di metaboliti e ormoni (Zulu *et al.*,2002b; Pushpakumara *et al.*,2003; Patton *et al.*,2007; Whates *et al.*,2007 a e b).

Questi cambiamenti a livello endocrino e metabolico associati ad una carenza nutrizionale e alla mobilitazione delle riserve corporee giocano un ruolo fondamentale nel prevenire una gravidanza in condizioni inadatte per poter essere mantenuta, attraverso l’inibizione a livello di sistema nervoso e apparato riproduttore.

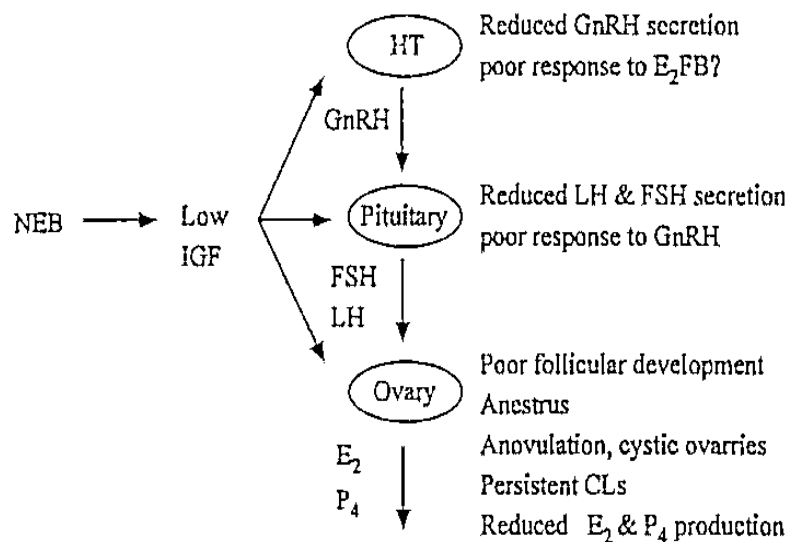


Figura 3.0 [Relazione tra NEB e asse HPG]

(Relationship among Insulin-Like Growth Factor-I, blood Metabolites and Postpartum Ovarian Function in Dairy Cows, Zulu *et al.*; 2002b)

La figura 3.0 mostra che i livelli ridotti di IGF-1 rappresentano uno dei mediatori della condizione nutrizionale nell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Ovaio (vedi paragrafo 3.5). La riduzione di IGF-1 circolante porta ad un limitato rilascio di GnRH da parte dell'ipotalamo, probabilmente dovuto all'insufficiente stimolazione dell'asse HPG. Di conseguenza avremo la produzione di bassi livelli di FSH e LH secreti dall'ipofisi e un ridotto sviluppo del follicolo, fattore associato a condizioni di anestro, sviluppo di cisti ovariche, corpo luteo persistente e ridotta produzione di estrogeni e progesterone (Zulu *et al.*, 2002).

Il tutto è indice del fatto che, come è stato visto in presenza degli stressor, il bilancio energetico negativo sia una delle cause di un ritardo nel ritorno alla ciclicità ovarica e di infertilità nella bovina da latte. Nei prossimi paragrafi, vengono presi in esame alcuni potenziali mediatori del bilancio energetico negativo implicati nella regolazione dell'attività riproduttiva.

3.3 Leptina

La leptina è una molecola chiave per capire la relazione tra i cambiamenti a livello metabolico in presenza di un bilancio energetico negativo e l'apparato riproduttore.

Questa molecola è un prodotto primario del tessuto adiposo bianco, contribuisce alla regolazione dell'ingestione di cibo, alla ripartizione delle energie e alla deposizione di tessuto

adiposo durante cambiamenti di breve o lungo termine nello stato nutrizionale (Ingvarlsen e Bosclair,2001).

La leptina viene secreta in base al grado di adiposità (Friedman e Halaas,1998, Ahima e Flier,2000; Blache *et al.*,2000, Delavaud *et al.*,2000; Ehrhardt *et al.*,2000) e agisce a livello del sistema nervoso centrale per ridurre l'assunzione volontaria di alimento (Friedman e Halaas,1998; Henry *et al.*,1999; Ahima e Flier,2000; Schwartz *et al.*,2000).

Le concentrazioni ematiche di leptina sono elevate prima del parto e in questa fase sono correlate con il BCS, declinano al parto e rimangono basse anche quando lo stato nutrizionale è migliorato (Ingvarlsen e Bosclair,2001; Whates *et al.*,2007b). Le concentrazioni dell'ormone sono più elevate nelle primipare rispetto alle multipare (Whates *et al.*,2007b) e l'ipoleptinemia nel post-partum può indurre un aumento nell'assunzione di alimento e contribuire alla resistenza all'insulina dei tessuti periferici (Ingvarlsen e Bosclair,2001).

I recettori per la leptina sono presenti a livello del follicolo ovarico, del corpo luteo (Spicer, 2001) e a livello endometriale (Thorn *et al.*,2007) e un'adeguata espressione recettoriale deve essere raggiunta affinché si instauri la pubertà (Cunningham *et al.*,1999).

La leptina ha un effetto diretto sul sistema nervoso centrale, poiché contribuisce alla regolazione della secrezione di LH (Blanche *et al.*,2000). Questo evidenzia la relazione tra la concentrazione di leptina nel plasma e la prima ovulazione post-partum nelle vacche da latte. Il ritardo nel ritorno alla ciclicità di questi animali è relazionato al recupero nella secrezione di leptina, fondamentale per il verificarsi della prima ovulazione post partum.

Nel post-partum, i pulsuri di LH risultano inibiti (Butler,2000) finché i livelli di leptina sono bassi, in quanto l'attività del GnRH è soppressa (Kadokawa e Yamada,2000).

Una concentrazione troppo elevata di leptina prima del parto causa un ritardo nel recupero della ciclicità e un aumento dell'intervallo parto-concepimento, cosa che accade in particolare nelle vacche multipare rispetto alle primipare (Whates *et al.*,2007a). Elevate concentrazioni di leptina inoltre inibiscono la secrezione di insulina e la produzione di estradiolo stimolata dall'IGF1 nelle colture di cellule della granulosa (Spicer,2001); inoltre ha un effetto sinergico con l'IGF1 nella produzione di progesterone luteale (Nicklin *et al.*,2007).

La leptina inoltre ha un effetto diretto sulle ovaie. Questa molecola promuove infatti la maturazione degli ovociti *in vitro* aumentando sia il tasso di fertilità che le % di uova fecondate che si sviluppano fino alla fase di blastocisti (Boelhaue *et al.*,2005).

Un severo bilancio energetico negativo nel post-partum influenza il ritorno alla ciclicità dell'animale fino a quando migliori condizioni corporee non permettano l'aumento dei livelli

di leptina. Un'attività alterata di questa dunque, può avere effetti indiretti sulla fertilità agendo attraverso cambiamenti nello stato del bilancio energetico.

Nei ruminanti sono necessarie condizioni molto severe di iponutrizione affinché i livelli di leptina riescano ad influenzare la secrezione di gonadotropine (Zieba *et al.*,2005).

Studi effettuati da Zieba et al (2005) sui roditori, umani e manze riportano che le concentrazioni di leptina aumentano durante lo sviluppo prepuberale. Anche se i recettori per la leptina (LR) non si trovano nei neuroni del GnRH, questa stimola il rilascio di GnRH dall'ipotalamo dei ratti e dei suini; in aggiunta la leptina aumenta il rilascio di LH dall'ipofisi in animali alimentati correttamente. Al contrario la stimolazione dell'asse HPG da parte della leptina nelle vacche e nelle pecore si osserva quando gli animali sono sottoposti a un profondo bilancio energetico negativo. Per esempio in corso di NEB severo la leptina previene la riduzione della frequenza dei pulsii di LH dovuta ad una alimentazione inadeguata nelle manze prepuberi, aumenta l'ampiezza dei pulsii di GnRH e LH nelle vacche a digiuno e aumenta la secrezione basale di LH da parte dell'adenoipofisi di animali in profonda carenza nutrizionale. Comunque la leptina è incapace di accrescere la frequenza dei pulsii di LH nelle manze prepuberi, indipendentemente dallo stato nutritivo, e non ha effetti sulla secrezione di GnRH nelle vacche alimentate correttamente. Similarmente ai risultati ottenuti per l'LH, la secrezione basale di GH da parte dell'ipofisi è potenziata da concentrazioni ridotte di leptina. I meccanismi attraverso cui l'iponutrizione sensibilizza l'asse HPG interessa la regolazione a livello di recettori (LR). In ogni caso, un aumento nell'espressione di LR mRNA non è un requisito per l'aumento della risposta adenoipofisaria in vacche a digiuno (Zieba *et al.*,2005)

LEPTINA (prodotta dal tessuto adiposo bianco)	
FUNZIONE METABOLICA	Regola l'ingestione, la ripartizione delle energie e la deposizione di tessuto adiposo
AZIONE	Riduce l'assunzione volontaria di alimento

LEPTINA E APPARATO RIPRODUTTORE	
RECETTORI	Follicolo, corpo luteo, endometrio
AZIONE	Regola la secrezione di LH Promuove la maturazione di ovociti e aumenta il tasso di fertilità



LEGAME TRA NEB, LEPTINA E FERTILITA'	
AZIONE	NEB riduce la secrezione di leptina nel post-partum



Ritardo nel recupero della ciclicità ovarica post-partum e ipofertilità

Figura 3.1 [Relazione tra leptina e fertilità nella bovina da latte]

3.4 **Insulina**

L'insulina, prodotta dalle cellule β pancreatiche, ha un ruolo centrale nel metabolismo corporeo e funge da segnale dello stato energetico per il sistema nervoso centrale (Ingvarsen e Andersen,2000; Schwartz *et al.*,2000).

I recettori dell'insulina sono localizzati nel nucleo arcuato e nell'ipotalamo mediale basale, regione del cervello che contiene neuroni rilascianti GnRH (van Houten *et al.*,1979).

La relazione tra l'insulina circolante e la fertilità è stata dimostrata nelle manze da carne e nelle vacche da latte nutrite con diete per accrescere o ridurre la secrezione di insulina (Adamiak *et al.*,2005; Garnshwarty *et al.*,2009). Per dimostrare quest'ipotesi, le vacche da latte sono state alimentate con una dieta iperinsulinemizzante e gli effetti sono stati confrontati con quelli di una dieta euglicemizzante per 4 giorni durante il periodo della prima ondata follicolare nel post- partum. Il risultato di tale studio ha indicato che elevati livelli di insulina circolante stimola la steroidogenesi ovarica indipendentemente da qualsiasi effetto apparente dato dal rilascio pulsatile di LH. L'amministrazione di diete insulinogeniche inoltre risulta in una più rapida ripresa delle funzionalità ovariche nel post-partum (Miyoshi *et al.*,2001).

Anche a livello di ovaio, l'insulina gioca un ruolo molto importante e i suoi recettori sono ampiamente distribuiti in tutti i compartimenti, inclusi granulosa, teca e tessuti stromali (Poretsky e Kalin,1987). L'ipoinsulinemia in questa sede si evidenzia con un ritardo dell'ovulazione.

È stato appurato che la capacità del follicolo dominante di produrre estradiolo che stimola il picco di LH e produce l'ovulazione dipende dalla frequenza dei pulsali di LH in primis, ma anche dalle concentrazioni di insulina e IGF-1 (Beam e Butler,1999),le quali agiscono sinergicamente con le gonadotropine per stimolare la steroidogenesi. Gong *et al.* (2002) hanno dimostrato che un aumento dell'insulina in circolo migliora le performance riproduttive nelle vacche da latte.

Queste osservazioni sottolineano che la diminuzione dei livelli circolanti di insulina osservati nel primo periodo di lattazione rappresentano un importante segnale metabolico che lega lo stato nutrizionale con l'asse della riproduzione nelle vacche da latte.

Bassi livelli di insulina inoltre sono correlati con una spiccata lipolisi e con la presenza di elevate concentrazioni di NEFA in circolo che hanno un effetto dannoso a livello di funzione

Capitolo 3

delle cellule della granulosa (Vanholder *et al.*,2005). Aumentano inoltre il rischio di produzione di disordini quali la chetosi, dislocazioni abomasali e epatolipidosi (Roche,2006). D'altro canto, basse concentrazioni di insulina sono associate genotipicamente (Gutierrez *et al.*,2006) e fenotipicamente (Ingvarsen e Friggens,2005) con un'alta produzione di latte. Infatti anche se l'insulina non ha effetti diretti a livello di galattopoiesi, bassi livelli circolanti diminuiscono l'assorbimento di glucosio da parte di tessuti insulino-sensibili come il muscolo scheletrico e il tessuto adiposo accrescendo il glucosio disponibile per la ghiandola mammaria (Zhao *et al.*,1996; Nishimoto *et al.*,2006; van Knegsel *et al.*,2007).

INSULINA (secreta dalle cellule β del pancreas)	
FUNZIONE METABOLICA	Segnale dello stato energetico per il sistema nervoso centrale
AZIONE	Regola il metabolismo corporeo tramite variazioni della sua concentrazione

INSULINA E APPARATO RIPRODUTTORE	
RECETTORI	Ovaio, a livello di teca, granulosa e tessuti stromali
AZIONE	Stimola la steroidogenesi sinergicamente con le gonadotropine



LEGAME TRA NEB, INSULINA E FERTILITA'	
AZIONE	NEB causa ipoinsulinemia nel post-partum
Ritardo nel recupero della ciclicità ovarica post-partum e ipofertilità	

Figura 3.2 [Relazione tra insulina e fertilità nella bovina da latte]

3.5 **Insulino-resistenza**

Il glucosio è una molecola che guida la produzione di latte e l'insulina ha un ruolo fondamentale nel suo metabolismo. L'effetto dell'insulina sul metabolismo del glucosio è regolato dalla sua secrezione da parte delle cellule β del pancreas e dalla sensibilità del muscolo scheletrico, adiposo e del fegato all'insulina. La resistenza all'insulina può svilupparsi come parte di un processo fisiologico (lattazione e gravidanza) o patologico.

La risorsa fondamentale per la produzione di latte è il glucosio: è stato infatti stimato che per 1 kg di latte sono necessari 72 g di glucosio e per 60 kg di latte, 4 kg al giorno.

In condizioni fisiologiche, il glucosio deriva dalla gluconeogenesi nel fegato: se aumenta la produzione di glucosio aumenta anche la secrezione di insulina, viene stimolata la lipogenesi e diminuisce la % di grassi in circolo.

Durante la fase di lattazione il glucosio nel sangue diminuisce perché viene convogliato alla mammella per la produzione di lattosio e di latte, di conseguenza diminuisce la secrezione di insulina e aumenta la lipolisi da cui derivano i NEFA che vengono utilizzati come fonte di energia da parte dei tessuti periferici. Sono convogliati poi al fegato per essere utilizzati nel ciclo di Krebs, ma se sono presenti in quantità eccessive, generano chetosi.

Le basse concentrazioni di insulina in circolo, in questa situazione, genera insulino-resistenza periferica che dipende da una minore espressione del recettore GLU-4 a livello di muscolo e tessuto adiposo in maniera da rendere il glucosio disponibile per la mammella.

Quando la produzione di NEFA è troppo elevata questi entrano nel fegato, nel muscolo e addirittura nelle ovaie ed essendo presenti a livello di liquido follicolare provocano un effetto negativo sulla riproduzione, influenzando la fertilità. La dimostrazione è stata effettuata attraverso la raccolta di fluido follicolare per misurare i livelli di NEFA e sono state confrontate le cellule della granulosa "in vitro" e i livelli di NEFA in vivo. È stato evidenziato che l'aumento dei NEFA può essere tossico per le cellule della granulosa e per gli ovociti, in particolare l'acido palmitico e stearico.

Quindi in conclusione si può affermare che bassi livelli di glucosio sono prerogativa degli effetti negativi riscontrati a livello di apparato riproduttore (Atti della Conferenza SIET, 2-3 Ottobre 2015, Abano Terme).

3.6 IGF-1

L'IGF1 è un miglior indicatore rispetto all'insulina nel prevedere la fertilità ed è considerato un altro potenziale fattore di legame tra nutrizione e riproduzione (Zulu *et al.*,2002 a). L'effetto dell'iponutrizione sul sistema IGF è stato studiato sul fegato (Loor *et al.*,2005,2006,2000; Rhoads *et al.*,2008a; McCarthy *et al.*,2010) e sull'apparato riproduttore a livello di ovidotto (Pushkapumara *et al.*,2002; Fenwick *et al.*,2008), endometrio (Robinson *et al.*,2000; Llewellyn *et al.*,2008; Rhoads *et al.*,2008b) e ovaio (Llewellyn *et al.*,2007).

L'IGF-1 è prodotto principalmente dal fegato in risposta alla stimolazione da parte del GH, i cui recettori (GHRs) si trovano principalmente in quest'organo (Bornfeldt *et al.*,1989, Brameld *et al.*,1996, Edens e Talamantes,1998, Lucy *et al.*,1998). L'espressione dei geni del GH e del IGF-1 nel fegato variano in base allo stato nutrizionale (Bornfeldt *et al.*,1989, Pell *et al.*,1993) e allo stato fisiologico (Kobayashi *et al.*,1999 a) dell'animale.

La mancanza di energia nelle prime fasi di lattazione diminuisce l'attività che promuove la sintesi di GHR1A portando ad una diminuzione del GHR epatico e della produzione di IGF1.

Le concentrazioni di IGF-1 nella vacca sono legate con le funzioni dell'apparato riproduttore e con la fertilità (Velazquez *et al.*,2008).

I recettori dell'IGF-1 (IGF1R) sono presenti a livello di ipofisi, ovaio e tratto riproduttivo e la presenza di IGF-1 a questo livello accresce la secrezione di LH (Adam *et al.*,2000), aumenta la crescita follicolare e la sintesi di estradiolo (Webb *et al.*,2004), promuove le secrezioni istotropiche uterine (Whates *et al.*,2008 a) e aumenta il tasso di crescita embrionale precoce (Block,2007).

Le basse concentrazioni di IGF-1 nelle vacche a inizio lattazione portano ad un aumento dell'intervallo parto-prima ovulazione (Taylor *et al.*,2004a); infatti gli animali con bassa concentrazione di IGF-1 dopo il parto evidenziano un ritardo nel recupero della ciclicità ovarica, una minor capacità di rimanere gravidi e una diminuzione della fertilità (Butler,2003; Taylor *et al.*,2004 b; Patton *et al.*,2007).

Come già discusso, i bassi livelli di insulina riducono l'apporto di glucosio ad organi quali il muscolo scheletrico e il tessuto adiposo aumentando quello verso la mammella e quindi accrescendo la produzione di latte (Bauman e Elliott,1983). Visto che l'insulina è la chiave dello stato metabolico, si ipotizza che l'ipoinsulinemia associata alle prime fasi di lattazione sia responsabile della *down-regulation* del GHR1A nel fegato e che questo sia responsabile della mancata connessione all'interno dell'asse GH- IGF.

Un aumento dell'insulina plasmatica all'interno di un range fisiologico aumenta l'espressione epatica di GHR1A e IGF mRNA che risulta in un aumento visibile dell' IGF-1 nel plasma. (Baumann e Elliott,1983).

IGF-1 (prodotto principalmente dal fegato in risposta alla stimolazione da parte del GH)	
FUNZIONE METABOLICA	Mediatore dell'ormone della crescita (GH) Mediatore metabolico tra nutrizione e riproduzione
AZIONE	Relaziona l'apparato riproduttore e la fertilità tramite modificazioni nella sua concentrazione

IGF-1 E APPARATO RIPRODUTTORE	
RECETTORI	Ipofisi, ovaio e tratto riproduttivo
AZIONI	Stimola la crescita follicolare e la sintesi di estradiolo Promuove le secrezioni uterine Aumenta il tasso di sviluppo embrionale precoce



LEGAME TRA NEB,IGF-1 E FERTILITA'	
AZIONE	NEB è legato a minoi concenrazioni di IGF-1
Ritardo nel recupero della ciclicità varica post-parto e ipofertilità	

Figura 3.3 [IGF-1 e fertilità nella bovina da latte]

L'azione del GH è stata studiata anche a livello di tessuto adiposo nelle vacche da latte (Bauman e Vernon,1993; Bauman,2000) che sono in bilancio neutro o positivo. In queste condizioni il GH attenua la risposta lipogenica all'insulina e amplifica la risposta lipolitica al segnale β -adrenergico (Bauman e Vernon,1993). Si pensa inoltre che questa azione venga mantenuta o addirittura aumentata quando gli animali sono in bilancio energetico negativo all'inizio della lattazione ossia quando l'azione del fegato è ridotta (Bauman e Vernon,1993; Butler *et al.*,2003).

Il tessuto adiposo è importante per alcune funzioni che includono: lipogenesi per immagazzinare energia sottoforma di triacilglicerolo (TAG), lipolisi per il rilascio di energia durante i periodi di iponutrizione in forma di NEFA e glicerolo per la secrezione di un ampio spettro di citochine, chemochine e proteine di fase acuta, che legano il metabolismo con il sistema immunitario.

È stata verificata la correttezza di queste informazioni nel tessuto adiposo di vacche da latte con deficienza energetica attraverso misure dirette sulle risposte GH-dipendenti e sui livelli di GHR.

È inoltre dimostrato che gli animali che arrivano al parto in condizioni di nutrizione più spinte sono anche quegli animali che perdono maggiormente condizione corporea nel periodo seguente il parto sviluppando un NEB più profondo in quanto hanno una quantità di grasso maggiore da mobilizzare. Inoltre presentano alterate funzioni epatiche e una più bassa concentrazione di IGF-1 in circolo.

Queste vacche hanno anche funzioni riproduttive ridotte come si è visto in quelle che sviluppano un corpo luteo persistente, cisti ovariche o ovaie inattive (Atti della Conferenza SIET, 2-3 Ottobre, Abano Terme). Inoltre soffrono maggiormente di disordini metabolici quali chetosi, dislocazione abomasali o lipidosi epatica che portano ad infertilità.

Gli effetti negativi dello stress sviluppato in queste situazioni sulla riproduzione sono mediati dall'asse ipotalamo-ipofisi-corticosurrenalico (HPA), che a sua volta coinvolge vie di neurotrasmissione centrale complessa, che alterano l'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadale (HPG).

3.7 Dieta iperproteica e il suo effetto sull'apparato riproduttore

Nelle vacche da latte la frazione proteica ingerita comprende le RDP (proteina degradabile nel rumine) e le RUF (proteina non degradabile nel rumine). Durante la normale fermentazione

ruminale, l'RDP funge da risorsa di ammoniaca per la sintesi di proteine microbiche e una parte di ammoniaca prodotta diffonde dal rumine al circolo sanguigno dove viene convertita dal fegato in urea, che è un composto molto meno tossico. Quindi la quantità di ammoniaca utilizzata e convertita in urea riflette quella di RDP nella dieta e la quantità di carboidrati fermentescibili utilizzati per supportare la crescita e la sintesi delle proteine microbiche.

Una seconda risorsa di urea proviene dal fegato nel quale avvengono la deaminazione e il metabolismo degli aminoacidi; la glutamina e l'arginina sono importanti trasportatori di urea e non vengono utilizzati per la produzione di proteine lattee.

L'urea che viene prodotta dal fegato e che circola nel sangue viene distribuita nei vari tessuti, riciclata dal rumine ed escreta attraverso l'urina.

Le strategie per alimentare le vacche ad alta produzione sono cambiate necessariamente in relazione all'aumento del potenziale genetico degli animali. Una dieta ad alto contenuto proteico (17%, 19% CP) stimola l'aumento di produzione di latte a inizio lattazione (Grings *et al.*,1991; Kung e Huber,1983; Roffler e Thacker,1983) ma comporta un effetto negativo sulle performance riproduttive (Ferguson e Chalupa,1989).

Quando le vacche vengono nutrite con un eccesso di RDP durante le prime fasi di lattazione, il bilancio energetico negativo (NEB) risulta esasperato a causa del costo di energia implicato nella detossificazione dell'ammoniaca assorbita dal rumine (Staples *et al.*,1993).

L'assunzione di percentuali elevate di proteine nella dieta dopo il parto sembra avere effetti inconsistenti sull'inizio della nuova attività ovarica, però ha effetti sulla concentrazione di progesterone. Gli effetti deleteri del bilancio energetico negativo possono essere osservati attraverso basse concentrazioni di progesterone plasmatico rilevate in studi condotti su vacche nel post-partum nutrite con diete iperproteiche (Staples *et al.*,1993).

La ridotta concentrazione di questo ormone viene associata ad una riduzione della fertilità nelle vacche da latte ad alta produzione. Jordan e Swanson (1979) rilevarono infatti che vacche nutrite con una bassa concentrazione di proteine (12,7%), durante il periodo fertile, avevano concentrazioni di progesterone più elevate rispetto a vacche nutrite con il 16.3% o 19.3% di proteine.

Alte concentrazioni proteiche nella dieta invece, riducono le concentrazioni di progesterone plasmatico in tre dei quattro studi effettuati sulle vacche in lattazione (Staples *et al.*,1993), ma questo non avviene nelle manze Elrod e Butler,1993) o negli animali non in lattazione (Garcia-Bojalil *et al.*,1994).

L'effetto negativo dell'eccesso proteico sulla concentrazione di progesterone è stato associato soprattutto all'aumento del bilancio energetico negativo causato dal dispendio energetico per detossificare l'ammoniaca in eccesso.

L'abbondanza di proteina dunque porta alla sintesi di maggiori quantità di urea (Ferguson *et al.*,1993) che viene misurata tramite il contenuto di azoto nel plasma (PUN) o nel siero (SUN), genericamente chiamato BUN.

L'eccesso della concentrazione di urea circolante è un fattore che recentemente è stato associato a infertilità delle vacche: i valori di urea vengono misurati nel plasma e nel latte (Butler *et al.*,1996) e la presenza di alte percentuali di urea, causate da un eccesso di proteine degradabili nella dieta, porta ad avere concentrazioni nel sangue pari a 19 o 20 mg/d, valori che si associano ad una diminuzione del tasso di concepimento nelle vacche da latte e nelle manze.

Aspetti nocivi sulla fertilità dovuti a diete iperproteiche si riscontrano anche a livello embrionale, a causa dei cambiamenti nelle secrezioni uterine e alle elevate concentrazioni di urea.

Jordan *et al.* (1983) hanno esaminato la relazione tra una dieta basata su proteine grezze (CP) e le secrezioni uterine in vari stadi del ciclo estrale nelle vacche da latte ad alta produzione. Le concentrazioni di urea e ammoniaca nel sangue erano più elevate negli animali alimentati con una dieta del 23% di proteine rispetto a quelli con una dieta del 12%, inoltre risultavano alterate le concentrazioni di magnesio, potassio e fosforo nelle secrezioni uterine solo durante la fase luteale del ciclo estrale.

Altri cambiamenti osservati sull'ambiente uterino riguardano il pH (Elrod e Butler,1993) che normalmente aumenta da 6.8 a 7.1 al settimo giorno del ciclo estrale ma questo aumento non si verifica nelle manze e nelle vacche in lattazione alimentate con un eccesso di RDP o RUP (Elrod e Butler,1993). Questa diminuzione dell'acidità è ridotta dall'eccessiva somministrazione di proteine nella razione.

Secondo Butler *et al.* (1998) le cellule endometriali delle bovine rispondono direttamente all'aumento di concentrazione di urea e ad alterazioni del pH con un maggiore rilascio di PGF2 α . L'aumento di quest'ultima nel lume uterino interferisce con lo sviluppo embrionale e con la sopravvivenza dell'embrione dando evidenza del legame tra le concentrazioni elevate di urea e la diminuzione della fertilità.

A livello di sviluppo embrionale la dieta iperproteica porta alla degenerazione precoce dell'embrione e ad un suo sviluppo insufficiente (Blanchard *et al.*,1990).

Nelle manze da carne nutrite con una dieta ad alto contenuto di proteine degradabili (Elrod e Butler,1993) viene registrato un aumento delle perdite embrionali e il bilancio energetico negativo rilevato dopo il parto può avere effetti durante i 40-60 giorni necessari per lo sviluppo del follicolo; ciò può intaccare la sua salute in fase pre-ovulatoria (Lucy *et al.*,1992). Bishonga *et al.* (1996) suggeriscono inoltre che elevate concentrazioni di urea e di ammoniaca circolanti provocano effetti differenti sullo sviluppo precoce dell'embrione dal 4 all'11 giorno post inseminazione. Il successo dello sviluppo embrionale a questo livello dipende dalle condizioni dell'ambiente uterino (McRae,1984); questo è dinamico e varia in base al momento del ciclo estrale dell'animale in accordo con la regolazione steroidea dell'ovaio e con le secrezioni endometriali (McRae,1984). Gli effetti dell'attecchimento della blastocisti alla parete uterina porta a modificazioni nell'utero e induce la secrezione di particolari proteine da parte dell'endometrio (McRae,1984), necessarie per il nutrimento della blastocisti. I risultati sulle vacche da latte che comprendono la valutazione degli embrioni però non evidenziano il fatto che l'alto livello proteico abbia un impatto sullo sviluppo del follicolo, sull'ovulazione e sulla fertilità degli ovociti (Blanchard *et al.*,1990; Garcia-Bojalil *et al.*,1994) Altri studi eseguiti da Fahey *et al.* (2001) hanno valutato invece la riduzione della qualità degli embrioni di una pecora donatrice alimentata con dieta ad elevata concentrazione proteica, ma non hanno evidenziato effetti negativi sulla sopravvivenza embrionale una volta impiantati nell'animale. Questi ricercatori hanno evidenziato che l'effetto negativo dell'urea sulla qualità degli embrioni è soprattutto legata alla funzionalità di follicoli e ovidutto, piuttosto che alle alterazioni delle caratteristiche dell'ambiente uterino.

Embrioni prelevati da bovine con concentrazioni ematiche elevate di urea (> 4 mg/dl), per alcune settimane, hanno presentato bassi tassi di gravidanza.

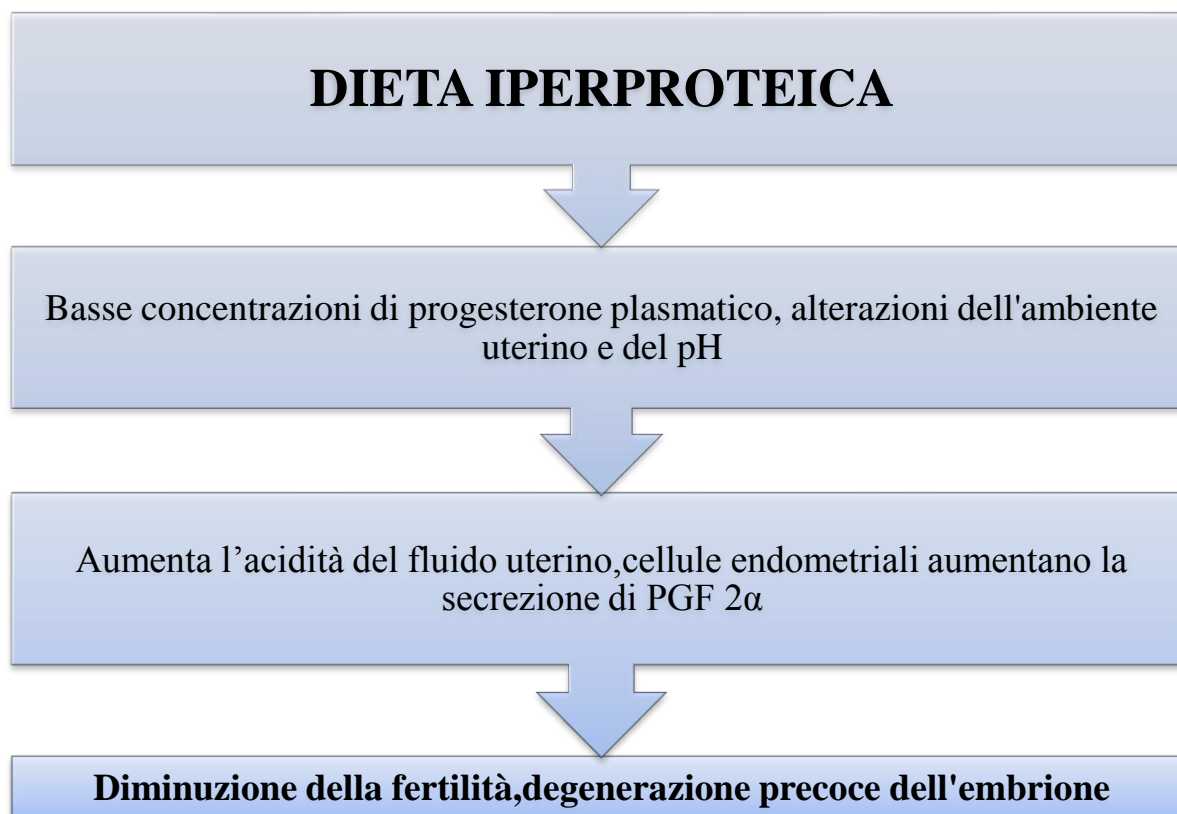


Figura 3.4 [Dieta iperproteica e ipofertilità nella bovina da latte]

3.8 La dieta lipidica e il suo effetto sull'apparato riproduttore

L'aggiunta di acidi grassi nella razione durante il periodo post-parto, o comunque ogni volta si osserva un calo di ingestione di alimento nella mandria, incrementa il livello energetico della dieta.

Sembra che a seguito dell'aggiunta di grassi in una razione si possa verificare un lieve calo dell'ingestione, a causa della maggior produzione di colecistochinina endogena e della riduzione delle fermentazioni ruminali (Choi et al.,1996).

L'effetto benefico degli acidi grassi sulla funzionalità riproduttiva dipende anche dalla riduzione della concentrazione ematica di insulina conseguente alla loro introduzione nella dieta delle bovine (Garnsworthy et al.,2008). Se la produzione di insulina è ridotta dalle diete ricche di acidi grassi, ci si dovrebbe aspettare un effetto negativo sulla funzionalità riproduttiva; in realtà la ridotta concentrazione plasmatica di insulina è dovuta soprattutto ad una maggiore *clearance* tissutale della stessa presente in circolo, inclusa nei tessuti degli organi riproduttivi, con conseguente stimolo della crescita follicolare.

A seguito della somministrazione di lipidi nella dieta è stato inoltre osservato un aumento dei livelli plasmatici e follicolari di colesterolo. Il colesterolo è un precursore del progesterone prodotto dalle cellule del corpo luteo e la sua funzione principale consiste nel preparare l'utero per l'impianto embrionale e mantenere in seguito la gravidanza. L'aumento della funzionalità del corpo luteo e quello della concentrazione ematica di progesterone è stata associata ad un miglior tasso di concepimento.

La maggior concentrazione plasmatica di progesterone (P4) che si può osservare a seguito della somministrazione di acidi grassi, non è tanto legata alla maggior sintesi da parte delle cellule luteiniche ma al minor tasso di *clearance* del P4 dal circolo ematico.

Uno studio effettuato nel passato da Jerred et al (1990) mirava a evidenziare e legare il bilancio energetico (Energy-balance) con lo sviluppo del follicolo dominante e con la sua funzionalità durante la prima ondata follicolare post-partum nelle vacche da latte.

È stato evidenziato l'effetto di una dieta con aggiunta di lipidi durante la prima fase di sviluppo follicolare e l'effetto della stessa sulla durata dell'interparto. Nello studio erano state considerate quarantadue vacche da latte di razza Frisona multipare divise in due gruppi: uno alimentato con una dieta di controllo con livelli studiati di RDP e RUP e formulata per contenere approssimativamente il 4.5% di estratti eteri (EE); l'altra dieta era composta da un'aggiunta di acidi grassi a lunga catena al 2,6 % e il 7% di EE. La dieta era di tipo "Total Mixed Ration" (unifed) e gli animali alimentati ad libitum.

I risultati hanno dimostrato che si sviluppa un'onda follicolare durante le due settimane seguenti il parto che è caratterizzata dall'emergenza di un grande follicolo dominante e che viene osservata sia negli animali del gruppo di controllo che in quelli con dieta supplementata da lipidi. I risultati di questo studio evidenziano che una dieta lipidica non è legata allo sviluppo di cisti follicolari (7 delle 21 vacche del gruppo di controllo contro le 5 di 21 vacche con dieta lipidica) e al numero di follicoli (3- 5 mm, 6-9 mm e 10- 15 mm) negli 8 giorni dopo il parto che risultano simili con l'utilizzo delle due differenti diete.

In pratica, il consumo di lipidi da parte delle vacche durante il primo periodo di lattazione risulta da questi studi inefficace sia per migliorare il bilancio energetico che per lo sviluppo follicolare e per l'ampiezza dell'intervallo anovulatorio post-partum, probabilmente perché i lipidi causano la riduzione nell'assunzione di sostanza secca ingerita.

Un altro studio condotto da Lucy et al (1991) evidenzia invece che una dieta a base di lipidi nelle vacche da latte ad alta produzione permette di avere un maggior numero di follicoli di varia grandezza e un diametro maggiore del follicolo dominante.

Studi più recenti sul ruolo dei grassi hanno messo in luce che la loro presenza nella dieta di transizione può aumentare le performance riproduttive (Thatcher *et al.*,2006; De Veth *et al.*,2009), migliorare il bilancio energetico e ridurre l'incidenza di patologie metaboliche.

In uno studio di Caldari-Torres et al (2006) è stato valutato come, in seguito alla somministrazione di diete ricche di PUFA Ω -3, la produzione di PGF2 α da parte delle cellule endometriali dipenda dalla concentrazione uterina di PUFA Ω -3 e PUFA Ω -6.

L'aumento del tasso di gravidanza, che spesso si osserva in seguito alla somministrazione di acidi grassi poli-insaturi nella dieta delle bovine da latte, può essere mediato infatti dalla ridotta secrezione di PGF2 α da parte delle cellule endometriali, dalla minor sensibilità all'ossitocina delle stesse cellule e dalla minor sensibilità alla PGF2 α delle cellule luteiniche.

Infatti la soppressione della secrezione di PF2 α e il mantenimento dell'attività del corpo luteo sono fondamentali per l'impianto embrionale e il mantenimento della gravidanza.

Gli acidi grassi essenziali infatti sono coinvolti nella sintesi delle prostaglandine, le quali giocano un ruolo in numerose funzioni dell'organismo in particolare nella sintesi di ormoni.

Le prostaglandine sono suddivise in tre gruppi principali: quelle della serie 1 e 3 sono considerate benefiche, mentre quelli della serie 2 hanno effetti dannosi; è da tenere presente che le prostaglandine della serie tre e due sono antagoniste. Gli acidi grassi Ω -3 portano alla formazione delle prostaglandine della serie 3 mentre gli acidi grassi Ω -6 danno origine alle prostaglandine della serie 2.

Gli acidi grassi essenziali Ω - 3 hanno degli effetti molto favorevoli sulla fertilità della bovina da latte: aumentano il numero e la taglia dei follicoli ovulatori, la concentrazione di progesterone nel sangue e portano ad una riduzione delle prostaglandine della serie 2 come la PGF2 α . I grassi aggiunti alle diete di fine asciutta ed inizio lattazione stimolando la secrezione epatica di colesterolo aumentano la possibilità del follicolo e del corpo luteo di produrre rispettivamente estrogeni e progesterone. Aumentando la disponibilità di acido linolenico viene inibita la sintesi di PGF2 α essendo l'acido linolenico precursore della serie 3 delle prostaglandine in competizione con gli enzimi che presiedono la sintesi di PGF2 α .

La riduzione della secrezione uterina di prostaglandine indotta dalla somministrazione di acidi grassi poli-insaturi potrebbe essere uno dei maggiori fattori che legano la nutrizione alla sopravvivenza embrionale nella bovina da latte.

Infatti secondo Mattos et al (2004) la somministrazione di farina di pesce contenete acidi grassi del gruppo Ω -3 riduce significativamente la sintesi di $\text{PGF}2\alpha$ da parte delle cellule uterine e altera il profilo acidico del grasso del latte.

L'effetto dei lipidi sui principali indici riproduttivi dunque spesso non è stato preso in considerazione oppure, in certi studi (Aguilar-Perez *et al.*,2008), non è stato osservato un effetto statisticamente significativo.

Alcuni ricercatori hanno comunque evidenziato un effetto positivo dell'aggiunta di acidi grassi poli-insaturi al razione delle bovine, in particolare per quanto riguarda l'intervallo parto-prima ovulazione, il *pregnancy rate*, il *conception rate* e i *days open* (Colazo *et al.*,2009).

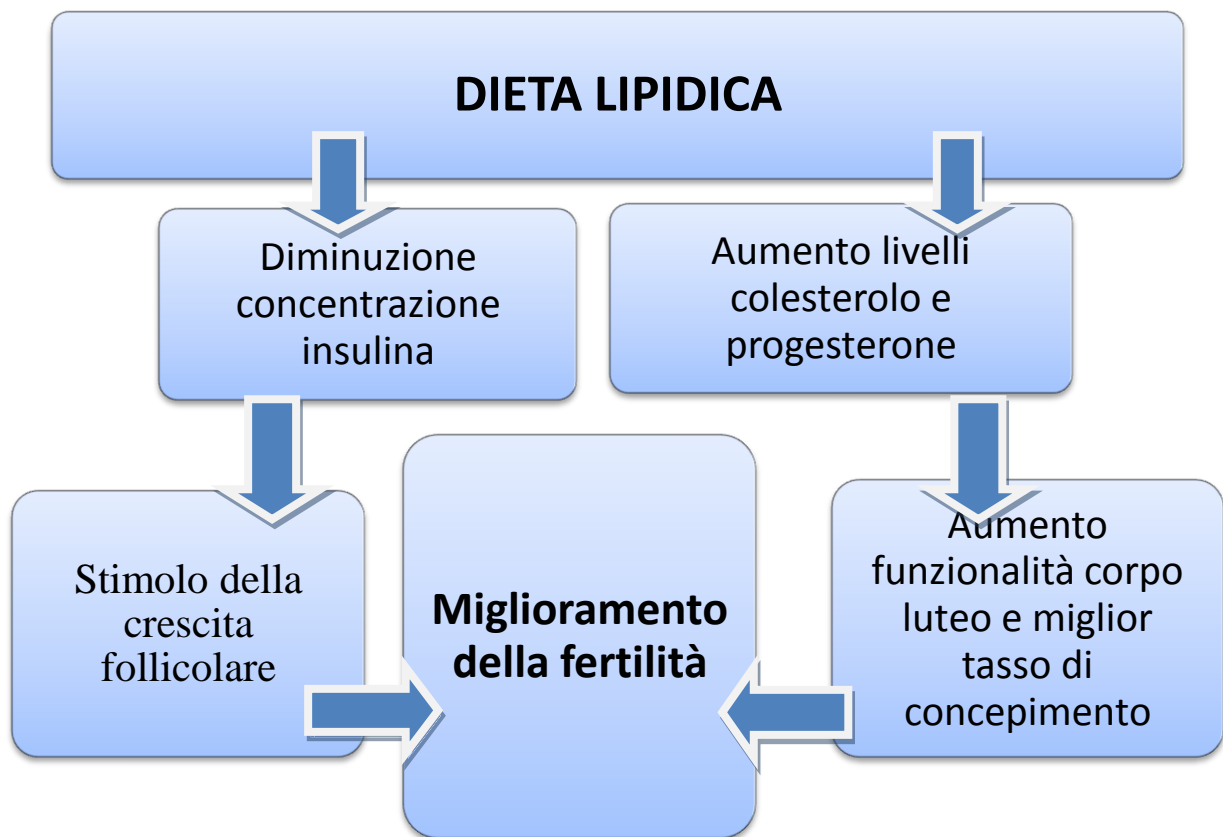


Figura 3.5 [Dieta lipidica e fertilità della bovina da latte]

CAPITOLO 4

STRESS, NUTRIZIONE E FERTILITA' NELLA BOVINA DA LATTE

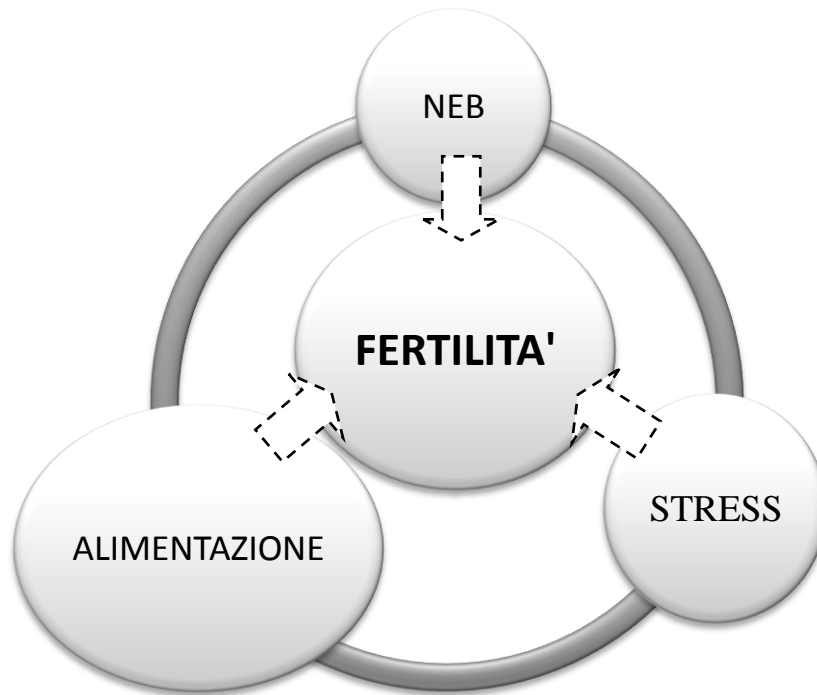


Figura 4.0 [Legame tra stress, alimentazione e fertilità nella bovina da latte]

4.1 Effetti integrati di nutrizione e stress sulla fertilità della bovina da latte

Le bovine con maggior produttività sono le più esposte e le meno tolleranti a regimi di conduzione non opportuni, in particolare a errori dietetici e conseguenti disordini metabolici che hanno portato a formulare il concetto di “stress metabolico”, legato ad una condizione di bilancio energetico negativo (Stefanon *et al.*, 2002).

Possiamo riferirci in questo contesto allo stress come termine in senso lato (stress metabolico ed ambientale) che limita la piena espressione delle capacità produttive e riproduttive.

Capitolo 4

Lo scopo principale di questa tesi è di mettere in evidenza quando le cause di un'eccessiva attivazione dell'asse HPA (stress) e di una alimentazione inadeguata influenzano in maniera sinergica o indipendente la funzione riproduttiva.

Stressor e ormoni metabolici legati all'alimentazione sono stati presi in considerazione in quanto agiscono entrambi a livello di asse HPG causando un ritardo nel recupero della ciclicità ovarica dopo il parto, un interparto più lungo del normale, una ridotta qualità degli ovociti e quindi una diminuzione della fertilità.

Evidenziato il legame esistente tra l'asse HPA e l'asse HPG, le situazioni stressanti trattate nel corso del secondo capitolo (endotossine, cisti ovariche, ACTH, stressor cronici) agiscono a livello ipotalamico interagendo con gli steroidi gonadali e sopprimendo la secrezione di GnRH, a livello ipofisario riducendo la sensibilità delle gonadotropine al GnRH e a livello ovarico alterando la sintesi di estradiolo. Inoltre i glucocorticoidi possono aumentare la vita del corpo luteo inibendo la sintesi di PGF2 α .

Allo stesso modo il bilancio energetico negativo (NEB) è una situazione stressante sperimentata dall'animale nel post-partum che si traduce a livello metabolico in un cambiamento delle concentrazioni ormonali.

Gli ormoni metabolici agiscono sull'asse HPG in base alla loro concentrazione plasmatica e, in una condizione di NEB, provocano un ritardo nel ritorno alla ciclicità ovarica e quindi una riduzione della fertilità nella bovina da latte.

La leptina in particolare viene secreta in base allo stato nutrizionale e all'assunzione di alimento e agisce a livello di sistema nervoso centrale stimolando la secrezione di LH e promuovendo la maturazione degli ovociti. Nel post-partum il bilancio energetico negativo si traduce nel ritardo dell'aumento delle concentrazioni plasmatiche di leptina e in un difficile recupero delle funzioni riproduttive della bovina.

L'insulina è legata all'attività riproduttiva dell'animale in quanto stimola la steroidogenesi in sinergia con le gonadotropine; quando la bovina entra in uno stato di bilancio energetico negativo post-partum, i livelli di leptina calano e questo comporta un ritardo nel recupero della ciclicità ovarica dopo il parto.

L'IGF-1 infine stimola la secrezione di LH, la crescita follicolare e la sintesi di estradiolo, promuove le secrezioni uterine e aumenta il tasso di sviluppo embrionale precoce ma, in condizioni di NEB, la diminuzione delle sue concentrazioni porta in ugual misura ad un ritardo nel recupero della ciclicità ovarica.

Sono stati poi presi in considerazione gli effetti di due differenti diete rispetto alle funzioni riproduttive della bovina da latte: una dieta iperproteica e una dieta con aggiunta di lipidi.

Nel caso di utilizzo di una dieta iperproteica è stata evidenziata l'interazione tra un eccesso di proteine e il calo della fertilità. Infatti in questo caso, le aumentate concentrazioni di ammoniaca e di urea agiscono sull'apparato riproduttore andando ad alterare l'ambiente uterino e il pH, ma probabilmente non agiscono a livello di sistema nervoso centrale. Esiste anche in questa situazione un legame con il bilancio energetico negativo della bovina che si traduce, in caso di aggiunta proteica alla dieta, in una esasperazione del bilancio energetico dovuto all'azione organica di detossificazione dell'ammoniaca in eccesso, derivante dalla dieta.

Anche la dieta iperproteica dunque comporta una riduzione della fertilità dell'animale, ma agisce ad un livello differente rispetto a quanto evidenziato in presenza di stressor e di cambiamenti degli ormoni metabolici.

La presenza di lipidi nella dieta si discosta dai precedenti casi in quanto il loro supplemento nella razione sembra essere correlato all'aumento della fertilità degli animali.

I lipidi comportano una diminuzione nella concentrazione di insulina associata ad un maggior *clearance* tissutale della stessa anche negli organi riproduttivi, con stimolo della crescita follicolare. A seguito della somministrazione di lipidi nella dieta è stato inoltre osservato un aumento dei livelli plasmatici e follicolari di colesterolo, che è un precursore del progesterone prodotto dalle cellule del corpo luteo, e questo comporta un aumento della funzionalità del CL ed è associato ad un miglior tasso di concepimento.

Recentemente è stato osservato che l'utilizzo di grassi poli-insaturi nella dieta risulta in un miglioramento delle performance riproduttive della bovina nel post-partum, in particolare per quanto riguarda l'intervallo parto-prima ovulazione, il tasso di gravidanza e il tasso di concepimento.

4.2 Legame tra cortisolo, bilancio energetico e fertilità nella bovina da latte

Un legame tra l'attivazione dell'asse HPA, il bilancio energetico e l'ipofertilità nella bovina da latte è rappresentato dalla sinergia tra i sistemi endocrino, metabolico e immunitario; il passaggio dell'animale attraverso gli stadi fisiologici di gravidanza, lattazione e ritorno alla ciclicità provoca alterazioni del loro equilibrio (Madsen *et al.*,2002; Walsh *et al.*,2011).

Il periodo di transizione delle vacche da latte è caratterizzato da cambi metabolici, ormonali e immunologici che influenzano il verificarsi di infezioni e patologie metaboliche (Goff e Horst, 1997); durante questo periodo, le vacche si trovano in bilancio energetico negativo (Baumann e Currie, 1980) con elevati livelli di NEFA e BHB in circolo. Tutti questi cambiamenti metabolici possono portare a ipocalcemia, chetosi, dislocazioni abomasali e lipidosi epatica (Drackley et al., 2005).

Le vacche infatti nel periodo di transizione sono immunologicamente più deboli e di conseguenza più suscettibili al manifestarsi di patologie anche dell'apparato riproduttore, sia interne (endometriti) che esterne (laminiti, mastiti) (Hansen, 2011). Questo porta a modifiche delle funzioni ovariche, quali un ritardato ritorno alla ciclicità, un prolungamento della crescita del follicolo dominante e dell'anestro, riducendo le funzioni riproduttive (Walsh et al., 2011).

Il ripristino delle capacità immunitarie nel post-partum è fortemente legato e influenzato dalla velocità di recupero di un bilancio energetico positivo o nullo (Pyörälä, 2008; Whates et al., 2009).

I neutrofili nel periodo di transizione subiscono una riduzione delle loro capacità fagocitarie e diminuisce la loro abilità di combattere i batteri (Kehrli et al., 1989 a).

Preisler et al (2000) hanno eseguito uno studio per verificare gli effetti del parto sul recettore dei glucocorticoidi (GR) a livello di neutrofili, le concentrazioni di cortisolo sierico e il conto dei neutrofili nelle vacche da latte periparturienti. Sono stati raccolti campioni di sangue di 23 vacche da latte di razza Frisona di cui 8 multipare e 5 primipare in momenti diversi tra i 28 giorni prima del parto e i 14 dopo il parto. I risultati erano confrontabili con i valori ottenuti sui gruppi di controllo (sullo stesso numero di animali) a metà della gravidanza.

E' stata notata una riduzione dei recettori GR del 49% sui neutrofili degli animali al parto, comparato con i valori esistenti nelle 2-4 settimane precedenti il parto e una riduzione del 39% confrontato con i neutrofili di vacche a metà gravidanza. La riduzione dei recettori inizia una settimana prima del parto ed è maggiore al momento del parto e nelle 24 ore successive; esiste una importante differenza tra le vacche primipare e multipare.

Le concentrazioni di cortisolo nel siero e la quantità di leucociti e di neutrofili aumenta al parto e ritorna a livelli basali 24 ore dopo; esiste dunque una correlazione negativa tra l'espressione dei recettori di GR nei neutrofili e le concentrazioni di cortisolo sierico, il numero totale dei leucociti e dei neutrofili.

Da questo studio emerge che la ridotta espressione del GR a livello di neutrofili di vacche da latte nel periparto è associata con un aumento delle concentrazioni di cortisolo in circolo, a leucocitosi e neutrofilia. La *down-regulation* dei GR nei neutrofili può causare un disordine neutrofilico e un aumento della suscettibilità a patologie metaboliche post-partum con riduzione della fertilità in questi animali (Preisler *et al.*,2000).

Eccessi di cortisolo si possono verificare anche in presenza prolungata di stressor e portano ad un aumento del rilascio di insulina da parte del pancreas, riducendo la sensibilità del tessuto muscolare e adiposo alla stessa (vedi paragrafo 3.5).

Infatti i livelli di glucosio e di insulina, così come il GH plasmatico, il cortisolo e i FFA sono elevati durante la presenza di un'infezione (metrite, mastite..), mentre il glucagone plasmatico, l'epinefrina e la norepinefrina si mantengono a livelli normali (Drobny *et al.*,1982).

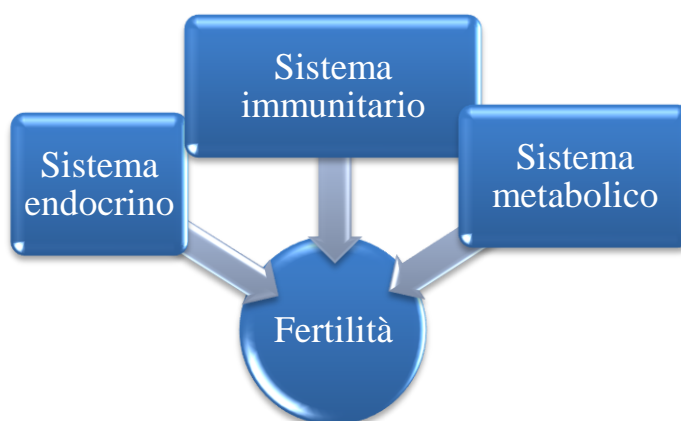


Figura 4.1 [Relazione tra sistema immunitario, endocrino e metabolico nella bovina da latte]

4.3 Le cisti ovariche come esempio di legame tra stress, nutrizione inadeguata e fertilità

Un esempio di come una sindrome a carico della sfera riproduttiva possa avere differenti concause è rappresentato dalle cisti ovariche. Infatti, sia la stimolazione cronica dell'asse HPA in prossimità della fase ovulatoria, che un condizione di bilancio energetico negativo associato a insulino-resistenza portano alla genesi delle cisti ovariche. La presenza di queste si traduce in un aumento dell'intervallo di interparto (22-64 giorni) e del tasso di abbattimento degli animali.

Situazioni stressanti legate al puerperio quali ritenzione placentare, metrite e chetosi sono infatti fattori di rischio per l'insorgenza di cisti (Hanzen *et al.*,2000); allo stesso modo il bilancio energetico negativo nel post-partum è legato alla formazione di cisti ovariche.

Il NEB è caratterizzato infatti dalla presenza in circolo di “messaggeri metabolici” quali glucosio, NEFA, corpi chetonici e urea in quantità superiori al normale che agiscono a livello di ipotalamo e di ipofisi andando ad alterare la liberazione di FSH e di LH.

L'organismo dunque non si trova nelle condizioni ideali per poter sostenere una gravidanza e, in assenza di un picco di LH, il follicolo continua a crescere supportato dai pulsanti di FSH provocando lo sviluppo di cisti.

Al fine di evidenziare la relazione tra insulino-resistenza e sviluppo di cisti ovariche Opsomer *et al* (1999) hanno preso in esame 30 vacche di razza Frisona: 15 appartenenti al gruppo di controllo e 15 affette da CDO, tra la seconda e la quinta settimana di lattazione.

Tutte le vacche furono sottoposte ad un test di tolleranza al glucosio intravenoso (IVGTT).

Lo scopo di tale studio era quello di rilevare se l'attività dell'insulina fosse alterata negli animali con CDO analizzando tra i due gruppi le differenze nella *clearance* del glucosio.

Gli animali con CDO presentavano un aumento molto meno evidente di insulina rispetto a quelli del gruppo di controllo; questo è dato dal fatto che in 5 dei 15 animali non si è verificata una risposta dell'insulina al carico di glucosio. Gli autori hanno concluso che l'insulina è un fattore effettivamente relazionata con la patogenesi delle CDO nelle vacche da latte (Opsomer *et al.*,1999).

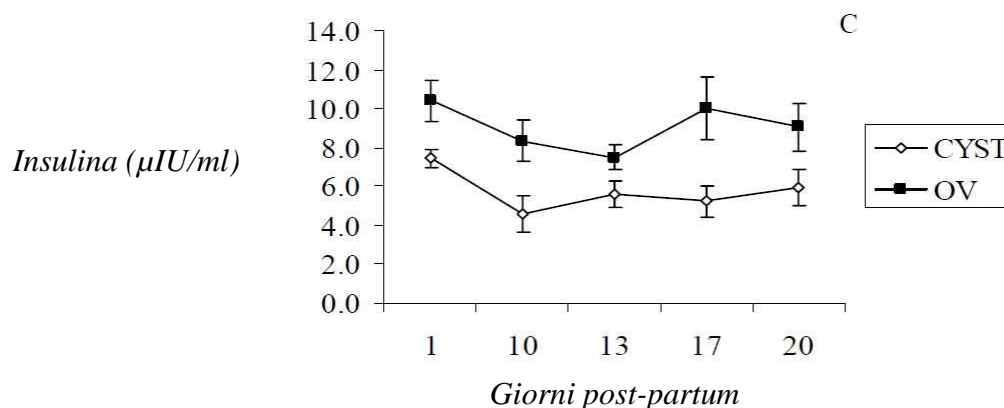


Figura 4.2 [Relazione tra insulino-resistenza e cisti ovariche]

(Insulin resistance: the link between metabolic disorders and cystic ovarian disease in high yielding dairy cows?, Opsomer *et al*; 1999)

4.4 Stress, bilancio energetico e comportamento alimentare

L'asse HPA esercita un ruolo importante nella regolazione del bilancio energetico e del peso corporeo. Purtroppo non sono stati effettuati studi sugli animali da reddito a questo proposito, ma sono stati eseguiti sull'uomo e sugli animali da laboratorio (Susan *et al.*,2007).

Esiste sicuramente però una relazione tra stress e bilancio energetico evidenziata in Figura 4.2.

Sebbene sia difficile verificarlo negli animali, sugli umani è stato possibile svolgere vari studi che hanno portato a risposte ben precise sulla relazione tra gli stressor e la stimolazione dell'appetito.

La risposta agli stressor può essere di due diverse tipologie (Folkow,1997): attivazione del sistema nervoso simpatico oppure del sistema che coinvolge l'asse HPA.

L'attivazione del sistema simpatico, con il rilascio di adrenalina e noradrenalina è tipico durante un periodo di stress acuto (Cohen,2000). L'attivazione dell'asse HPA con rilascio di corticosteroidi (cortisolo) è stato associato invece a individui cronicamente stressati (Bjorntorp *et al.*,2000). E' stato inoltre proposto che un asse HPA iperattivo possa essere "programmato" durante il periodo prenatale come risultato di una ritardata crescita fetale (Welberg e Seckl,2001)

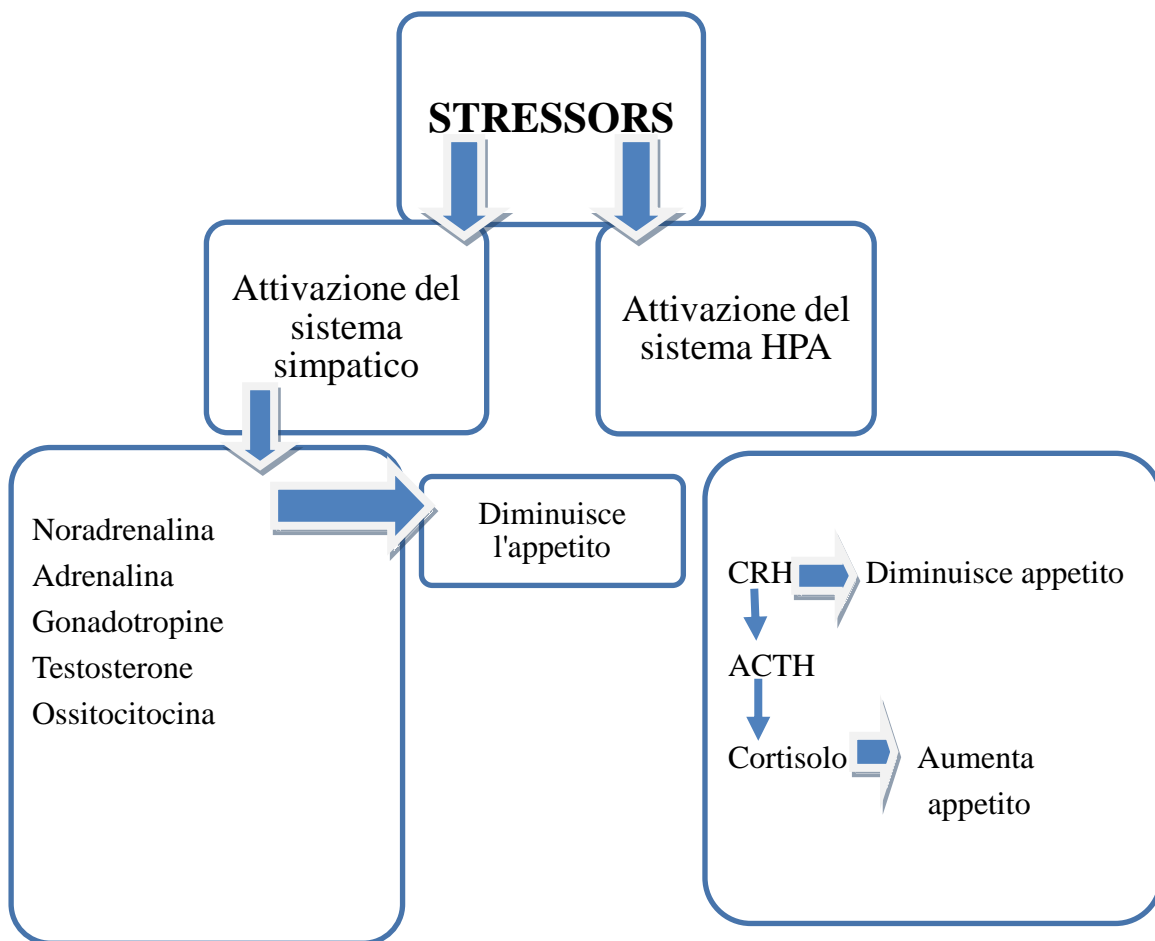


Figura 4.3 [Risposte fisiologiche allo stress]

(Relationship between stress, eating behavior and obesity, Torres et al; 2007- modificata-)

Le risposte allo stress acuto o cronico possono portare a cambiamenti fisiologici che includono un ritardo nello svuotamento gastrico (Bhatia e Tandon.,2001), un aumento della pressione sanguigna, un aumento della frequenza cardiaca, la mobilitazione delle riserve corporee e la diminuzione del flusso sanguigno in organi non fondamentali come il sistema digerente, la pelle e i reni (Cohen, 2000).

Gli ormoni rilasciati in risposta ad una condizione di stress influenzano direttamente l'appetito; infatti la noradrenalina (Halford,2001) e il CRH (Takeda *et al.*,2001) lo diminuiscono durante lo stimolo stressante, mentre il cortisolo è riconosciuto stimolarlo durante il recupero da una situazione di stress (Takeda *et al.*,2001).

Gli studi eseguiti sui ratti da Michajlovskij et al (1988), Monteiro et al,(1989), Marti et al (1994), Valles et al (2000) aiutano a capire la relazione tra lo stress e la quantità di alimento ingerito; infatti, inserendo un evento stressante di elevata gravità, quale l'immobilizzazione,

nella vita dell'animale effettivamente il consumo di cibo risulta diminuito sia che lo stimolo venga introdotto cronicamente che in maniera acuta (Valles *et al.*,2000).

Se questi animali vengono sottoposti ad uno stress moderato (stimolo rumoroso, ad esempio), somministrato comunque cronicamente, si rileva ugualmente una diminuzione nel consumo di alimento (Marti *et al.*,1994; Alario *et al.*,1987; Krebs *et al.*,1996; Harris *et al.*,1998) e questo fatto ha delle basi fisiologiche.

Infatti, in presenza di uno stimolo stressante aumenta il rilascio di CRH con conseguente diminuzione dell'appetito e dell'alimento ingerito (Arborelius *et al.*,1999). Questa osservazione è stata poi confermata, sempre in uno studio sui ratti, dal fatto che il CRH inibisce l'iperfagia indotta dal neuropeptide Y (Heinrichs *et al.*,1992) diminuendo appunto l'ingestione di alimento (Levine e Billington,1997).

Uno stressor moderato (taglio della coda) aumenta il consumo di latte condensato dolce (Rowland *et al.*,1976;Wallach *et al.*,1977) ma non altera il consumo di foraggio (Marti *et al.*,1994) così come è stato appurato in presenza di altri stressor di questo genere.

Questo fatto viene compreso grazie agli studi eseguiti sugli esseri umani: infatti in presenza di uno stimolo stressante diminuisce l'appetito a causa dei meccanismi descritti ma aumenta la predilezione nei confronti di cibi ad alto contenuto di zuccheri e di grassi (Prentice *et al.*,2003) con rischio di sviluppare obesità.

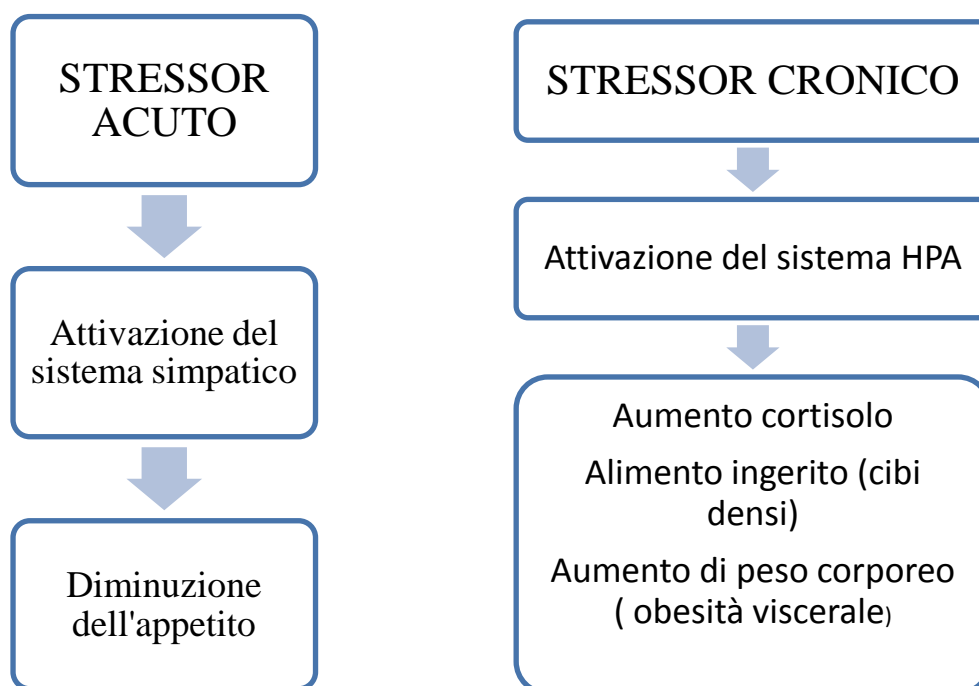


Figura 4.4 [Relazione tra stressor acuti, cronici e bilancio energetico] (Relationship between stress, eating behavior and obesity, Torres *et al.*; 2007)

CAPITOLO 5

ACCORGIMENTI NUTRIZIONALI, MANAGERIALI E AMBIENTALI PER MIGLIORARE L'EFFICIENZA RIPRODUTTIVA DELLA BOVINA

L'effetto di una inadeguata nutrizione nelle vacche si ripercuote in un ritardo della pubertà (Kinder *et al.*,1987; Archbold *et al.*,2012), in un prolungato periodo anovulatorio durante il post-partum (Rodhes *et al.*,2003), in un ridotto BCS (Roche *et al.*,2009) e in un basso tasso di concepimento (Buckley *et al.*,2003).

Nelle vacche da latte ad alta produzione, il tasso di concepimento normale è molto alto (>70%), ma il 50 % degli animali vanno incontro alla perdita di embrioni e alla mancata capacità di sostenere una gravidanza (Diskin e Morris,2008) a causa della durata del “*negative energy balance*” (NEB) a inizio lattazione, influenzato fortemente dal management nutrizionale e ambientale durante il periodo di transizione dalla gravidanza alla lattazione. Una dieta ben bilanciata appare quindi necessaria per assicurare un adeguato apporto di principi nutritivi all'animale.

5.1 Cambiamenti metabolici durante il periodo di asciutta e di transizione

Nel passaggio tra gravidanza e inizio lattazione avvengono vari cambiamenti nei sistemi endocrino e neuroendocrino che guidano la suddivisione degli alimenti dalla maturazione fetale alla sintesi di latte (Ingvarsen,2006).

Durante il periodo di asciutta, le concentrazioni di insulina e di leptina sono correlate al bilancio energetico dell'animale e generalmente sono più elevate rispetto ai valori rilevati in lattazione (Janovick *et al.*,2011). Durante le ultime 3 settimane di gravidanza infatti, la richiesta di nutrienti da parte del feto e della placenta aumenta (Bell *et al.*,2000) e le vacche dovrebbero essere in grado di coprire queste richieste con la dieta anche se il DMI (dry matter intake) diminuisce dal 10% al 30% comparato con l'intake all'inizio dell'asciutta.

Gli stressors e la diminuzione nel DMI possono infatti portare ad un bilancio energetico negativo già prima del parto.

La concentrazione di insulina diminuisce prima del parto, la secrezione di GH aumenta (Grum *et al.*,1996) e questa promuove la mobilitazione dei nutrienti stoccati (prima i grassi dal tessuto adiposo) per supportare la produzione di latte (Lucy,2000). La diminuzione dei recettori del GH nel fegato (GHR-1A) porta ad una diminuzione della secrezione epatica di IGF-1.

Però il disaccoppiamento nell'asse somatotropico previene l'inibizione del feedback della secrezione di GH da parte del IGF-1, mantenendo concentrazioni elevate di GH (Lucy,2000).

Il basso profilo dell'insulina e le concentrazioni elevate di GH orientano verso la mobilitazione del triacilglicerolo stoccato nel fegato (TAG), la lipogenesi viene inibita completamente e diminuisce la riesterificazione dei NEFA.

I fattori secreti in risposta a infezioni, stress o trauma come le citochine (TNF- α , interleukin-1 e interleukin-6) portano invece all'aumento della concentrazione dei NEFA nel plasma e di TAG nel fegato (Contreras and Sordillo,2011).

Quindi la presenza di stressor e un management nutrizionale inadeguato diminuiscono il DMI e portano ad un aumento nella mobilitazione dei TAG e della concentrazione dei NEFA subito dopo il parto; l'aumento della chetogenesi, che si verifica quando le concentrazioni di glucosio sono limitate durante il bilancio energetico negativo, può portare a chetosi (Drackley *et al.*,2001).

Visto che i Ruminanti non sono in grado di esportare i TAG dal fegato come lipoproteine a bassa densità, questi possono accumularsi e causare la sindrome del "fegato grasso" (Drackley *et al.*,2001).

Le vacche da latte utilizzano la gluconeogenesi epatica a partire dal propionato per raggiungere le loro richieste di glucosio. La diminuzione del DMI nel primo periodo post-partum limita il supporto di propionato disponibile per la sintesi di glucosio e aumenta la conversione degli aminoacidi dalla dieta o dal muscolo (in particolare alanina e glutamina) e del glicerolo dalla mobilitazione dei TAG, per produrre glucosio. L'attività di gluconeogenesi del fegato aumenta al parto per mantenere il supporto di glucosio per la ghiandola mammaria e prevenire l'ipoglicemia (Drackley *et al.*,2005).

Le proteine nelle vacche da latte sono stoccate sottoforma di proteine del muscolo scheletrico. La mobilitazione di queste dal muscolo aumenta nella prima settimana dopo il parto rispetto al pre-partum (van der Drift *et al.*,2012); il mantenimento di adeguate concentrazioni di

proteine è importante per la salute, per la produzione e per la riproduzione (Bell *et al*,2000) e anche la mancanza di queste da metabolizzare può portare a chetosi (van der Drift *et al*,2012; Lean *et al*,2013 a) e ad altri problemi nel periparto (Roche *et al*,2013) che diminuiscono la fertilità.

Le funzioni del sistema immunitario infine risultano diminuite durante il periodo di transizione (Ingvarsen e Moyes,2013) e si traducono nella sua incapacità di rispondere alle infezioni portando a un aumento di mastiti e di metriti prima e dopo il parto.

Anche la ritenzione della placenta è legata a questo problema, in quanto il sistema immunitario non la riconosce come un corpo estraneo (Kimura *et al*,2002); le ragioni per cui il sistema immunitario risulta depresso in questo periodo non sono ancora ben chiare anche se si pensa sia legato a carenze di vitamina A, E e di minerali quali selenio, zinco e rame.

Le vacche che appaiono più stressate a causa di una nutrizione non adeguata o da fattori ambientali, sono più inclini a perdere peso corporeo e allo sviluppo di patologie. Il bilancio energetico negativo e la quantità di proteine metabolizzabili possono essere due fattori che contribuiscono a peggiorare la situazione (Ingvarsen e Moyes,2013).

Di seguito vengono riportati le strategie da utilizzare per migliorare la fertilità nelle bovine da latte nel pre e nel post-partum.

5.2 Strategie del pre e peri-parto per migliorare la fertilità della bovina nel post-partum

A causa dei cambiamenti metabolici che avvengono nell'organismo dell'animale risulta fondamentale assicurare strategie manageriali e comfort adeguati affiancandoci strategie nutrizionali corrette al fine di ridurre gli effetti dello stress migliorando la produzione e la riproduzione (De Veth *et al*.,2009).

Bell (1995) ha individuato nel periodo di transizione, che va dalle 3 settimane prima alle 3 dopo il parto, il momento più critico per la riproduzione. Questo momento è caratterizzato da cambiamenti metabolici nell'animale legati alla tarda fase di gestazione e alla prima di lattazione (Bell,1995).

De Garis *et al* (2010 a,b) hanno scoperto che la probabilità degli animali di rimanere gravidi aumenta del 30% quando viene usata una dieta di transizione appropriata. Bach *et al*, (2008) hanno inoltre rilevato che anche il management non nutrizionale pesa fino ad un 50 % sulla

variazione media della produzione di latte (20.6 a 33.8 kg/day) in 47 allevamenti con la stessa dieta TMR (unifeed).

Risulta forse più corretto parlare di due momenti critici nella riproduzione della bovina da latte che assumono un ruolo importante sulla fertilità nel post-partum: l'asciutta e il periodo di transizione. La fertilità dell'animale infatti si gioca in particolare dai 30 giorni prima del parto fino ai 60-70 dopo il parto.

La messa in asciutta è un periodo che dura circa una settimana e consiste nell'alimentare l'animale con foraggio e acqua razionata per ridurre il più possibile la produzione di latte prima dell'ultima mungitura. Subito dopo questa saranno effettuati i trattamenti in mammella (antibiotici o sigillanti) ed eventualmente antibiotici per via generale per gli animali "cronici" (animali con cellule somatiche alte durante l'ultima lattazione).

L'asciutta è un periodo che va monitorato attentamente e il momento ideale per indurlo è tra i 60 e i 45 giorni prima del parto; se avviene oltre i 60 giorni il rischio per l'animale di sviluppare obesità, chetosi (Goldhawk *et al.*,2009) e malattie metaboliche dopo il parto, sono più elevate. Nel caso in cui l'animale non sviluppi queste problematiche però produrrà un quantitativo di latte superiore durante la lattazione successiva.

La messa in asciutta a meno di 45 giorni dal parto è relazionata con un basso rischio di contrarre patologie metaboliche ma è legata ad una curva di lattazione più bassa nel post-partum.

In Israele, alcuni autori hanno evidenziato come un periodo di volontaria attesa di 60 giorni prima dell'inseminazione e quindi un periodo di interparto più lungo, abbia effetti vantaggiosi sulla produzione e sulla fertilità delle vacche. Un vantaggio economico si è avuto in animali con una lattazione più estesa, la stessa cosa è stata rilevata in studi svolti in Svezia (Larsson and Berglund, 2000) e in Australia (Borman *et al.*,2004).

Per esempio se l'interparto è molto esteso, la quantità di latte prodotta alla messa in asciutta è già più bassa e l'animale si presenta all'asciutta più grasso con elevato rischio di sviluppo di patologie metaboliche e riproduttive nel post-partum. Allo stesso modo se la produzione di latte è troppo elevata alla messa in asciutta, caso legato ad un interparto breve, si verificherà una produzione inferiore di latte nella successiva lattazione. L'intervallo di interparto appropriato dipende dal genotipo, dall'ambiente e dall'interazione tra genotipo e ambiente (Horan *et al.*,2005).

Durante il periodo di asciutta gli animali ingeriscono una minor quantità di sostanza secca (produzione di latte nulla, ingombro fetale in addome) e per questo motivo la qualità dei

componenti della dieta deve essere ottima al fine di garantire un adeguato apporto di sostanze nutritive sia da un punto di vista proteico che energetico. Ciò consente di massimizzare il volume ruminale che è condizionato fortemente dall'appetibilità degli alimenti (in particolare del foraggio) e dal comfort ambientale riservato al gruppo delle bovine in asciutta (Hammon *et al.*,2006; Huzzey *et al.*,2007). La ritenzione di placenta e la metrite si presentano più frequentemente nelle bovine che durante l'asciutta hanno avuto carenze energetiche e proteiche nella razione oppure che per motivi di patologie intercorrenti o ambientali (comfort, competizione tra animali) non si sono sufficientemente alimentati.

Il consiglio è quello di assicurare una dieta bilanciata senza eccessi per fornire il giusto apporto di nutrienti in asciutta e durante il periodo di transizione, come si è cercato di fare sia nelle realtà più piccole che in allevamenti di dimensioni maggiori (Drackley e Dann,2008).

Grume *et al.*, (1996), Dann *et al.*, (2005 e 2006), (Douglas *et al.*, (2006); Janovick *et al.*, (2011), Graugnard *et al.*, (2012 e 2013), Ji *et al.*, (2012) hanno dimostrato che il controllo dell'energia ingerita durante il periodo di asciutta può portare ad un migliore risultato durante il periodo di transizione.

Lasciare che questi animali si alimentino in modo incontrollato, li predispone a problemi di salute durantequestoperiodo. Può infatti diminuire il DMI (dry-matter-intake) nel post-partum (Dann *et al.*,2006; Douglas *et al.*,2006; Janovick *et al.*,2011; Drackley,2010) e portare alla presenza di livelli più elevati di NEFA e BHB nel sangue e di TAG (triacilglicerolo) nel fegato (Douglas *et al.*,2006; Jovanovick *et al.*,2011).

Durante il periodo di asciutta, è utile mantenere il BCS e non far dimagrire gli animali per evitare la lipomobilizzazione precoce prima del parto. La mobilizzazione eccessiva di NEFA porta al rischio di sviluppo di una condizione di steatosi anche prima del parto con corpi chetonici in circolo, diminuzione dell'appetito e alimentazione a base di foraggi grossolani da parte degli animali. I problemi di salute relativi ad una eccessiva mobilizzazione lipidica sono stati studiati per molti anni, ma rimane un ostacolo in molte realtà produttive. Questi fattori recentemente sono stati rilevati nei moderni allevamenti di vacche da latte alimentate con TMR dove viene usata una maggiore quantità di insilati di mais come primo foraggio, cosa che accade in molte aree del mondo (Drackley e Cardoso,2014).

Nei 15-20 giorni prima del parto è consigliato alimentare gli animali con una dieta a base di concentrati per aumentare l'energia fornita in modo che l'animale arrivi al parto in condizioni adeguate. Gli eccessi di concentrati possono portare ad una alterazione delle funzioni

riproduttive modificando il pH oppure a causa di un eccesso di ammoniaca (Kadokawa e Martin, 2006).

Tratto da: www.mondolatte.it/index.php/il-babcock-institute/72-l'alimentazione-della-bovina-in-transizione

Durante il periodo di transizione, il calo nell'assunzione di alimenti coincide con il momento in cui i fabbisogni nutritivi aumentano perciò accrescere la concentrazione nutritiva della bovina in transizione è la soluzione a questo problema.

Ci sono vari motivi per cui risulta necessario aumentare la quantità di concentrati prima del parto:

- I microrganismi ruminali si adattano ai concentrati che verranno distribuiti durante le prime fasi di lattazione.
- La distribuzione di concentrati stimola la crescita delle papille ruminali, che sono responsabili dell'assorbimento degli acidi grassi dal rumine. La produzione di acidi aumenta quando vengono distribuiti i cereali, perciò se lo sviluppo delle papille non è adeguatamente stimolato in asciutta, è probabile che la bovina manifesti acidosi se i concentrati vengono distribuiti subito dopo il parto. La crescita e lo sviluppo delle papille richiede diverse settimane, perciò è importante iniziare per tempo la distribuzione di concentrati.
- Aumentare la distribuzione di concentrati stimola anche la produzione di propionato da parte dei batteri ruminali; l'acido propionico viene poi convertito in glucosio nel fegato. Come accade per l'uomo, anche nella bovina, con l'aumento del glucosio ematico, cresce anche l'insulina; quest'ultima riduce la mobilizzazione di grasso dai depositi, con conseguente abbassamento degli acidi grassi ematici. Questo fatto è positivo ed aiuta a prevenire le patologie postparto.
- Aumentare la distribuzione di concentrati prima del parto aiuta anche a stimolare l'appetito. La distribuzione di supplementi di cereali non previene l'inappetenza immediatamente precedente al parto, tuttavia l'assunzione di alimento dovrebbe essere maggiore, pertanto il totale di energia tende ad aumentare.

5.2.1 Effetti di diete differenti in asciutta/ periodo di transizione.

Si pensa che una dieta che fornisce un eccesso di energia in questo momento sia correlata con l'accumulo di tessuto adiposo viscerale in alcune vacche; i NEFA rilasciati da questo tessuto adiposo quindi vanno direttamente al fegato causando eventualmente fegato grasso, chetosi subclinica e problemi secondari alle funzioni epatiche.

Garnsworthy (2007) afferma che il BCS ritenuto ottimale nel periodo di asciutta è diminuito nel tempo con l'aumento della selezione genetica per la produzioni di maggiori quantità di latte, fattore forse correlato a un cambiamento corporeo nel metabolismo delle proteine. Un BCS adeguato viene considerato sui 3.5 in una scala da 1 a 5.

Bisogna ugualmente evitare una diminuzione del BCS troppo marcato in questo periodo monitorando l'ultima fase di lattazione e modificando a tal proposito il tasso di energia nella razione e la frequenza di mungitura.

Drackley e Cardoso (2014) riportano due strategie nutrizionali possibili durante il periodo far-off (FO) o close-up (CU), (asciutta/transizione): dieta ad energia controllata (CE; 13.7Mcal/day) o dieta ad alta energia (HE 22.1 Mcal/day). Le vacche alimentate con HE nelle 4 settimane prima del parto perdono più BCS nelle prime 6 settimane post-partum rispetto alle vacche alimentate CE (-0.43be -0.30 rispettivamente). Gli animali alimentati con CE durante il periodo FO hanno concentrazioni minore di NEFA durante la prima, seconda e terza settimana di lattazione rispetto ad una dieta HE. È risaputo che i livelli più elevati di NEFA nella prima settimana dopo il parto si associa con maggiori probabilità di sviluppare patologie, inoltre le vacche alimentate HE hanno maggior possibilità di avere dislocazioni abomasali o chetosi durante il periodo post-partum rispetto a quelle alimentate con una dieta controllata.

Gli animali nutriti con CE durante il periodo FO hanno maggiori concentrazioni di glucosio nel plasma durante le prime tre settimane dopo il parto, mentre gli animali alimentati con una dieta ad alta energia presentano una più alta concentrazione di lipidi totali e di TAG.

Quindi, una perdita meno marcata di peso corporeo durante le prime sei settimane dopo il parto e una relativa crescita di glucosio nella terza settimana contribuiscono a migliorare le performance riproduttive.

L'aumento dell'espressione del gene della lipolisi (Ji *et al.*,2012) negli animali alimentati con HE porta ad un aumento dei NEFA e quindi ad una diminuzione del DMI in accordo con la teoria dell'ossidazione epatica (Allen *et al.*,2009); al contrario avremo una diminuzione nei

livelli di NEFA plasmatici in risposta ad un cambiamento dei livelli di glucosio nelle vacche alimentate con un livello corretto di energia.

Altri studi hanno dimostrato il verificarsi dell'insulino-resistenza dovuta a un eccesso nel consumo di energia durante il periodo di asciutta (Holtenius *et al.*,2003).

Per assicurare una dieta nutrizionalmente completa gli animali devono essere nutriti con alimenti non grossolani e il TMR (total-mixed-ratio) deve essere processato adeguatamente (Janovick e Drackley,2010). Fornire una alimentazione basata su foraggi grossolani separatamente dalla dieta TMR o con foraggi non correttamente processati porta ad un'assunzione variabile di alimento tra le vacche, con alcune che consumano troppa energia e altre troppo poca. La dieta deve essere formulata con una quantità equilibrata di energia fornita da un rapporto corretto tra tutti i nutrienti essenziali.

Dieta CE (13.7 Mcal/day)	Dieta HE (22.1 Mcal/day)
<ul style="list-style-type: none">• Minor perdita di BCS nelle prime 6 settimane post-partum• Maggior concentrazione di glucosio nelle 3 settimane dopo il parto• Minori livelli di NEFA con minor rischio di sviluppare patologie metaboliche nel post-partum	<ul style="list-style-type: none">• Aumento BCS nelle prime 6 settimane post-partum• Maggior concentrazione di NEFA con diminuzione del DMI e con maggior rischio di sviluppare patologie come dislocazioni abomasali e chetosi nel post-partum• Maggior concentrazione di lipidi totali in circolo e di TAG (triacilglicerolo) nel post-partum• Possibile sviluppo di insulino-resistenza post-partum

Figura 5. 0 [Effetti di una dieta ad energia controllata (CE) e ad alta energia (HE) nel periodo di transizione]

Circa 20 giorni prima del parto, come già detto, deve aumentare l'energia assunta dall'animale in quanto diminuisce l'ingestione di alimento a causa dell'ingombro fetale, ma incrementano i fabbisogni dell'animale per lo sviluppo concomitante del tessuto secernente

mammario. Se l'animale non viene supportato di energia in questo periodo sviluppa una condizione di deficit nutrizionale con mobilitazione delle riserve adipose corporee, incompleta ossidazione dei NEFA e possibile chetosi.

5.3 Strategie manageriali al momento del parto

Al momento del parto gli animali devono trovarsi in un ambiente pulito, con un box fornito di lettiera e in presenza di 2-3 animali per 4-5 giorni al massimo. Il box parto dovrebbe essere situato vicino a quello di asciutta in modo che gli animali partorienti possano avere un contatto visivo con le altre vacche. Inoltre il parto deve avvenire, per quanto possibile, in modo autonomo a meno che non si presentino distocie, in questo caso è opportuno l'intervento di un veterinario (Kadokawa e Martin,2006).

5.4 Strategie per il mantenimento della fertilità effettuate nel post-partum

Il post-partum è un altro momento critico da monitorare al fine di garantire un'ottimale e rapida involuzione uterina e la ripresa dell'attività ciclica ovarica nella bovina.

Le bovine chiamate in gergo "fresche" ossia quelle che hanno appena partorito devono essere controllate giornalmente per valutare la corretta ingestione di alimento, il riposo e la temperatura nei 10 giorni successivi al parto, onde rilevare eventuali metriti.

La prima visita ginecologica deve essere fatta 12 giorni dopo il parto per impostare eventuali terapie delle metriti. Un eventuale altro controllo verrà programmato nei 60 giorni post-partum negli animali in cui non è stato rilevato nessun calore.

Successivamente è consigliabile intraprendere un programma di sincronizzazione, che prevede Pre-Synch e Ov-Synch con lo scopo di ingravidare al più presto tutti gli animali fisiologicamente normali. Questo sistema bypassa eventuali carenze nel rilevamento dei calori. Attraverso il Re-Synch verranno inseminati gli animali vuoti alla diagnosi; sarà compito di una corretta gestione veterinaria della riproduzione recuperare le gravidanze degli animali vuoti dopo il programma di sincronizzazione.

Il management corretto di una bovina nel post-partum si basa sulla prevenzione di metriti, tramite misurazione della temperatura e sulla presenza di corpi chetonici in circolo attraverso il Chetotest.

In questo periodo è necessario fornire all'animale una dieta bilanciata, verificando l'ingestione di sostanza secca e il BCS. Le bovine non devono perdere troppo BCS in questo momento; se questo cala al di sotto dei 2.5 infatti, gli animali difficilmente svilupperanno un altro calore (Kadokawa,2006).

5.4.1 Esempio di dieta nel post-partum

Si sa meno riguardo la formulazione della dieta dell'immediato post-partum per ottimizzare le funzionalità riproduttive nella bovina da latte.

Dann and Nelson (2011) hanno confrontato diete contenenti amido utilizzabili nel post-partum per le vacche alimentate con dieta adeguata durante il periodo di asciutta.

La produzione di latte risultava più elevata quando l'amido contenuto nella dieta era moderato (23.2% del DM) o basso (21% del DM) rispetto ad una dieta ad alto contenuto di amido (25.5 del DM).

Un problema rilevato nel periodo post-partum legato ad un aumento improvviso dell'energia assunta può essere l'acidosi ruminale subacuta (SARA) che può diminuire il DMI e la digeribilità dei nutrienti (Mulligan e Doherty,2008). Se la SARA riduce il DMI (dry matter intake) e diminuisce anche la disponibilità di nutrienti per la vacca, può essere seguita dalla mobilizzazione dei NEFA e da un aumento della chetogenesi. In più la rapida fermentazione dell'amido in presenza della mobilizzazione dei NEFA porta alla liberazione del propionato che raggiunge il fegato e che può diminuire l'assunzione alimentare e il DMI in accordo con la teoria dell'ossidazione epatica (Allen *et al.*,2009).

Un contenuto invece limitato di amido (23% o 25% del DM) di moderata fermentabilità unito ad una adeguata quantità di fibra sembra essere la migliore soluzione per la dieta delle vacche in questo periodo.

La produzione di latte era inoltre maggiore quando il contenuto di amido assunto con la dieta era moderato (23.2% del DM) o basso (21% del DM).

Zebeli e Metzler-Zebeli (2012) hanno inoltre dimostrato che un quantitativo elevato di cereali nella dieta può portare alla presenza di un numero maggiore di batteri Gram negativi quali *Escherichia Coli* con un aumento di endotossine nel rumine, che possono diminuire le funzioni infiammatorie della vacca.

L'adeguata formulazione della dieta, derivata sia dal controllo degli ingredienti che da una corretta miscela degli stessi è inoltre importante per stimolare l'attività ruminale e la masticazione (Zebeli e Metzler-Zebeli, 2012).

La presenza di alimento grossolano (fibra, cellulosa) nei prestomaci infatti è fondamentale per stimolare la ruminazione e la fibra in questione deve essere lunga dai 5 ai 30 *mm*. L'atto della ruminazione consente il ritorno in bocca delle parti grossolane dell'alimento stimolando una nuova masticazione e un'ulteriore insalivazione dell'alimento. Questo stimolo aumenta in presenza di particelle grossolane pertanto maggiore è la quota nella razione, maggiore sarà la produzione di saliva.

La saliva è importante in quanto impedisce l'eccessivo abbassamento del pH ruminale (grazie all'azione tampone dei fosfati e neutralizzante del bicarbonato di sodio), stimola l'attività dei microorganismi e ha un effetto antischiumogeno che evita il meteorismo.

I disordini digestivi solitamente sono correlati con la minor ingestione di fibre e legati all'aumento dello stress metabolico che influisce a livello del tratto gastrointestinale sulla flora microbica. Questo si evidenzia con l'alterazione delle funzioni della barriera dell'epitelio gastrointestinale (GI), che permette a molecole nocive di passare dal lume intestinale al sistema portale (Zebeli-Metzler-Zebeli,2012), altera l'omeostasi a questo livello e scatena una risposta infiammatoria.

Le endotossine e altri componenti di origine microbica, ad esempio, sono degli importanti fattori che agiscono quando la GI è danneggiata stimolando l'APR (acute phase reaction o reazione di fase acuta). Anche se la risposta infiammatoria è un meccanismo di protezione dell'organismo, se si protrae per periodi di tempo prolungati porta a conseguenza negative nell'ospite causando cambiamenti nel metabolismo di energia e lipidi a livello di differenti tessuti, alla soppressione del sistema immunitario e aumenta le richieste da parte dell'ospite di nutrienti in quanto diminuisce la capacità di assorbimento ruminale degli stessi.

Risulta dunque importante la formulazione di una dieta adeguata per evitare lo sviluppo di un'inflammatione e permettere uno stato metabolico funzionale nella bovina da latte (Zebeli e Metzler-Zebeli, 2012).

CONCLUSIONI

Nella stesura di questo lavoro sono stati messi in luce i fattori stressanti e nutrizionali che interferiscono con l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadale (HPG) riducendo la fertilità dell'animale; è stata inoltre messa in evidenza la relazione tra gli stressors e il bilancio energetico anche se gli studi effettuati si riferiscono agli essere umani e ad animali da laboratorio e non a quelli da reddito.

Sia gli stressors che gli ormoni metabolici legati all'alimentazione causano un ritardo nel recupero della ciclicità ovarica dopo il parto, un interparto più lungo del normale e una ridotta qualità degli ovociti. La dieta iperproteica invece altera ugualmente la fertilità degli animali, ma andando ad agire sui cambi del pH e sull'ambiente uterino provocando alterazioni dello sviluppo embrionale.

La maggior parte dei meccanismi presi in considerazione interagiscono a diversi livelli dell'asse HPG bloccando la secrezione di GnRH da parte dell'ipotalamo e, di conseguenza, i *pulse* di LH e l'ovulazione. Per questo il momento ovulatorio risulta il punto chiave nell'alterazione del ciclo estrale dal quale nascono i problemi relativi all'infertilità della bovina da latte.

Nella realtà macroscopica invece questo concetto si evidenzia con un ritardo nel ritorno alla ciclicità dell'animale, con lo sviluppo di cisti ovariche e con altri disordini dell'apparato riproduttore che nel complesso riducono la fertilità dell'animale e portano ad ingenti perdite economiche nella realtà dell'allevamento.

È importante, per evitarlo, porre l'attenzione sul trinomio "fattori ambientali, manageriali e nutrizionali" che si traduce nella prevenzione di tali situazioni assicurando una buona gestione della mandria dal punto di vista riproduttivo.

Ritengo che, nell'aspetto nutrizionale, siano stati fatti nel corso degli ultimi decenni evidenti miglioramenti per cercare di fornire all'animale una dieta adeguata alle sue esigenze con risultati soddisfacenti, mentre risulta ancora sottovalutata l'importanza data ai fattori ambientali e al comfort dell'animale. Questi ultimi due aspetti infatti influiscono al pari dell'alimentazione nel garantire condizioni di fertilità alla bovina da latte ed è necessario tenerli maggiormente in considerazione, in quanto gli effetti di una dieta adeguata possono essere annullati se non viene data la giusta importanza alle condizioni ambientali e agli interventi manageriali.

Nuove ricerche, in campo della genetica, stanno acquisendo importanza riguardo il tema della fertilità. In questi studi infatti l'eccesso di consanguineità nella razza Frisona porta a insufficienze riproduttive marcate nella progenie, mentre incroci tra razze diverse danno migliori risultati a livello riproduttivo.

Inoltre l'ottimizzazione del management nutrizionale di cui si è a lungo discusso nella stesura di questa tesi è molto difficile da raggiungere a causa delle importanti differenze tra gli animali all'interno di uno stesso allevamento. Le nuove scoperte in campo genetico mirano proprio alla riduzione di queste differenze individuali tra gli animali al fine di permettere agli allevatori di utilizzare un'unica strategia di management per incontrare uniformemente le esigenze della mandria e assicurare un miglioramento nella fertilità degli animali, aumentando ad esempio la capacità delle vacche di adattarsi ai cambiamenti nutrizionali.

A livello macroscopico dunque la corretta gestione delle bovine porterà alla diminuzione dei fattori stressanti nelle varie fasi di vita degli animali e a livello endocrino a un minor disequilibrio dell'asse HPA (ipotalamo-ipofisi-surrene) e HPG (ipotalamo-ipofisi-gonadi) con conseguente miglioramento della fertilità nella bovina da latte.

Bibliografia

Adam CL, Gadd TS, Findlay PA, Whates DC, 2000. Insuline like growth factpr (IGF-1) stimulation of luteinizing hormone secretion, and expression of Mrna for IGFs, their receptors and binding proteins in the ovine pituitary gland. *J Endocrinol.* 166: 247-254.

Adamiak SJ, Mackie K, Watt RG, Webb R, Sinclair KD, 2005. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effect of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biol Reprod.* 73: 918-926.

Adams GP, Evans ACO, Rawlings NC, 1994. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month- old prepubertal heifers. *J Reprod Fertil.* 100: 27-33.

Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OJ, 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Repreod Fertil.* 94:177-188.

Aguilar-Perez C, Ku-Vera J, Garnworthy PC, 2009. Effects of bypass fat on energy balance, milk production and reproduction in grazing crossbred cows in the tropics. *Livestock Science.*121: 64-71.

Ahima RS, Flier JS, 2000. Leptin. *Annual Review of Physiology.* 62: 413–437.

Alario P, Gamallo A, Beato MJ, Trancho G, 1987. Body weight gain, food intake and adrenal development in chronic noise stressed rats. *Physiol Behav.* 40:29-32.

Allen MS , Bradford BJ, Oba M, 2009. The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. *Journal of Dairy Science.* 91: 3259-3267.

Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB, 1999. The role of corticotrophin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol.* 160:1-12.

Archbold H, Shalloo L, Kennedy E, Pierce KM, Buckley F, 2012. Influence of age, body weight and body condition score before manting start date on the pubertal rate of maiden Holstein-Friesian heifers and implications for subsequent cow performance and profitability. *Animal* 6. 1143- 1151.

Atti della conferenza SIET, 2-3 Ottobre 2015, Abano Terme.

Bach A, Valls N, Solans A, Torrent T, 2008. Association between nondietary factors and dairy herd performance. *Journal of Dairy Science.* 91: 3259-3267.

- Ball PJH, McEwan EEA**, 1998. The incidence of prolonged luteal function following early resumption of ovarian activity in postpartum dairy cows. *Proc Br Soc Anim Sci.* 187 abstr.
- Barber MC, Clegg RA, Travers MT, Vernon RG**, 1997. Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1347** 101–126.
- Battaglia DF, Bowen JM, Krasa HB, Thrun LA, Vigiùè C, Karsch FJ**, 1997. Endotoxin inhibits the reproductive neuroendocrine axis while stimulating adrenal steroids: a simultaneous view from hypophyseal portal and peripheral blood. *Endocrinology.* 138: 4273-4281.
- Bauman DE**, 2000. Regulation of nutrient partitioning during lactation: homeostasis and homeorhesis revisited. *Ruminant Physiology, Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction. Proceedings of the 9th International Symposium on Ruminant Physiology,* 311–328.
- Bauman DE, Currie WB**, 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science.* 63: 1514–1529.
- Bauman DE, Elliot JM**, 1983. Control of nutrient partitioning in lactating ruminants. In *Biochemistry of Lactation*, 437–468.
- Bauman DE, Vernon RG**, 1993. Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation. *Annual Review of nutrition.* 13: 437-461.
- Beam SW, Butler WR**, 1999. Effect of energy balance on follicular development and first ovulation in post-partum dairy cows. *J Reprod Fertil.* 54: 411-424.
- Bell AW**, 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Anim Sci.* 73: 2804-2819.
- Bell AW, Burhans WS, Overton TR**, 2000. Protein nutrition in late pregnancy, maternal protein reserves and lactation performance in dairy cows. *Proceedings of the Nutrition Society.* 59: 119-136.
- Bergfeld EGM, Kojima FN, Cupp AS, Wehrman ME, Peters KE, Mariscal V, Sanchez T, Kinder JE**, 1996. Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 beta-estradiol in bovine females. *Biol Reprod.* 54: 546-553.
- Berry DP, Buckley F, Dillon P, Evans RD, Rath M, Veerkamp RF**, 2003. Genetic parameters for body condition score, body weight, milk yield, and fertility estimated using random regression models. *J Dairy Sci.* 86: 3704- 3717.

- Bhatia V, Tandon RK**, 2005. Stress and the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol Hepatol.* 20: 332-339.
- Bishonga C, Robinson JJ, McEvoy TG, Findlay J, Aiten RP, Robertson I**, 1996. Excess dietary urea intake in ewes and its effect on ovulation rate and embryo development. *Jpn. J. Vet. Res.* 44:139–151.
- Bjorntorp P, Holm G, Rosmond R, Folkow B**, 2000. Hypertension and the metabolic syndrome : closely related central origin? *Blood press.* 9: 71-82.
- Blache D, Tellam RL, Chagas LM, Blackberry MA, Vercoe PE, Martin GB**, 2000. Level of nutrition affects leptin concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in sheep. *Journal of Endocrinology.* 165: 625–637.
- Blanchard T, Ferguson JD, Love L, Takeda T, Henderson B, Hasler J, Chalupa W**, 1990. Effect of dietary crude protein type on fertilization and embryo quality in dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.* 51:905–908.
- Block J**, 2007. Use of insuline-like growth factor -1 to improve post-transfer serviva of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology.* 68(Suppl 1): S49-255.
- Boelhaue M, Sinowatz F, Wolf E, Paula-Lopes FF**, 2005. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts. *Biol Reprod.* 73: 737-744.
- Boichard D, Barbarat A, Briend M**, 1998. Evaluation gènétique des caractères de fertilité femelle chez les bovins laitiers. *Renc Rech Rum.* 5: 103-106.
- Borman JM, MacMillan KL, Fahey J**, 2004. The potential for extended lactations in Victoriaan dairying: A review. *Australian J Exp Agric.* 44: 507-519.
- Bornfeldt KE, Arnqvist HJ, Enberg B, Mathews LS & Norstedt G**, 1989. Regulation of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor gene expression by diabetes and nutritional state in rat tissues. *Journal of Endocrinology.* 122: 651–656.
- Boryczo Z, Bostedt H, Hoffmann B**, 1995. Comparison of the hormonal and chemical composition of the fluid from bovine ovarian follicles and cysts. *Reprod Dom Anim.* 30:36-38.
- Bosu WTK, Peter AT**, 1987. Evidence for a role of intrauterine infections in the pathogenesis of cystic ovaries in postpartum dairy cows. *Theriogenology.* 28: 725-736.
- Brameld JM, Atkinson JL, Saunders JC, Pell JM, Buttery PJ, Gilmour RS**, 1996. Effects of growth hormone administration and dietary protein intake on insulin-like growth factor I

and growth hormone receptor mRNA expression in porcine liver, skeletal muscle, and adipose tissue. *Journal of Animal Science*. 74: 1832–1841.

Breen KM, Kersch FJ, 2004. Does cortisol inhibit pulsatile luteinizing hormone secretion at the hypothalamic or pituitary level? *Endocrinology*. 145: 692-698.

Britt JH, Harrison DS, Morrow DA, 1977. Frequency of ovarian follicular cysts, reasons for culling, and fertility in Holstein-Friesian cows given gonadotropin-releasing hormone at two weeks after parturition. *Am J Vet Res*. 38: 749-751.

Britt JH, Lamming GE, Harrison DS, 1974. Ovulation, estrus and endocrine response after GnRH in early postpartum cows. *J Anim Sci*. 39: 915-919.

Buckley F, O' Sullivan K, Mee JF, Evans RD, Dillon P, 2003. Relationships among milk yield, body condition, cow weight, and reproduction in spring-calved Holstein-Friesian. *Journal of Dairy Science*. 86: 2308-2319.

Bullman DC, Lamming GE, 1977. Cases of prolonged luteal activity in the non-pregnant dairy cows. *Vet Rec*. 100: 550-552.

Bullman DC, Wood PDP, 1980. Abnormal patterns of ovarian activity in dairy cows and their relationship with reproductive performance. *Anim Prod*. 30: 177-188.

Butler ST, Marr AL, Pelton SH, Radcliff

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

Butler WR, 2003. Energy balance relationship with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livest Prod Sci*. 83: 211-221.

Butler WR, Calaman JJ, Beam SW, 1996. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *J. Anim. Sci*. 74:858–865.

Butler WR, 1998. Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 81:2533-2539.

Caldari-Torres C, Rodriguez-Sallaberry C, Greene ES, Badinga L, 2006. Differential effects of n-3 and n-6 fatty acids on prostaglandin F2a production by bovine endometrial cells. *Journal of Dairy Science*. 89:971-977.

Choi BR, Palmquist DL, Allen MS, 1996. Effects of endogenous cholecystokinin (CCK) on feed intake, plasma insulin, pancreatic polypeptide (PP) and metabolite levels in heifers fed fat" *Journal of Dairy Science*. 79:169-176.

Cohen JI, 2000. Stress and mental health: a biobehavioral perspective. *Issues Ment Health Nurs*. 21: 185-202.

Colazo MG, Hayirli A, Doepel L, Ambrose DJ, 2009. Reproductive performance of dairy cows is influenced by prepartum feed restriction and dietary fatty acid source. *Journal of Dairy Science*. 92: 2562-2571.

Coleman ES, Elsasser TH, Kempainen RJ, Coleman DA, Sartin JL, 1993. Effect of endotoxin on pituitary hormone secretion in sheep. *Neuroendocrinology*. 58:111-122.

Contreras GA, Sordillo LM, 2011. Lipid mobilization and inflammatory response during the transition period of dairy cows. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*. 34: 281-289.

Crowe MA, Kelly P, Driancourt MA, Boland MP, Roche JF, 2001. Effect of follicle-stimulating hormone with and without luteinizing hormone on serum hormone concentrations, follicle growth, and intrafollicular estradiol and aromatase activity in gonadotropin-releasing hormone- immunized heifers. *Biol Reprod*. 64: 368-374.

Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA, 1999. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod*. 60: 216-222.

Cupp AS, Stumpf TT, Kojima FN, Werth LA, Wolfe MW, Roberson RJ, Kittok RJ, 1995. Secretions of gonadotropins change during the luteal phase of the bovine estrous cycle without corresponding changes in progesterone or 17 β -estradiol. *Anim Reprod Sci*. 37: 109-119.

Dalman MF, Akana SF, Scribner KA, Bradbury MJ, Walker CD, Strack AM, Cascio CS, 1992. Stress, feedback and facilitation in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol*. 4: 517-526.

Dann HM, Morin DE, Murphy MR, Bollero GA, Drackley JK, 2005. Prepartum intake, post-partum induction of ketosis, and periparturient disorders affect the metabolic status of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 88: 3249- 3264.

Dann HM, Litherland NB, Underwood JP, Bionaz M, D'Angelo A, McFadden JW, Drackley JK, 2006. Diets during far off and close-up dry periods affect periparturient metabolism and lactation in multiparous cows. *Journal of Dairy Science*. 89: 3563-3577.

Dann HM, Nelson BH, 2001. Early lactation diets for dairy cattle-focus on starch. In proceeding of the 2011 Nutrition Conference for Feed Manufacturers, Syracuse, NY, USA.

Day ML, Imakawa K, Wolfe PL, Kittok RJ, Kinder JE, 1987. Endocrine mechanisms of puberty in heifers, Role of hipotala-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Biol Reprod*. 37: 1054-1065.

- De Veth MJ, Bauman DE, Koch W, Mann GE, Pfeiffer AM, Butler WR**, 2009. Efficacy of conjugated linoleic acid for improving reproduction: a multi-study analysis in early-lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 92:2662-2669.
- de Veth, M., D. Bauman, W. Koch, G. Mann, A. Pfeiffer, and W. Butler**, 2009. Efficacy of conjugated linoleic acid for improving reproduction: A multi-study analysis in early-lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:2662-2669.
- DeGaris P, Lean I, Rabiee A, and Heuer C**, 2010a. Effects of increasing days of exposure to prepartum transition diets on reproduction and health in dairy cows. *Aust. Vet. J.* 88:84–92.
- DeGaris, P., I. Lean, A. Rabiee, and M. Stevenson**, 2010b. Effects of increasing days of exposure to prepartum diets on the concentration of certain blood metabolites in dairy cows. *Aust. Vet. J.* 88:137–145.
- Delavaud C, Bocquier F, Chilliard Y, Keisler DH, Gertler A, Kann G**, 2000. Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *Journal of Endocrinology*. 165: 519–526.
- Dinsmore RP, White ME, Guard CL, Jasko DL, Perdrizet JA, Powers PM, Smith MC**, 1989. Effect of gonadotropin-releasing hormone on clinical response and fertility in cows with cystic ovaries as related to milk progesterone concentration and days after parturition. *J.A.V.M.A.* 195:327-330.
- Diskin MG, Morris DG**, 2008. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*. 43 (Suppl 2): 260-267.
- Dobson H, Alam MGS, Kanchev LN**, 1987. Effect of betamethasone treatment on luteal lifespan and the LH response to GnRH in dairy cows. *J Reprod Fertil.* 80: 25-30.
- Dobson H, Essewy SA, Alam MG**, 1988. Suppression of LH response to gonadotrophin-releasing hormone or oestradiol by ACTH (1-24) treatment in anoestrous ewes. *J Endocrinol.* 118: 193-197.
- Dobson H, Ghuman S, Prabhakar S, Smith R**, 2003. A conceptual model of the influence of stress on female reproduction. *Reproduction*. 125:151-163.
- Dobson H, Ribadu AY, Noble KM, Tebble JE, Ward WR**, 2000. Ultrasound and hormone profiles of ACTH-induced persistent ovarian follicles (cysts in cattle). *J Reprod Fert.* (in press)
- Dobson H, Smith RF**, 2000. What is stress and how does it affect fertility? *Anim Repro Sci.* 60: 743-752.

- Dobson H, Smith RF**, 2000. What is stress and how does it affect reproduction? *Anim Reprod Sci.* 60-61: 743-752.
- Dobson H, Tebble JE, Ozturk M, Smith RF**, 1999b. *J Reprod Fertil* (in press)
- Dobson H, Tebble JE, Smith RF, Ward WR**, 2001. IS STRESS REALLY ALL THAT IMPORTANT? *Theriogenology.* 55: 65-73.
- Douglas GN, Overton TR, Bateman HG, Dann HM, Drackley JK**, 2006. Prepartal plane of nutrition, regardless of dietary energy source affects periparturient metabolism and dry matter intake in Holstein cows. *Journal of Dairy Science.* 89: 2141-2157.
- Drackley JK, Cardoso FC**, 2014. *Prepartum* and *postpartum* nutritional management to optimize fertility in high-yielding dairy cows in confined TMR systems. *Animal.* 8: 5-14.
- Drackley JK, Dann HM, Douglas GN, Janovick Guretzky NA, Litherland NB, Underwood JP and Loor JJ**, 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 JK, Overton TR, Douglas GN**, 2001. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science.* 84 (E Suppl.): E100-E112.
- Drobny EC, Abramson EC, Baumann G**, 1982. Insulin Receptors in Acute Infection: A Study of Factors Conferring Insulin Resistance. *Clin Res.* 30:389A.
- Edens E, Talamantes F**, 1998. Alternative processing of growth hormone receptor transcripts. *Endocrine Reviews.* 19: 559-582.
- Ehrhardt RA, Slepetic RM, VanAmburgh ME, Siegal-Willot J, Bell AW, Boisclair YR**, 2000. Development of a specific RIA to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. *Journal of Endocrinology.* 166: 519-528.
- Elrod CC, Butler WR**, 1993. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *J. Anim. Sci.* 71:694-701.
- Erb HN, Martin SW, Ison N, Swaminathan S**, 1981. Interrelationships between production and reproduction diseases in Holstein cows. Conditional relationships between production and disease. *J Dairy Sci.* 64: 272-1071.
- Erb HN, Surve AH, Callahan CJ, Randel RD, Garverick HA**, 1973. Reproductive steroids in the bovine. Changes postpartum. *J Anim Sci.* 33:1060-1071.
- Etherton TD, Bauman DE**, 1998 Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiological Reviews.* 78: 745-761.

- Evans ACO, Adams GP, Rawlings NC**, 1994. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *J Reprod Fertil.* 102: 463-470.
- Fahey J, Boland MP, O'Callaghan D**, 2001. The effects of dietary urea on embryo development in superovulated donor ewes and on a early embryo survival and development in recipient ewes" *Animal Science.*72: 395-400.
- Farin PW, Youghquist RS, Parfet JR, Garverick HA**, 1992. Diagnosis of luteal and follicular ovarian cysts by palpation for rectus and linear-array ultrasonography in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc.* 200: 1085-1089.
- Fenwick MA, Llewellyn S, Fitzpatrick R, Kenny DA, Murphy JJ, Patton J, Whates DC**, 2008. Negative energy balance in dairy cows is associated with specific changes in IGF-binding protein expression in the oviduct. *Reproduction .* 135: 63-75.
- Ferguson JD, Chalupa W**, 1989. Impact of protein nutrition on reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72: 746–766.
- Ferguson JD, Galligan DT, Blanchard T, Reeves M**, 1993. Serum urea nitrogen and conception rate: the usefulness of test information. *J. Dairy Sci.* 76:3742–3746.
- Folkow B**, 1997. Physiological aspects of the “defence” and “defeat” reactions. *Acta Physiol Scand Suppl.*640: 34-7.
- Forhead AJ, Dobson H**, 1997. Plasma glucose and cortisol responses to exogenous insulin in fasted donkeys. *Res Vet Sci.* 62: 265-269.
- Friedman JM, Halaas JL**, 1998 Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 395: 763–770.
- Garcia-Bojalil CM, Staples CR, Thatcher WW, Drost M**, 1994. Protein intake and development of ovarian follicles and embryos of superovulated nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77:2537–2548.
- Garnshwarty PC, Fouladi-Nashta AA, Mann GE, Sinclair KD, Webb R**, 2009. Effect of dietary induced changes in plasma insulin concentrations during the early post partum period on pregnancy rate in dairy cows. *Reproduction.* 137: 759-768.
- Garnsworthy PC, 2007.** Body condition score in dairy cows: targets for production and fertility. In recent advances in animal nutrition. Pp. 61-86.
- Garnsworthy PC, Lock A, Mann GE, Sinclair KD, Webb R**, 2008. Nutrition, metabolism and fertility in dairy cows: 2. dietary fatty acids and ovarian function. *Journal of Dairy Science.* 91: 3824-3833.
- Garverick HA**, 1997. Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci.* 80: 995-1004.

- Garverick HA, Smith MF**, 1986. Mechanisms associated with subnormal luteal function. *J Anim Sci.* 62: 25-46.
- Ginther OJ, Knopf L, Kastelic GP**, 1989. Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biol Reprod.* 87: 247-254.
- Ginther OJ, Knopf L, Kastelic GP**, 1989b. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycle with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil.* 87: 223-230.
- Ginther OJ, Kot K, Kulick LJ, Martins S, Wiltbank MC**, 1996. Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. *J Reprod Fertil.* 108 :271-279.
- Gnemmi C, Maraboli C, Casalone M, Moroni P**, 2005. Gestione riproduttiva: approccio di campo. *Summa.* 5: 11–20.
- Goff JP, Horst RL**, 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *Journal of Dairy Science.* 80: 1260–1268.
- Goldhawk C, Chapinal N, Veiral DM, Weary DM, von Keyserlingk MA**, 2009. Prepartum feeding behavior is an early indicator of subclinical ketosis. *Journal of Dairy Science.* 92: 4971-4977.
- Gong JG, Lee WJ, Garnsworthy PC, Webb R**, 2002. Effect of dietary induced increases of circulating insulin concentrations during the early post-partum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction.* 123: 419-427.
- Grant RJ, Albright JL**, 1995. Feeding behaviour and management factors during the transition period in dairy cattle. *Journal of Animal Science.* 73: 2791–2803.
- Grings EE, Roffler RE, Deitelhoff DP**, 1991. Response of dairy cows in early lactation to additions of cottonseed meal in alfalfa-based diets. *J. Dairy Sci.* 74:2580–2587.
- Grum DE, Drackley jK, Younker RS, account DW, Veenhuizen JJ**, 1996. Nutrition during the dry period and hepatic lipid metabolism of periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 79: 1850-1864.
- Grummer RR**, 1993. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 76: 3882– 3896.
- Grunert E, Volker R, Schams D, Schallenberger E**, 1992. Gonadotropin release and course of diseases after administration of a GnRH-analog in cattle with follicular-theca cysts. *Tierarztl. Prax.* 20:141-144.

Gutierrez CG, Gong JG, Bramley TA, Webb R, 2006. Selection on predicted breeding value for milk production delays ovulation independently of changes in follicular development, milk production and body weight. *Anim Reprod Sci.* 95: 193-205.

Gömen A and Wiltbank MC, 2001. Hormonal changes after manual rupture of follicular cysts. *J Dairy Sci.* 84 (Suppl 1): 464 abstr.

Gömen A, Sartori R, Costa F, Wiltbank MC, 2001. A GnRH/LH surge without subsequent progesterone exposure can induce development of follicular cysts, *J Dairy Sci.* (in press).

Gömen A, Wiltbank MC, 2000. Follicular cysts in cattle involve an alteration in the hypothalamic action of estradiol due to lack of progesterone exposure. *Biol Reprod.* 62 (Suppl 1): 160 abstr.

Halford JC, 2001. Pharmacology of appetite suppression: implication for the treatment of obesity. *Curr Drug Targets.* 2: 353-370.

Hammon DS, Ewejen IM, Dhiman TR, Goff JP, Walters JL, 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 113: 21-29.

Hansen PJ , 2011. The immunology of early pregnancy in farm animals. *Reprod Domestic Anim.* 46 (Suppl 3): 18-30.

Hanzen C, Pieterse M, Scienczi O, Drost M, 2000. Relative accuracy of the identification of ovarian structures in the cow by ultrasonography and palpation per rectum. *Vet j.* 159: 161-170.

Hare E, Norman HD, Wright JR, 2006. Survival rates and productive herd life of dairy cattlenin the United States. *J Dairy Sci.* 89: 3713-3720.

Harris RBS, Zhou J, Youngblood BD, Rybkin II, Smagin GN, Ryan DH, 1998. Effect of repeated stress on body weight and body composition of rats fed low and hig-fat diets. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 44: R1928-1938.

Harris TG, Battaglia DF, Brown ME, Brown MB, Carlson NE, Vigiùè C, Williams CY, Karsch FJ, 2000. Prostaglandins mediate the endotoxin induced suppression of pulsatile gonadotropin- releasing hormone and luteinizing hormone secretion in the ewe. *Endocrinology.* 141: 1050-1058.

Hatler TB, Yelton DW, Hayes SH, Nugent AM, Silvia WJ, 2000. Concentration of progesterone in lactating dairy cows with ovarian follicular cysts. Relationship to subsequent follicular development. *J Dairy Sci .* 83 (Suppl 1):215 abstr.

- Hayirli A, Grummer RR, Nordheim EV, Crump**, 2002. Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. *J Dairy Sci.* 85: 3430-3443.
- Heinrichs SC, Cole BJ, Merlo Pich E, Menzaghi F, Koob GF, Hauger RL**, 1992. Endogenous corticotrophin-releasing factor modulates feeding induced by neuropeptide Y or a tail-pinch stressor. *Peptides.* 13: 879-884.
- Henry BA, Goding JW, Alexander WS, Tilbrook AJ, Canny BJ, Dunshea F, Rao A, Mansell A, Clarke IJ**, 1999. Central administration of leptin to ovariectomized ewes inhibits food intake without affecting the secretion of hormones from the pituitary gland: evidence for a dissociation of effects on appetite and neuroendocrine function. *Endocrinology.* 140: 1175–1182.
- Herbison AE**, 1997. Noradrenergic regulation of cyclic GnRH secretion. *Reviews of Reproduction.* 2: 1-6.
- Herbison AE**, 1998. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrine Reviews.* 19: 302-330.
- Holtenius K, Agenäs S, Delavaud C, Chillard Y**, 2003. Effect of feeding intensity during the dry period. 2. Metabolic and hormonal responses. *Journal of Dairy Science.* 86: 883-891.
- Hooijer GA, Frankena K, Valks MMH, Shuring M**, 1999. Treatment of cystic disease in dairy cows with gonadotropin-releasing hormone: a field study. *Vet Quart.* 21:33-37.
- Hooijer GA, van Oijen MAAJ, Frankena K, Valks MMH**, 2001. Fertility parameters of dairy cows with cystic ovarian disease after treatment with gonadotropin-releasing hormone. *Vet Rec.* 149:383-386.
- Horan B, Dillon P, Faverdin P, Delaby L, Buckley F, Rath M**, 2005. The interaction of strain of Holstein-Friesian cows and pasture-based feed systems on milk yield, body weight, and body condition score. *Journal of Dairy Science.* 88: 1231-1243.
- Hunter MG**, 1991. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. *J Reprod fertil.* 43: 91-99.
- Huzsenicza G, Janosi S, Kulcsar M, Korodi P, Dieleman SJ, Bartyik J, Rudas P, Ribiczei-Szabo P**, 1998. Gram-negative mastitis in early lactation may interfere with ovarian and certain endocrine functions and metabolism in dairy cows. *Repre Dom Anim.* 33:147-153.

- Huzzey JM, Veira DM, Weary DM, von Keyserlingk MA**, 2007. Prepartum behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis. *Journal of Dairy Science*. 90:3220-3233.
- Ingvarsen KL**, 2006. Feeding and management-related diseases in the transition cow. Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related disease. *Animal Feed Science and Technology*. 126: 175-213.
- Ingvarsen KL, Andersen JB**, 2000. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *Journal of Dairy Science*. 83: 1573–1597.
- Ingvarsen KL, Bosclair YR**, 2001. Leptin and the regulation of food intake , energy homeostasis and immunity with special focus on periparturient ruminants. *Domestic Anim Endocrinol*. 21: 215-250.
- Ingvarsen KL, Friggens NC**, 2005. To what extent do variabilities in hormones, metabolites and energy intake explain variability in milk yield? *Domestic Anim Endocrinol*. 29: 294-304.
- Ingvarsen KL, Moyes K**, 2013. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. *Animal*. 7 (suppl. 1): 112–122.
- Janovick NA e Drackley JK**, 2010. Prepartum dietary management of energy intake affects postpartum intake and lactation performance by primiparous and multiparous Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 93:3086-3102.
- Janovick NA, Boisclair YR, Drackley JK**, 2011. Prepartum dietary energy intake affect metabolism and health during the periparturient period in primiparous and multiparous Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 93: 3086-3102.
- Jerred MJ, Carroll DJ, Combs DK, Grummer RR**, 1990. Effects of fat supplementation and immature alfalfa to concentrate ratio on lactation performance of dairy cattle. *J. Dairy Sci*. 73:2842–2854.
- Ji P, Osorio JS, Drackley JK, Looor JJ**, 2012. Overfeeding a moderate energy diet prepartum does not impare bovine subcutaneous adipose tissue insulin transduction and induce marked changes in peripartal gene network expression. *Journal of Dairy Science*. 95: 4333-4351.
- Ji S, Willis GM, Scott RR e Spurlock ME**, 1998. Partial cloning and expression of the bovine leptin gene. *Animal Biotechnology*. 9: 1–14.
- Jordan ER., Chapman TE, Holtan DW, Swanson LW**, 1983. Relationship of dietary crude protein to composition of uterine secretions and blood in high-producing dairy cows. *J. Dairy Sci*. 66:1854–1862.

- Jordan ER., Swanson LV,** 1979. Serum progesterone and luteinizing hormone in dairy cattle fed varying levels of crude protein. *J. Anim. Sci.* 48:1154–1158.
- Jou P, Buckrell BC, Liptrap RM, Summerlee AJS, Johnson WH,** 1999. Evaluation of the effect of GnRH on follicular ovarian cysts in dairy cows using trans-rectal ultrasonography. *Theriogenology.* 52:923-937.
- Kadokawa H, Martin GB,** 2006. A new prospective on Management of Reproduction in Dairy Cows: the Need for Detail Metabolic information, an Improved Selection index and Extended lactation. *Journal of reproduction and Development.* 52: 161-168.
- Kesler DJ, Garverick HA, Bierschwal CJ, Elmore RG, Youngquist RS,** 1979. Reproductive hormones associated with normal and abnormal changes in ovarian follicles in postpartum dairy cows. *J Dairy Sci.* 62: 1290-1296.
- Kimura K, Goff JP, Kehrli ME Jr and Reinhardt TA,** 2002. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. *Journal of Dairy Science.* 85: 544-550.
- Kinder JE, Day ML, Kitton RJ,** 1987. Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. *Journal of Reproduction and Fertility suppl.* 34: 167-186.
- Kobayashi Y, Boyd CK, Bracken CJ, Lamberson WR, Keisler DH, Lucy MC,** 1999a. Reduced growth hormone receptor (GHR) messenger ribonucleic acid in liver of periparturient cattle is caused by a specific down-regulation of GHR 1A that is associated with decreased insulin-like growth factor I. *Endocrinology.* 140: 3947–3954.
- Konig S, Chang YM, von Borstel UU, Gianola D, Simianer H,** 2008. Genetic and phenotypic relationship among milk urea nitrogen, fertility, and milk yield in Holstein cows. *J Dairy Si.* 91: 4372-4382.
- Krebs H, Macht, M, Weyers P, Weijers HG, Janke W,** 1996. Effect of stressful noise on eating and non-eating behavior in rats. *Appetite.* 26: 193-202.
- Kung JL, Huber JT,** 1983. Performance of high producing cows in early lactation fed protein of varying amounts, sources and degradability. *J. Dairy Sci.* 66:227–234.
- Kurina LM, Weiss LA, Graves SW, Parry R, Williams GH, Abney M,** 2005. Sex differences in the genetic basis of morning serum cortisol levels: genome-wide screen identifies two novel loci specific to women. *J Clin Endocrinol Metab.* 90 (8): 4747-4752.
- Larsson B, Berglund B,** 2000. Reproductive performance in cows with extended calving interval. *Reprod Dom Anim.* 35:277-280.
- Lean IJ, Van Saun R and Degaris PJ,** 2013a. Energy and protein nutrition management of transition dairy cows. *Veterinary Clinics North America Food Animal Practice.* 29: 337-366.

- Lee CN, Cook DL, Parfet JR, Smith CA, Youngquist RS, Garverick HA, 1988.** Induction of persistent ovarian follicular structures following administration of progesterone near the onset of estrus in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 71: 3505-3508.
- Leroy JL, Opsomer G, Van Soom A, Goovaerts IG, Bols PE, 2008 a.** Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reprod Domest Anim.* 43: 612-622.
- Leroy JL, Opsomer G, Van Soom A, Goovaerts IG, Bols PE, 2008 b.** Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part II. Mechanisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reprod Domest Anim.* 43: 623-632.
- Levine AS and Billington CJ, 1997.** Why do we eat? A neural systems approach. *Annu Rev Nutr.* 17: 597-619.
- Li PS, Wagner WC, 1983.** Effects of hyperadrenal states on luteinizing hormone in cattle. *Biol Reprod.* 29:11-24.
- Llewellyn S, Fitzpatrick R, Kenny DA, Murphy JJ, Scaramuzzi RJ, Whates DC, 2007.** Effect of negative energy balance on the insulin-like growth factor system during uterine involution in pre recruitment ovarian follicles of post partum dairy cows. *Reproduction.* 133: 627-639.
- Llewellyn S, Fitzpatrick R, Kenny DA, Patton J, Whates DC, 2008.** Endometrial expression of the insulin-like growth factor system during the involution in the post partum dairy cows. *Domest Anim Endocrinol.* 34: 391-402.
- Lloor JJ, Dann HM, Everts RE, Oliveira R, Green CA, Rodriguez-Zas SL, Lewin HA, Drackley JK, 2005.** Temporal gene expression profiling of liver from periparturient dairy cows reveals complex adaptive mechanisms in hepatic function. *Physiol Genomics.* 23: 217-226.
- Lloor JJ, Dann HM, Guretzky NA, Everts RE, Oliveira R, Green CA, Litherland NB, Rodriguez -Zas SL, Lewin HA, Drackley JK, 2006.** Plane of nutrition prepartum alters hepatic gene expression and functions in dairy cows as assessed by longitudinal transcript and metabolic profiling. *Physiol Genomics.* 27:29-41.
- Lloor JJ, Everts RE, Bionaz M, Dann HM, Morin DE, Oliveira R, Rodriguez -Zas SL, Drackley JK, Lewin HA, 2007.** Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows. *Physiol Genomics.* 32:105-116.

- Lopes-Gatius F, Santolaria P, Yaniz J, Fenech M, Lopes-Bejar M**, 2002. Risk factors for postpartum ovarian cysts and their spontaneous recovery or persistence in lactating dairy cows. *Theriogenology*. 58:1623-1632.
- Lucy MC**, 2000. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *Journal of Dairy Science*. 83: 1635-1647.
- Lucy MC**, 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end?. *J Dairy Science*. 84:1277-1293.
- Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De La Sota RL, Thatcher WW**, 1992. Factors affecting ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Science*. 70: 3615.3626.
- Lucy MC, Staples CR, Michel FM, Thatcher WW**, 1991. Effects of feeding calcium soaps to early postpartum dairy cows on plasma prostaglandin-F2a, luteinizing hormone, and follicular growth. *J. Dairy Sci*. 74:483–489.
- Lucy MC, Thatcher WW, Staples CR**, 1992. Postpartum function: nutritional and physiological interactions. Pages 135–145 *in* Large Dairy Herd Management.
- Madsen SA, Weber PS, Burton JL**, 2002. Altered expression of cellular genes in neutrophils of periparturient of dairy cows . *Vet. Immunol Immunopathol*. 86: 159-175.
- Marti O, Marti J, Armario M**, 1994. Effect of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol Behav*. 40:29-32.
- Mc Donald KA, McNaughton LR, Verkerk GA, Penna JW, Burton LJ, Berry DP, Gore PJ, Lancaster JA, Holmes CW**, 2007. A comparison of three strains of Holstein-Friesian cows grazed on pasture: growth, development, and puberty. *J Dairy Sci*. 90: 3993-4003.
- Mc Neilly AS, Picton HM, Campbell BK, Baird DT**, 1991. Gonadotrophic control of follicle growth in the ewe. *J Reprod Fertil*. 92: 177-186.
- McCarthy SD, Waters SM, Kenny DA, Diskin MG, Fitzpatrick R, Patton J, Whates DC, Morris DG**, 2010. Negative energy balance and hepatic gene expression patterns in high-yielding dairy cows during the early postpartum period: a global approach. *Physiol Genomics*. 42A:188-199.
- McDowell CM, Anderson LH, Kinder JE, Day ML**, 1998. Duration of treatment with progesterone and regression of of period of anovulation in pasture-fed dairy cows after calving. *Res Vet Sci*. 76: 850-855.
- McRae AC**, 1984. The blood-uterine lumen barrier and its possible significance in early embryo development. *Oxford Rev. Reprod. Biol*. 6:129–173.

- Melendez P, Risco CA**, 2005. Management of transition cows to optimize reproductive efficiency in dairy herds. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*. 21: 485–501.
- Melvin EJ, Lindsey BR, Quintal-Franco J, Zanella E, Fike KE, Van Tassel, CP, Kinder JE**, 1999. Circulating concentrations of estradiol, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone, during waves of ovarian follicular development in prepubertal cattle. *Biol Reprod*. 60: 405-412.
- Michajlovskij N, Lichardus R, Kvetnansky JP**, 1988. Effect of acute and repeated immobilization stress on food and water intake, urine output and vasopressin changes in rats. *Endocrinol Exp*. 22: 143-157.
- Miyoshi S, Pate JL, Palmquist DL**, 2001. Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 68:29-43.
- Mlynarczuk J, Wrobel M, Kotwica J**, 2009. The Adverse Effect of Phytoestrogens on the Synthesis and Secretion of Ovarian Oxytocin in Cattle. *Reprod Domestic Anim*.
- Moenter SM, Caraty A, Karsch FJ**, 1990. The estradiol induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology*. 127:1375-1384.
- Monteiro F, Abraham ME, Sahakari SD, Mascarenhas JF**, 1989. Effect of immobilization stress on food intake, body weight and weights of various organs in rats. *Ind J Physiol Pharmac*. 33: 186-190.
- Mulligan FJ, Doherty ML**, 2006. Production diseases of the transition cow. *Veterinary Journal* 176:3-9.
- Mulligan FJ, Doherty ML**, 2008. Production diseases of the transition cow. *The Veterinary Journal*. 176: 3–9.
- Nanda AS, Ward WR, Dobson H**, 1989. Treatment of cystic ovarian disease in cattle. *Vet Bull*. 59: 537-556.
- Nappi RE, Rivest S**, 1997. Effects of immune and metabolic challenges on the luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system in cycling female rats: an evaluation at the transcriptional level. *Endocrinology* 138: 1374-1384.
- Narayana K, Dobson H**, 1979. Alpha-adrenergic control of gonadotrophin secretion in the ewe. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2: 47-57.
- Nebel RL., McGilliard ML**, 1993. Interactions of high milk yield and reproductive performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 76:3257-3268.

Nicklin LT, Robinson RS, Marsters P, Campbell BK, Mann GE, Hunter MG, 2007. Leptin in the bovine corpus luteum: receptor expression and effects on progesterone production. *Mol Reprod Dev.* 74: 724-729.

Nishimoto H, Matsutami R, Yamamoto S, Takahashi T, Hayashy KG, Miyamoto A, Hamano S, Tetsuka M, 2006. Gene expression of glucose transporter (GLUT) 1,3 and 4 in bovine follicle and corpus luteum. *J Endocrinol.* 188: 111-119.

Noble KM, Tebble JE, Harvey D, Dobson H, 2000. Ultrasonography and hormone profiles of persistent ovarian follicles (cysts) induced with low doses of progesterone in cattle. *J Reprod Fertil.* 120: 360-361.

Opsomer G, Leavend H, Korin M, de Kruif A, 1999. Insulin resistance: the link between metabolic disorders and cystic ovarian disease in high yielding dairy cows? *Anim Reprod Sci.* 56:211-222.

Opsomer G, YT Gröhn J, Hertl M, Coryn , Deluyker H, A. de Kruif, 2000. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in dairy cows in Belgium: A field study. *Theriogenology.* 53: 841-857.

Patton J, Kenny D, McNamara S, Mee J, O'Mara F, Diskin M, Murphy J, 2007. Relationship among milk production, energy balance, plasma analytes, and reproduction in Holstein-Friesian cows. *J Dairy Sci.* 90: 649-658.

Patton J, Kenny DA, McNamara S, Mee JF, O'Mara FP, Diskin MG, Murphy JJ, 2007. Relationship among milk production, energy balance, plasma analytes, and reproduction in Holstein Friesian cows. *J Dairy Sci.* 90: 649-658.

Pell JM, Saunders JC, Gilmour RS, 1993. Differential regulation of transcription initiation from insulin-like growth factor-I (IGF-I) leader exons and of tissue IGF-I expression in response to changed growth hormone and nutritional status in sheep. *Endocrinology.* 132: 1797–1807.

Peter AT, Bosu WTK, DeDecker RJ, 1989. Suppression of preovulatory luteinizing hormone surges in heifers after intrauterine infusions of Escherichia coli endotoxin. *Am J Vet Res.* 50: 368-373.

Peters KE, Bergfeld EG, Cupp AS, Kojima FN, Mariscal V, Sanchez T, Wehrman ME, Grotjan Hamernik DL, Kittock RJ, Kinder JE, 1994. Luteinizing hormone has a role in development of fully functional in corpora lutea (CL) but is not required to mantein CL function in heifers. *Biol Reprod.* 51: 1248-1254.

- Photgat JB, Smith RF, Dobson H**, 1997. Effect of transport on pituitary responsiveness to exogenous pulsatile GnRH and oestradiol-induced LH release in intact ewes. *J Reprod Fertil.* 116: 9-18.
- Poretsky L, Kalin MF**, 1987. The gonadotropic function of insulin. *Endocrine Reviews.* 8: 132-141.
- Preisler MT, Weber PS, Tempelman RJ, Erskine RJ, Hunt H, Burton JL**, 2000. Glucocorticoid receptor down-regulation in neutrophils of periparturient cows. *Am J Vet Res.* 61(1):14-9 abstr.
- Prentice AM, Jebb SA**, 2003. Fast foods, energy density, and obesity: a possible mechanistic link. *Obes Rev.* 4: 187-194.
- Pushkapumara PG, Robinson RS, Demmers KJ, Mann GE, Sinclair KD, Webb R, Whates DC**, 2002. Expression of the insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine oviduct at oestrous and during early pregnancy. *Reproduction.* 123: 859-868.
- Pushpakumara P, Gardner N, Reynolds C, Beever D, Whates D**, 2003. Relationship between transition period diet, metabolic parameters and fertility in lactating dairy cows. *Theriogenology.* 60: 1165-1185.
- Pyörälä S**, 2008. Mastitis in post-partum dairy cows. *Reprod Domest Anim.* 43(Suppl 2): 252-259.
- Quintal-Franco JA, Kojima FN, Meilvin EJ, Lindsey BR, Zanella E, Fike KE, Weherman ME, Clopton DT, Kinder JE**, 1999. Corpus Luteum Development and Function in Cattle with Episodic Release of Luteinizing Hormone Pulses Inhibited in the Follicular and Early Luteal Phases of the Estrous Cycle. *J Reprod Fertil.* 61: 921-926.
- Rhoads ML, Meyer JP, Kolath SJ, Lamberson WR, Lucy MC**, 2008a. Growth hormone receptor, insulin-like growth factor (IGF-1), and IGF-binding protein-2 expression in the reproductive tissues of early post-partum dairy cows. *J Dairy Sci.* 91:1802-1813.
- Rhoads ML, Meyer JP, Lamberson WR, Lucy MC**, 2008b. Uterine and hepatic gene expression in relation to days postpartum, estrus, and pregnancy in postpartum dairy cows. *J Dairy Sci.* 91:140-150.
- Rhodes FM, Fitzpatrick LA, Entwistle KW, Kinder JE**, 1995. Hormone concentrations in the caudal vena cava during the first ovarian follicular phase of the estrous cycle in heifers. *J Reprod Fertil.* 104: 33-39.
- Ribadu AJ, Nakada K, Tanaka Y, Moriyoshi M, Zhang WC, Nakao T**, 1999. Lack of LH response to exogenous estradiol in heifers with ACTH-induced ovarian follicular cysts. *J Vet Med.* 61: 979-981.

- Ribadu AY, Dobson H, Ward WR**, 1994. Ultrasound and progesterone monitoring of ovarian follicular cysts in cows treated with GnRH. *Br Vet J.* 150: 489-497.
- Ribadu AY, Dobson H, Ward WR**, 1994. Ultrasound and progesterone monitoring of ovarian follicular cysts in cows treated with GnRH. *Br Vet J.* 150: 489-497.
- Ribadu AY, Nakada K, Moryoshi M, Zhang WC, Tanaka Y, Nakao T**, 2000. The role of LH pulse frequency in ACTH-induced ovarian follicular cysts in heifers. *Anim Reprod Sci.* 64: 21-31.
- Robinson JE, Kendrick KM, Lambart CE**, 1991. Changes in the release of gamma-aminobutyric acid and catecholamines in the preoptic septal area prior to and during the preovulatory surge of LH in the ewe. *Journal of Neuroendocrinology.* 3: 393-399.
- Robinson JE, Radford HM, Karsch**, 1985. Seasonal changes in pulsatile luteinizing hormone (LH) secretion in the ewe: relationship of frequency of LH pulse to day length and response to estradiol negative feedback. *Biol Reprod.* 33: 324-334.
- Robinson RS, Mann GE, Gadd TS, Lamming GE, Wathes DC**, 2000. The expression of the IGF system in the bovine uterus throughout the oestrous cycle and early pregnancy. *J Endocrinol.* 165: 231-243.
- Roche JF**, 2006. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Anim Reprod Sci* 96:282-296.
- Roche JR, Bell AW, Overton TR and Loor JJ**, 2013. Nutritional management of the transition cow in the 21st century a paradigm shift in thinking. *Animal Production Science.* 53: 1000-1023.
- Roche JR, Friggens NC, Kay JK, Fisher MW, Stafford KJ, Berry DP**, 2009. Review: body condition score, body weight and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science.* 92: 5769- 5901.
- Roffler R E, Thacker DL**, 1983. Influence of reducing dietary crude protein from 17 to 13.5% on early lactation. *J.Dairy Sci.* 66:51–58.
- Rowland NE and Antelman SM**, 1976. Stress-induced hyperphagia and obesity in rats: a possible model for understanding. *Science.* 191:310- 312.
- Royal MD, Darwash AO, Flint APF, Webb R, Wolliams JA, Lamming GE**, 2000. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Anim Sci.* 70: 487-501.

- RP, Lucy MC, Butler WR**, 2003. Insuline restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects of expression og IGF-1 and GH receptor 1A. *Journal of Endocrinology*. 176: 205-217.
- Sartori R, Haughian J, Rosa GJM, Shaver RD, Wiltbank MC**, 2000. Differences between lactating cows and nulliparous heifers in follicular dynamics, luteal growth, and serum steroid concentrations. *J Daury Sci*. 83: 212 abstr.
- Schillo KK**, 1992. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in puberty in the beef heifers. *J Anim Sci*. 70: 1271-1282.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG**, 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 404: 661–671.
- Short RE, Bellows RA, Staigmiller RB, Berardinelli JG, Custer EE**,1990. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *J Anim Sci*. 68: 799-816.
- Shrestha HK, Nakao T, Suzuki T, Higaki T, Akita M**, 2004b. Effects of abnormal ovarian cycles during pre-service period postpartum on subsequent reproductive performance of high-producing Holstein cows. *Theriogenology*. 61: 637-649.
- Simmons KR, Hansel W**, 1984. Nature of the luteotropic hormone in the bovine. *J Anim Sci*. 23:136-141.
- Smith KJ, Jennes L**, 2001. Neuronal signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. *Reproduction*. 122:1-10.
- Smith RF, Gore SW, Phogat PB, Dobson H**, 1997. The psychological stress of transport stimulates both CRF and AVP secretion into hypophysial portal blood. *J. Endocrinol*. 152: P172.
- Spencer TE, Ing NH, Ott TL, Mayes JS, Becker WC, Watson GH, Mirando MA, Bazer FW**, 1995. Intrauterine injection of ovine interferon- τ alters oestrogen receptor and oxytocin receptor expression in the endometrium of cyclic ewes. *J Mol Endocrinol*. 15;203-220.
- Spicer LJ**, 2001. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domest Anim Endocrinol*. 21: 251- 270.
- Spicer LJ, Chamberlain CS**,1998. Influence of cortisol on insulin and insulin like growth factor 1 (IGF-1) –induced steroid production and on IGF-1 receptors in cultured bovine granulosa cells and teca cells. *Endocrine*. 9: 153-161.
- Stabfeldt GH, Kindhal H, Edqvist**, 1978. Release of prostaglandin FF2 alpha during the bovine peripartal period. *Prostaglandins*.16(1): 111-119.

- Staples CR, Thatcher WW, Clark JH**, 1990. Relationships between ovarian activity and energy status during the early post-partum period of high producing dairy cows. *J Dairy Sci.* 73: 938-947.
- Staples CR., Garcia-Bojalil CM, Oldick BS, Thatcher WW, Risco CA**, 1993. Protein intake and reproductive performance of dairy cows: a review, a suggested mechanism, and blood and milk urea measurements. Pages 37–51.
- Stefanon B, Colitti M, Gabai G, Knight CH, White CJ**, 2002. Mammary apoptosis and lactation persistency in dairy animal. *J Dairy Res.* 69(1): 37-52.
- Stevenson MA, Lean IJ**, 1998. Descriptive epidemiological study on culling and deaths in eight dairy herds. *Australian Veterinary Journal.* 76: 482–488.
- Stoebel DP, Moberg GP**, 1982. Effect of adenocorticotropin and cortisol on luteinizing hormone surge and estrous behaviour of cows. *J Dairy Sc.* 65: 1016-1024.
- Takeda E, Terao J, Nakaya Y, Miyamoto K, Baba Y, Chuman H et al**, 2004. Stress control and human nutrition. *J Med Invest.* 51:139-145.
- Taylor C and R. Rajamahendran**, 1991. Follicular dynamics, corpus luteum growth and regression in lactating dairy cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 71:61–68.
- Taylor VJ, Cheng Z, Pushpakumara PGA, Beaver DE, Whates DC**, 2004a. First lactation ovarian function in dairy heifers in relation to prepubertal metabolic profiles. *J Endocrinol.* 180:63-75.
- Taylor VJ, Cheng Z, Pushpakumara PGA, Beever DE, Whates DC**, 2004b. Fertility and yield in lactating dairy cows : relationship to plasma IGF-1 in the peripartum period. *Vet Rec.* 155: 583-588.
- Thatcher WW, Bilby TR, Bartolome JA, Silvestre F, Staples CR, Santos JEP**, 2006. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology.* 65:30-44.
- Thorn SR, Meyer MJ, Van Amburgh ME, Boisclair YR**, 2007. Effect of oestrogen on leptin and expression of leptin receptor transcripts in prepubertal dairy heifers. *J Dairy Sci.* 90: 3742-3750.
- Tilbrook AJ, Turner AI, Clarke IJ**, 2000. Effects of stress on reproduction in non –rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Rev Reprod.* 5: 105-113.
- Torres SJ, Nowson CA**, 2007. Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition.* 23: 887-894.

- Valles A, Marti O, Garcia A, Armario A**, 2000. Single exposure to stressors causes long-lasting, stress-dependent reduction of food intake in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279: R1138-1144.
- van der Drift SG, Houweling M, Schonewille JT, Tielens AG and Jorritsma R**, 2012. Protein and fat mobilization and associations with serum β -hydroxybutyrate concentrations in dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 95:4911-4920.
- van Houten M, Posner BI, Kopriwa BM e Brawer JR**, 1979. Insulin binding sites in the rat brain: in vivo localization to the circumventricular organs by quantitative radioautography. *Endocrinology.* 105: 666–673.
- van Knegsel ATM, van den Brand H, Graat EAM, Dijkstra J, Jorristma R, Decuypere E, Tamminga S, Kemp B**, 2007. Dietary energy source in dairy cows in early lactation: Metabolites and metabolic hormones. *J Dairy Sci.* 90:1477-1485.
- Van Saun RJ**, 1997. Prepartum nutrition: the key to diagnosis and management of periparturient disease. In: *The Bovine Proceedings.* 30: 33-42.
- Vanholder T, Leroy J, Dewulf J, Duchateau L, Coryn M, A. de Kruif, Opsomer G**, 2005. Hormonal and metabolic profiles of high-yielding dairy cows prior to ovarian cyst formation or first ovulation post partum. *Reprod Domestic Anim.* 40:460-467.
- Vasquez LA, Whitmore HL, Brodie BO, Kesler DJ, Brown MD**, 1984. **Comparison of GnRH treatment and manual rupture of ovarian cysts in dairy cattle. 10 International Congress on Animal Reproduction and A.I., Urbana- Champaign. III:476-479.**
- Velazquez MA, Spicer LJ, Whates DC**, 2008. The role of endocrine insuline-like growth factor-1 (IGF-1) in female bovine re production. *Domest Anim Endocrinol.* 35: 325-342.
- Vernon RG, Pond CM**, 1997. Adaptations of maternal adipose tissue to lactation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.* 2: 231–241.
- Wallach MB, Dawber M, McMaho M, Rogers C**, 1977. A new anorexigen assy: stress-induced hyperphagia in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 6: 529- 531.
- Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO**, 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 102: 122-126.
- Wathes DC, Cheng Z, Chowdhury W, Fenwick MA, Fitzpatrick R, Morris DG, Patton J, Murphy JJ**, 2009. Negative energy balance alters global gene expression and immune resposes in the uterus of postpartum dairy cows. *Physiol Genomics.* 39: 1-13.
- Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG**, 2004. Control of follicular growth : local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci.* 82 (E-suppl): E63-E74.

- Welberg LAM, Seckl JR**, 2001. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J Neuroendocrinol.* 13:113-128.
- Whates DC, Bourne N, Cheng Z, Mann GE, Taylor VJ, Coffey MP**, 2007a. Multiple correlation analyses of metabolic and endocrine profiles with fertility in primiparous and multiparous cows. *J Dairy Sci.* 90: 1310-1325.
- Whates DC, Cheng Z, Bourne N, Taylor VJ, Coffey MP, Brotherstone S**, 2007b. Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. *Domestic Anim Endocrinol*, 33: 203-225.
- Whates DC, Fenwick M, Cheng Z, Bourne N, Llewellyn S, Morris DG, Kenny D, Murphy J, Fitzpatrick R**, 2007b. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology.* 68 (Suppl 1): S232- S234.
- Whates DC, Fenwick MA, Llewellyn S, Cheng Z, Fitzpatrick R, McCarthy SD, Morris DG, Patton J, Murphy JJ**, 2008b. Influence of energy balance on gene expression in the liver and reproductive tract of lactating cows and consequent effects on fertility. In: Szenci O, Bajcsy AC, *Factors Affecting Reproductive Performance in the Cow.* Hungarian Association for Buiatrics, Budapest, Hungary. Pp. 158-171.
- Williams CY, Harris TG, Battaglia DF, Vigiè C, Karsch FJ**, 2001. Endotoxin Inhibits Pituitary Responsiveness to Gonadotrophin- Releasing Hormone. *Endocrinology.* 142: 1915-1922.
- Wiltbank MC, Gömen A, Sartori R**, 2002, "PHYSIOLOGICAL CLASSIFICATION OF ANOVULATORY CONDITIONS IN CATTLE", *Theriogenology.* 57: 21-52.
- Yoshioka K, Iwamura S, Kamomae H**, 1998. Changes of ovarian structures, plasma LH, FSH, progesterone and estradiol-17 β in a cow with ovarian cysts showing spontaneous recovery and relapse, *J Vet Med Sci.* 60: 257-260.
- Zebeli Q, Metzler-Zebeli BU**, 2012. Interplay between rumen digestive disorders and diet-induced inflammation. *Research in Veterinary Science.* 93: 1909-1920.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM**, 1994. Positional cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue. *Nature.* 372: 425-432.
- Zhao FQ, Dixon WT, Kennelly JJ**, 1996. Localization and gene expression of glucose transporters in bovine mammary gland. *Comp Biochem Physiol.* 115: 127-134.
- Zieba DA, Amstalden M, Williams GL**, 2005. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism. A comparative review. *Domest Anim Endocrinol.* 29: 166-185.

Zulu VC, Nakao T, Sawamukai Y, 2002a. Insulin-like growth factor-I as a possible hormonal mediator of nutritional regulation of reproduction in cattle. J Vet Med Sci. 64: 657-665.

Zulu VC, Sawamukai Y, Nakada K, Kida K, Moriyoshi M, 2002b. Relationship among insulin-like growth factor –I, blood metabolites and postpartum ovarian function in dairy cows. J Vet Med Sci. 64: 879-885.

Webgrafia

www.mondolatte.it/index.php/il-babcock-institute/72-lalimentazione-della-bovina-in-transizione

www.zootecnica.wikispaces.com/cicli+estrali

www.thepaleomom.com/2014/08/chronic-stress-leads-hormone-imbalance.html

www.ruminantia.it/cisti-follicolari-nella-bovina-da-latte

www.ruminantia.it/le-mastiti-alterano-lefficienza-riproduttiva-e-riducono-il-tasso-di-concepimento-nella-bovina-da-latte/

Ringraziamenti

I ringraziamenti vanno innanzitutto al mio relatore Gianfranco Gabai che con pazienza mi ha seguito e mi ha guidato durante la stesura di questo lavoro sopportando le mie ansie e le mie indecisioni.

Un sentito ringraziamento è doveroso nei confronti della mia Mamma che mi è stata vicino soprattutto nell'ultimo periodo aiutandomi per quanto possibile e dandomi la carica ogni giorno.

Ringrazio molto anche il Dottor Marcello Lora con il quale ho iniziato a fare esperienza nel campo della buiatria e che mi ha fornito preziose informazioni per la stesura di questa tesi.

Un grazie a Stefano, amico da ormai 13 anni che, con le sue capacità ingegneristiche, mi ha aiutato con la grafica e nel perfezionamento estetico del mio lavoro.

Ringrazio la mia amica Chiara che in questi cinque anni ha sopportato i miei innumerevoli problemi di cuore e mi ha seguito come una esperta psicologa e amica fidata.

Ringrazio inoltre la mia amica Stefania che ha condiviso con me tutti gli esami e un intenso anno di Erasmus vivendo moltissime esperienze e supportandomi e aiutandomi in ogni momento.

Ringrazio mio papà, mio fratello Alberto e tutti gli altri amici che mi sono stati vicini lungo questi cinque anni permettendomi di seguire il mio sogno e di portarlo a termine.

Infine ringrazio una persona che conosco da poco tempo ma che ha avuto la pazienza di sopportare i miei isterismi dell'ultimo mese pre-laurea e che mi fa sentire così tanto bene che sicuramente saprà a chi mi riferisco.

