

Università degli Studi di Napoli Federico II



Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali

DOTTORATO DI RICERCA IN

PRODUZIONE E SANITÀ DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

INDIRIZZO: SCIENZE DELL'ALLEVAMENTO ANIMALE

XXVIII CICLO

*Influenza del metabolismo sulle caratteristiche produttive e
riproduttive della bufala Mediterranea Italiana*

Tutor:

Chiar. mo Prof.

Giuseppe Campanile

Coordinatore:

Chiar.ma Prof.ssa

Maria Luisa Cortesi

Candidato:

Dott. ssa Giovanna Bifulco

TRIENNIO 2013-2016

INDICE

INDICE	2
ABSTRACT	4
RIASSUNTO	7
INTRODUZIONE	10
CAPITOLO 1. LE VIE METABOLICHE NEI RUMINANTI	13
1.1. Metabolismo energetico	13
1.2. Gluconogenesi nei ruminanti	15
1.3. Metabolismo lipidico.....	20
1.4. Metabolismo proteico.....	25
CAPITOLO 2 IL RAZIONAMENTO NELLA SPECIE BUFALINA IN ITALIA	29
2.1. Cenni di alimentazione e razionamento	29
2.2. Ingestione di sostanza secca e comportamento alimentare	31
2.3. Fabbisogni energetici	34
2.4. Fabbisogni proteici	37
2.5. Utilizzo di carboidrati nel razionamento della bufala ..	39
2.6. Razionamento della bufala e lipomobilizzazione	41
CAPITOLO 3 INTERRELAZIONI TRA NUTRIZIONE E RIPRODUZIONE	44
3.1. Influenza dell'alimentazione sulle performance riproduttive	44
3.2. Il bilancio energetico negativo (BEN) di inizio lattazione	46
3.3. Il BEN di inizio lattazione nella specie bufalina	51
3.4. BEN di inizio lattazione e performance riproduttive nella specie bufalina	54
PARTE SPERIMENTALE	62
INTRODUZIONE	63
SCOPO DELLA TESI	65
MATERIALI & METODI	66
Disegno sperimentale.....	66
Esperimento 1	68
Esperimento 2	69
1. Aziende	69
2. Analisi degli alimenti	71
3. Analisi del latte e del sangue	73
4. Influenza dello stato metabolico sull'attività riproduttiva	74

5. Analisi statistica	75
RISULTATI & DISCUSSIONE	76
Esperimento 1	76
Esperimento 2	81
1. Relazioni tra stato metabolico e parametri del latte ...	81
2. Influenza del clima sullo stato metabolico	93
3. Influenza dello stato metabolico sulla resa alla caseificazione	96
4. Influenza dello stato metabolico sull'attività riproduttiva	99
CONCLUSIONI	103
BIBLIOGRAFIA	104

ABSTRACT

Italy can be considered a leading country for both genetic improvement and breeding techniques in buffalo species. However, few information are actually available on physiology of this species and particularly those for high producing dairy buffaloes maintained in intensive and semi-intensive breeding. Therefore, it is essential to carry out new studies aimed to increase metabolism knowledge in this species.

The purposes of this doctoral thesis were to evaluate:

- 1) the results of the application of the out of season breeding mating technique and the metabolic status of buffaloes undergone milk recording;
- 2) the metabolic changes that occur throughout the lactation and in different climate conditions;
- 3) the possibility of using some parameters assessed in the milk as risk indexes for metabolic diseases;
- 4) the influence of milk production and some metabolites on pregnancy.

Two trials were carried out in the experimental design.

The main aim of Experiment 1 was to verify milk production and Beta-Hydroxybutyrate (BHBA) levels in primiparous and pluriparous buffaloes undergone milk recording.

Experiment 2 was carried out simultaneously in 8 commercial buffalo farms located in the area of buffalo mozzarella cheese DOP production. The feedstuffs utilized for animal feeding were collected in each farm and analyzed for chemical composition. Milk yield was recorded monthly and two milk samples (during morning and afternoon milking) were collected to evaluate: fat, protein, lactose, urea, true protein, casein, CF, H-index, cryoscopic index, acetone, BHBA and fat characteristics (saturated and unsaturated fats). Furthermore, 40 buffaloes with different days in milk (5-50 days; 50-120 days; 120-200 days and 200-270 days) were selected in each farms to analyze metabolic profile and its relationship with metabolites in milk. Therefore, these buffaloes underwent blood sampling two months apart when milk recordings were carried out to analyze the metabolic profile (see below).

Throughout the experimental, period 3 milk tank sampling were performed in 6 farms to perform chemical analysis and cheese yield.

Finally, the influence of metabolic status on reproductive performance was assessed in each farm, mainly looking at oocyte and embryo development. Therefore, a representative number of buffaloes in each farm underwent synchronization of ovulation and artificial insemination.

The results of Experiment 1 demonstrated that the out of season breeding mating technique is correctly applied in primiparous buffaloes, while a higher seasonal pattern can be observed in pluriparous counterparts. Furthermore, BHBA levels were higher at both the beginning and the end of lactation, compared to the mid lactation period. The analysis of urea levels in milk support the evidence that protein requirements were not satisfied or exceeded the requirements in about 50% of cases.

In Experiment 2, it was observed that the number of days in milk and the season influence energy metabolism through a lower energy intake, higher metabolic strain (for both the end of lactation and cold periods) and higher milk yield. These buffaloes underwent an excess of fat mobilization, that was the main reason for milk qualitative characteristics worsening and lower yield in mozzarella cheese. Furthermore, the lower dry matter intake and the lipomobilization, recorded at the beginning of lactation caused a change in fat characteristics, as demonstrated by the evidence that buffaloes at lower than 50 days in milk showed a significantly ($P < 0.01$) increase of saturated fatty acids concentration (10.52 ± 0.09 vs. 4.78 ± 0.10 , 5.41 ± 0.10 and 5.55 ± 0.10 , in 5-50 days; 50-120 days; 120-200 days and 200-270 days, respectively) together with a decrease of monounsaturated counterparts (1.76 ± 0.04 vs. 1.88 ± 0.04 , 2.40 ± 0.04 , and 2.74 ± 0.04 in 5-50 days; 50-120 days; 120-200 days and 200-270 days, respectively). This was also accompanied by low reproductive efficiency. Furthermore, milk and blood parameters were compared during cold and hot season: the low temperatures and the high thermal excursion recorded during the transitional period (middle of December – end of February) caused lower milk yield (10.96 ± 0.20 vs. 10.16 ± 0.32 ; $P < 0.05$, in warm and cold period, respectively), lactose (4.94 ± 0.01 vs. 4.88 ± 0.01 ; $P < 0.01$) and fat / protein ratio (1.85 ± 0.02 vs. 1.75 ± 0.02 ; $P < 0.01$). The worse climatic conditions recorded were responsible for higher energy requirements,

which caused higher fat mobilization demonstrated by milk acetone levels (0.28 ± 0.01 vs. 0.50 ± 0.01 ; $P<0.01$), blood NEFA (0.13 ± 0.01 vs. 0.24 ± 0.01 ; $P<0.01$) and BHBA levels (0.44 ± 0.01 vs. 0.47 ± 0.01 ; $P<0.05$). The statistical analysis of the data also demonstrated a negative correlation between BHBA levels ($r = -0.57$; $P<0.01$) and cheese yield. Multiple logistic regression showed that the increase of BHBA levels lowered pregnancy probability (odds ratio = 0.406; $P<0.05$). In particular, pregnancy probability was lower than 50% in buffaloes with BHBA values higher than 0.25 mmol/L.

In conclusion, the metabolic condition due to higher milk yield, climatic conditions and milk fat synthesis caused an increase of metabolites in both blood and milk. Fat mobilization worsened also cheese yield, animal welfare and reproductive efficiency. The possibility of using some metabolites assayed in the milk as risk indicators for some metabolic pathologies may represent a new border to increase animal welfare and improve buffalo production and reproduction.

RIASSUNTO

L'Italia è da considerarsi un paese leader sia in termini di miglioramento genetico che di tecniche di allevamento della specie bufalina. Tuttavia, al momento sono scarse le informazioni riguardo alla fisiologia della bufala, e ancora minori sono quelle disponibili nel caso di soggetti altamente produttivi e in allevamento di tipo intensivo e semi-intensivo. Risulta pertanto fondamentale effettuare nuovi studi che possano incrementare la conoscenza sul metabolismo della specie.

Lo scopo della presente tesi di dottorato è stato quello di valutare:

- 1) il grado di destagionalizzazione e lo stato metabolico della popolazione bufalina sottoposta a controllo funzionale;
- 2) le modificazioni metaboliche che si verificano nel corso della lattazione e durante gli estremi stagionali;
- 3) l'applicabilità dei parametri dosati nel latte quale indice di rischio di dismetabolie;
- 4) gli effetti della produzione e di alcuni metaboliti sulla gravidanza.

Nell'ambito del disegno sperimentale sono stati effettuati due esperimenti.

L'Esperimento 1 ha avuto come scopo principale quello di verificare la produzione di latte nonché i livelli di betaidrossibutirrato (BHBA) dell'intera popolazione bufalina sottoposta a controlli funzionali, sia nelle bufale primipare che nelle pluripare.

L'Esperimento 2 è stato condotto contemporaneamente in 8 aziende bufaline commerciali localizzate nell'areale della mozzarella di bufala Campana DOP. Nell'ambito di ciascuna azienda, sono stati effettuati dei prelievi di materie prime utilizzate nella razione e si è proceduto all'analisi chimica di tutti gli alimenti. In tutti i soggetti in lattazione è stata registrata la produzione di latte a cadenza mensile e, nello stesso momento, è stato prelevato un doppio campione di latte (da ciascuna delle due mungiture giornaliere) per la determinazione dei seguenti parametri: grasso, proteina, lattosio, urea, proteina vera, caseina, CF, H index, indice crioscopico, acetone, BHBA, e la composizione in acidi grassi insaturi e saturi. Inoltre, 40 bufale a diversa distanza dal parto (5-50 gg; 50-120 gg; 120-200 gg e 200-270 gg) sono state selezionate in ciascuna azienda al fine di verificare lo stato metabolico e le relazioni esistenti tra i

parametri ematici e la loro corrispondenza nel latte. Questi soggetti sono stati, pertanto, sottoposti a prelievi di sangue a cadenza bimestrale ed in corrispondenza con i controlli funzionali, per analizzare il profilo metabolico (vd. in seguito).

Durante l'intero periodo di osservazione sono stati effettuati in totale 3 prelievi di latte di massa provenienti da 6 aziende, che sono stati sottoposti sia ad analisi chimica che a prova di resa alla caseificazione.

Infine, in ciascuna delle aziende coinvolte, è stato valutato l'effetto dello stato metabolico sulla sfera riproduttiva, in particolare sulla competenza allo sviluppo degli oociti e sullo sviluppo embrionale. Pertanto, un numero rappresentativo di soggetti per azienda è stato sottoposto a sincronizzazione dell'ovulazione e inseminazione strumentale.

Dall'elaborazione dei dati relativi all'Esperimento 1 è emerso una buona destagionalizzazione delle primipare, mentre più stagionali risultano le pluripare. Inoltre i livelli di BHBA sono risultati elevati ad inizio e fine lattazione. L'analisi delle concentrazioni di urea hanno fatto registrare che circa nel 50% dei casi il soddisfacimento dei fabbisogni proteici non è coperto o è in eccesso.

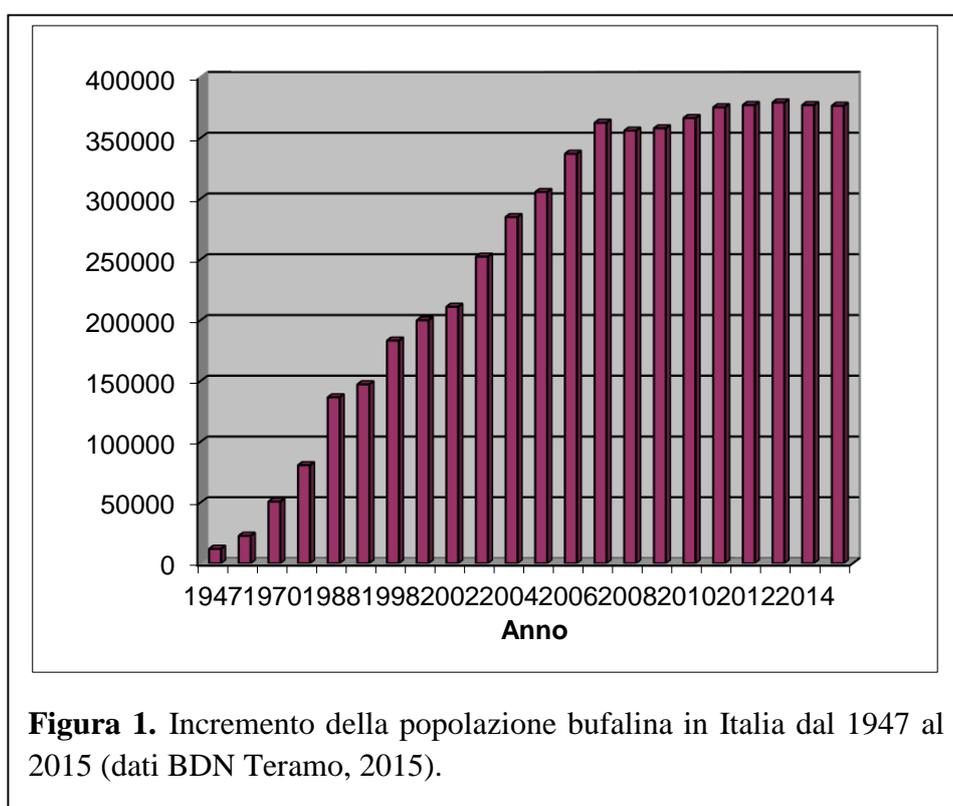
Nell'Esperimento 2 è emerso che la distanza dal parto e la stagione condizionano il metabolismo energetico degli animali attraverso una minore ingestione di energia, un maggiore sforzo metabolico (fine lattazione e periodi freddi) e una maggiore produzione. L'eccessiva lipomobilizzazione in cui vanno incontro questi soggetti rappresenta, inoltre, la principale causa di peggioramento delle caratteristiche qualitative del latte e della resa in mozzarelle, nonché dell'efficienza riproduttiva della mandria. La diminuzione dell'ingestione di sostanza secca e la lipomobilizzazione registrata all'inizio della lattazione è anche responsabile di un cambiamento delle caratteristiche del grasso, così come dimostrato dal significativo ($P < 0,01$) aumento della concentrazione di acidi grassi saturi ($10,52 \pm 0,09$ vs. $4,78 \pm 0,10$, $5,41 \pm 0,10$, $5,55 \pm 0,10$ in 5-50 gg; 50-120 gg; 120-200 gg and 200-270 gg, rispettivamente) insieme alla diminuzione dei monoinsaturi ($1,76 \pm 0,04$ vs. $1,88 \pm 0,04$, $2,40 \pm 0,04$, and $2,74 \pm 0,04$ in 5-50 gg; 50-120 gg; 120-200 gg and 200-270 gg, rispettivamente). Inoltre sono stati analizzati i parametri del latte e del sangue nei due estremi stagionali ed è emerso che le minori temperature medie e l'elevata escursione termica che caratterizza il

periodo di transizione (metà dicembre – fine febbraio) hanno fatto registrare una minore produzione di latte ($10,96 \pm 0,20$ vs. $10,16 \pm 0,32$; $P < 0,05$, nei periodi caldi e freddi, rispettivamente), di lattosio ($4,94 \pm 0,01$ vs. $4,88 \pm 0,01$; $P < 0,01$, nei periodi caldi e freddi, rispettivamente) e del rapporto grasso/proteine ($1,85 \pm 0,02$ vs. $1,75 \pm 0,02$; $P < 0,01$, nei periodi caldi e freddi, rispettivamente). Ciò è da attribuire alla maggiore richiesta energetica in conseguenza delle peggiori condizioni climatiche. Infatti si nota una più alta lipomobilizzazione testimoniata dall'aumento dei livelli di acetone dosati nel latte ($0,28 \pm 0,01$ vs. $0,50 \pm 0,01$; $P < 0,01$, nei periodi caldi e freddi, rispettivamente) e dall'incremento dei NEFA ($0,13 \pm 0,01$ vs. $0,24 \pm 0,01$; $P < 0,01$, nei periodi caldi e freddi, rispettivamente) e del BHBA ($0,44 \pm 0,01$ vs. $0,47 \pm 0,01$; $P < 0,05$, nei periodi caldi e freddi, rispettivamente) nel sangue. Un altro aspetto che si è ritenuto interessante investigare è stato quello di verificare l'effetto dei livelli di BHBA e di urea del latte sulla resa alla caseificazione nei diversi mesi del periodo sperimentale. L'analisi statistica dei dati ha evidenziato una correlazione negativa ($r = -0,57$; $P < 0,01$) tra i livelli di BHBA del latte e la resa alla caseificazione. L'analisi della regressione logistica mostra che all'aumentare dei livelli di BHB diminuisce la probabilità di gravidanza (odds ratio = $0,406$; $P < 0,05$). In particolare la probabilità stimata di essere gravidi, per i soggetti con valori superiori ai $0,25$ mmol/L di BHBA, è inferiore al 50%.

In conclusione, lo sforzo metabolico legato alla maggiore produzione, alle condizioni climatiche e alla sintesi di grasso del latte fanno registrare un aumento dei cataboliti energetici nel sangue e nel latte. L'intensificarsi della lipomobilizzazione agisce negativamente sulla qualità e quantità del latte riducendo nel contempo la resa alla caseificazione ed agendo negativamente sullo stato di benessere degli animali. Ulteriore aggravio del bilancio energetico negativo è rappresentato dalla riduzione dell'efficienza riproduttiva che riduce la probabilità di ingravidamento. La possibilità di utilizzare alcuni metaboliti dosati nel latte quali indicatori di rischio di alcune patologie metaboliche potrebbe rappresentare una nuova frontiera per incrementare il benessere animale e migliorare le produzioni e la riproduzione nel bufalo

INTRODUZIONE

Negli ultimi 40 anni la popolazione bufalina mondiale è aumentata di oltre l'87%. Tale incremento si è registrato prevalentemente nei Paesi a clima tropicale, dove la vacca non è in grado di esprimere il suo potenziale produttivo (Zicarelli, 1992). Nelle aree a clima temperato o continentale la popolazione bufalina è diminuita notevolmente ad eccezione dell'Italia (Figura 1), dove dai 12.000 capi del dopoguerra si è passati ai circa 380.000 del 2015 (Dati Anagrafe Nazionale, IZS Teramo 2015).



L'allevamento del bufalo rappresenta una realtà economica rilevante per la zootecnia Italiana e, specialmente, per le regioni dedite tradizionalmente all'allevamento di questa specie. Nonostante le vicissitudini legate alle problematiche igienico-sanitarie di alcune province dell'area del DOP, il mercato della mozzarella di bufala Campana DOP ha fatto registrare in questi ultimi anni un incremento della richiesta che ha portato ad un aumento del prezzo della mozzarella e di conseguenza del latte. In

ambito europeo l'allevamento bufalino è una realtà economica Italiana, principalmente campana, in quanto in questa regione è allevato circa il 78% del patrimonio bufalino nazionale.

Dall'elaborazione dei dati forniti dal Consorzio di Tutela della Mozzarella di Bufala Campana si stima che nel 2014 la produzione di Mozzarella di bufala campana DOP dichiarata dai caseifici di Campania, Basso Lazio e Foggia al Consorzio Tutela, superi i 38 milioni di chilogrammi, registrando un incremento del 2% sul 2013, quando si era attestata intorno ai 37 milioni di chilogrammi. Tali numeri lasciano quindi intendere quanto questo settore rappresenti una realtà con un notevole impatto socioeconomico, in quanto si è sviluppato proprio in quelle regioni che detengono un alto tasso di disoccupazione. È stato stimato che l'intero indotto bufalino occuperebbe nella sola Campania oltre 15.000 addetti. Il continuo incremento dei costi di gestione dell'allevamento del bufalo, registrato in questi ultimi anni, non accompagnato dall'aumento del prezzo del latte e dalla valorizzazione della carne, potrebbe, in un prossimo futuro, favorire una crisi del settore. Risulta, pertanto, fondamentale operare una diluizione dei costi fissi attraverso piani di selezione che favoriscano la produttività individuale e migliorino il rapporto tra la domanda e l'offerta.

Gli standard produttivi raggiunti dall'allevamento bufalino in Italia sono stati notevoli, grazie all'intenso lavoro di selezione e di ricerca svolto nel corso degli anni. La media produttiva registrata per il 2014 su oltre 58.000 capi iscritti in 309 aziende è stata di oltre 2.229 kg di latte, con percentuali di grasso e proteine pari a 8,06% e 4,66%, rispettivamente (ANASB, 2015), sebbene siano stati registrati molti soggetti con punte superiori ai 5.000 kg per lattazione. Dal 1977 (anno dell'istituzione del Libro Genealogico) ad oggi la produzione media nazionale è aumentata soltanto di circa 700 kg/lattazione e la percentuale di grasso e proteine, che nel 1977 era pari a 6,4% e 4,3%, è migliorata di circa 2,0 e 0,3 punti percentuali, rispettivamente. Il miglioramento produttivo è da attribuire sia all'adozione di sistemi di allevamento più consoni alle esigenze fisiologiche e nutritive della specie, sia alla migliore conoscenza del potenziale produttivo di ogni singola bufala, perseguito con l'istituzione dei controlli funzionali. Grazie a questi ultimi è stato possibile istituire il Libro Genealogico della specie, unico al mondo, e formulare l'EBM (Equivalente Bufala

Matura) e gli indici genetici che hanno consentito una più oculata scelta dei torelli, da destinare sia alla monta naturale che ai centri di raccolta seme per l'inseminazione strumentale.

È ovvio che la selezione di soggetti sempre più produttivi, insieme alla modifica delle tecniche di allevamento, ormai quasi esclusivamente di tipo semi-intensivo e simili a quelle utilizzate nell'allevamento bovino da latte, ha comportato l'insorgenza di una serie di patologie, cosiddette "*tecnopatie*", fino ad oggi sconosciute in questa forma di allevamento. Patologie di ordine metabolico, quali chetosi, acidosi e steatosi, collasso puerperale, patologie podali, tutte finora riscontrate solo in allevamenti bovini ad alta produzione, hanno iniziato a fare la loro comparsa anche nell'allevamento bufalino, proprio in seguito agli elevati standard produttivi raggiunti da questa specie. L'esiguità delle conoscenze relative ai fabbisogni produttivi della specie bufalina nelle diverse fasi fisiologiche è causa a volte dell'adozione di schemi di razionamento non idonei che non permettono di evidenziare il pieno potenziale produttivo delle bufale e possono compromettere la qualità e la caseificabilità del latte, oltre al benessere degli animali in allevamento. Non va, infatti, dimenticato che è incrementata negli ultimi anni l'attenzione dei consumatori verso tecniche di allevamento che mirano al rispetto del benessere animale e dell'ambiente.

CAPITOLO 1 – LE VIE METABOLICHE

NEI RUMINANTI

1.1. Metabolismo energetico

Il glucosio svolge un ruolo cruciale nel metabolismo dei ruminanti, sia per i fabbisogni di mantenimento che per il soddisfacimento dei fabbisogni produttivi quali l'accrescimento e la lattazione. In particolare riveste importanza nella vacca da latte a causa dell'ingente quantitativo richiesto dalla mammella per la produzione del latte: il glucosio infatti è il precursore della sintesi del lattosio, che controlla il volume di latte prodotto, fungendo da agente osmotico (*Zhao e Keating, 2007*). In uno studio condotto da *Annison et al. (1974)* è emerso che il lattosio incide per il 69,4% sul glucosio assorbito dalla mammella. Il glucosio ha quindi un ruolo fondamentale nella lattazione, ma anche nel mantenimento degli altri tessuti che lo utilizzano, mediante ossidazione o per la produzione di trigliceridi a livello di tessuto adiposo.

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

Su una base quantitativa è il propionato il precursore principale per la sintesi del glucosio, arrivando a fornire fino al 76% del glucosio sintetizzato dal fegato (*Reynolds et al., 1994*). Quasi tutto il propionato assorbito dal rumine giunge per via portale al

fegato, senza mai entrare nel circolo sistemico; ciò fa sì che tutto il propionato venga utilizzato per la gluconeogenesi, entrando nel ciclo di Krebs come succinato e portando alla formazione di ossalacetato, il primo metabolita del processo gluconeogenico. La quantità di propionato dipende dalla quantità di alimento ingerito, per cui in caso di bilancio energetico negativo la sintesi di glucosio avviene in maggior misura a carico di lattato, glicerolo, amminoacidi e acidi grassi provenienti dai tessuti. La seconda fonte di glucosio, in ordine di importanza, è rappresentata dagli amminoacidi: quasi tutti possono concorrere alla sintesi di glucosio, ma è l'alanina a fornire il maggior contributo e ad essere assorbita in quantità maggiori a livello portale. Per quanto riguarda il lattato, che riveste un ruolo di minor importanza, la captazione a livello epatico dipende dalla disponibilità degli altri precursori (*Reynolds, 1995*): all'aumentare della concentrazione portale di propionato e alanina aumenta la loro captazione e diminuisce quella del lattato. Ciò permette un maggior approvvigionamento di lattato ai tessuti periferici, dove può essere usato come fonte di energia o per la sintesi di riserve adipose (*Benson et al., 2002*).

1.2. Gluconogenesi nei ruminanti

Per quanto riguarda l'assorbimento, il trasportatore del glucosio sodio-dipendente, SGLT-1, e diverse isoforme della famiglia delle molecole deputate al trasporto facilitato del glucosio, sono state identificate in diversi organi del tratto gastrointestinale dei ruminanti compreso il reticolo, il rumine, l' omaso, il duodeno, il digiuno, l'ileo, e il cieco (*Zhao et al., 1998; Aschenbach et al., 2000a*). La funzionalità di questi trasportatori è stata dimostrata nei prestomaci (*Aschenbach et al., 2000b*) e nell'intestino tenue (*Huntington & Reynolds, 1986*): quest'ultimo è il sito più importante per l'assorbimento del glucosio nella maggior parte delle diete (*Harmon & McLeod, 2001*). Tuttavia, solo alcuni alimenti ordinari (quali mais, sorgo o grano) forniscono amido digeribile al piccolo intestino in quantità importanti (*Larsen & Kristensen, 2009; Taylor & Allen, 2005*). In molti casi, l'assorbimento netto del glucosio, a livello dei visceri drenati dal circolo portale (PDV) è negativo, il che implica che i tessuti PDV metabolizzano maggiormente il glucosio fornito dalle arterie rispetto a quello assorbito dal lume. Inoltre, il metabolismo di primo passaggio negli enterociti potrebbe essere responsabile del mancato raggiungimento ematico del 30-40% del glucosio luminale (*Kreikemeier & Harmon, 1995; Larsen & Kristensen, 2009*).

Il tasso di ingresso totale del glucosio aumenta dopo il parto a 200-400 mmol / h, raggiungendo i 700 mmol / h (3 kg/die) al momento del picco di lattazione con un livello di produzione latte di 40 kg /die (*Larsen & Kristensen, 2009; Doepel et al., 2009*). L'ingresso del glucosio nelle vacche che producono 90 kg di latte al giorno è stato stimato essere 7,4 kg / giorno di cui 4,4 kg finiranno come lattosio del latte (*Young, 1977*). Questo elevato incremento del glucosio non può essere frutto di un aumento nell'assorbimento di glucosio attraverso i tessuti PDV (*Doepel et al., 2009*). Sebbene l'amido che passa dal rumine all'intestino possa raggiungere i 5 kg/die con estreme strategie alimentari (*Taylor & Allen, 2005*), le limitazioni all'idrolisi intestinale dell'amido e all'assorbimento del glucosio, così come il metabolismo splancnico, diminuiscono l'assorbimento dello zucchero a meno del 5% della fornitura netta del glucosio splancnico (*Reynolds et al., 2003, Doepel et al., 2009*). Questi dati

mostrano chiaramente che i ruminanti fanno grande affidamento sulla gluconeogenesi al fine di soddisfare le loro richieste glucosidiche.

L'organo centrale della gluconeogenesi è il fegato. Nonostante al momento non esistano stime relative al ruolo dei diversi organi nella gluconeogenesi nelle vacche da latte, le misurazioni effettuate nelle pecore suggeriscono che il fegato sia in grado di far fronte a circa l'80% della totale capacità gluconeogenetica dell'organismo (Bergman *et al.*, 1974). I substrati quantitativamente importanti per la gluconeogenesi epatica, in ordine di captazione, sono il propionato (60-74%), il L-lattato (16-26%), l'alanina (3-5%), il valerato, l'isobutirrato (5-6%), il glicerolo (0,5-3%), e altri aminoacidi (8-11%) (Larsen & Kristensen, 2009; Reynolds *et al.*, 2003). I valori percentuali forniti si basano sul relativo contributo dei differenti substrati glicogenici al rilascio epatico netto di glucosio. Il contributo dei precursori glicogenici endogeni quali glicerolo e lattato aumenta durante i deficit energetici e durante la mobilizzazione lipidica associata a tali carenze (Lomax & Baird, 1983). D'altra parte, le proporzioni di substrati esogeni utilizzati nella gluconeogenesi dipendono dai loro tassi di assorbimento nel tratto gastrointestinale. La fornitura netta di substrati glicogenici dal PDV è in gran parte modificata da metabolismo di primo passaggio all'interno di tali visceri. Questo riduce la fornitura epatica degli amminoacidi glicogenici, quali glutamina, asparagina, e prolina (Berthiaume *et al.*, 2001), del valerato e, in misura minore, anche del propionato (Kristensen & Harmon, 2004a; 2004b).

Una particolarità degna di nota dei ruminanti è che il lattato non è solo il principale substrato glucogenico endogeno, ma può anche essere prodotto in quantità significative dalla flora microbica ruminale, qualora gli animali vengano alimentati con un'elevata quantità di amido, anche se tale condizione è però spesso associata a dismetabolie (acidosi ruminale lattica). Al momento dell'assorbimento ruminale, il D-isomero dell'acido lattico viene metabolizzato molto più lentamente rispetto alla L-isomero. In ogni caso, la gluconeogenesi rappresenta una via per alleviare l'accumulo di concentrazioni deleterie di D-lattico nel plasma (Giesecke & Stangassinger, 1977; Harmon *et al.*, 1983).

Un'altra caratteristica tipica dei ruminanti è la capacità degli enzimi microbici ruminali di aumentare la fruibilità di certi substrati glicogenici che non risultano facilmente utilizzabili dai non ruminanti. Il più importante di questi è 1,2-propandiolo, che viene utilizzato come additivo per mangimi nell'alimentazione ruminanti (*Overton & Waldron, 2004; Kristensen & Raun, 2007*). Sebbene 1,2-propandiolo venga lentamente metabolizzato dal fegato (principalmente per L-lattato con alcol e aldeide deidrogenasi), la sua conversione intraruminale a propanolo e, in misura minore, anche a propanale fornisce substrati glicogenici più facilmente utilizzabili che rappresentano più della metà del potenziale glucogenico dell'1,2-propandiolo (*Kristensen & Raun, 2007*).

Il ruolo di primo piano del propionato nella gluconeogenesi dei ruminanti richiede una visione più complessa riguardo l'ingresso del precursore nel processo gluconeogenico e riguardo la sua regolazione. Il punto comune per l'ingresso della maggior parte dei substrati nella gluconeogenesi è l'ossalacetato mitocondriale (OAA). Infatti, il propionato è convertito mediante gli enzimi propionil-CoA carbossilasi mitocondriale (PCoAC), metilmalonil-CoA mutasi (MCM), e attraverso parte del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) in OAA, mentre il lattato e il principale aminoacido glucogenico, l'alanina, vengono inizialmente convertiti a piruvato nel citosol, prima di essere convertiti ad OAA, dall'enzima piruvato carbossilasi mitocondriale (PC). L'OAA può essere poi metabolizzato dalla fosfoenolpiruvato carbossichinasi (PEPCK) in fosfoenolpiruvato (PEP) e in seguito in glucosio o servire come accettore di acetil-CoA nel ciclo dei TCA. La presenza dell'attività della PEPCK nel citoplasma (PEPCK-C) e nei mitocondri (PEPCK-M) amplia ulteriormente le possibilità di disciplinare l'ingresso dei precursori nel processo gluconeogenico.

La stechiometria della gluconeogenesi impone che la formazione di fosfoenolpiruvato dal propionato, dal piruvato, e da alcuni aminoacidi richiede la sintesi indipendente NADH nel citosol per la successiva riduzione di 1,3-difosfoglicerato nella gluconeogenesi. Pertanto, si ritiene che la PEPCK-C sia impiegata per la gluconeogenesi dagli aminoacidi, mentre la PEPCK-M sia più adatta per la gluconeogenesi dal lattato (*Watford et al., 1981*). Se fosse così, l'ingresso del lattato nella gluconeogenesi potrebbe essere regolato attraverso la PC e dall'attività della

PEPCK-M, l'ingresso degli aminoacidi tramite PC e attraverso l'attività della PEPCK-C, e l'ingresso del propionato attraverso la PCoAC, la MCM e l'attività della PEPCK-C. L'enzima MCM dipendente dalla vitamina B12 è considerato un punto di controllo della gluconeogenesi. Si è dimostrato, in sezioni di fegato ovino, che la somministrazione suppletiva di vitamina B12 possa migliorare la gluconeogenesi dal propionato (*Peters & Elliot, 1983*), mentre l'apporto nel peripartum di vitamina B12 può avere effetti positivi sullo stato metabolico delle vacche da latte ad alta produzione (*Rollin et al., 2010*). D'altra parte, poco si sa circa la regolazione trascrizionale o traduzionale delle MCM e delle PcoAC epatiche bovine. I pochi studi esistenti su questo argomento, però, indicano che almeno la PCoAC sembra essere regolata insieme alla PEPCK. Murondoti et al. (2004) hanno trovato diminuzioni coordinate dell'attività della PCoAC e della PEPCK nelle vacche con steatosi epatica indotta, mentre Hammon et al. (dati non pubblicati) hanno messo in evidenza cambiamenti coordinati nell'espressione dell'mRNA dell' isoforma A della PCoAC e della PEPCK-C nelle vacche da latte in transizione. Questi risultati supportano l'idea che i cambiamenti nell'attività della PEPCK abbiano un alto valore predittivo per la produzione di glucosio dal propionato anche se le modifiche simultanee di PCoAC e MCM non sono ancora note (*Greenfield et al., 2000; Al-Trad et al., 2010*). Inoltre, il gene bovino promotore della PEPCK è positivamente regolato dal propionato (*Koser et al., 2008*), che costituisce un meccanismo di feed-forward di controllo del substrato per la gluconeogenesi epatica, legata ai prodotti finali della fermentazione ruminale. Di conseguenza, l'aumento di produzione di propionato ruminale, alimentando ad esempio, gli animali con monensin nel prepartum, induce l'espressione dell'mRNA dell'enzima PEPCK-C epatico (*Karcher et al., 2007*). Allo stesso modo, l'espressione dell'mRNA codificante per la PEPCK nei bovini da latte, durante la lattazione è aumentato quando aumenta l'assunzione di cibo (*Greenfield et al., 2000*). Contrariamente alla PEPCK, l'abbondanza dell'mRNA codificante per la PCe l'attività di questo enzima sono elevate al momento del parto (*Greenfield et al., 2000; Hartwell et al., 2001; Loor et al., 2006*), evento che sembra essere legato a un ridotto rapporto insulina / glucagone (*Hammon et al., 2009; Loor et al., 2006*).

Ulteriori controlli della PC e della PEPCK in situazioni di restrizione alimentare e in seguito a somministrazione di somatotropina bovina (BST) suggeriscono che la PC, ma non la PEPCK, sia elevata in condizioni di carenza di cibo (*Velez & Donkin, 2005*), mentre la PEPCK, ma non la PC, sia elevata in seguito a somministrazione di BST (*Velez & Donkin, 2004*). Questi dati evidenziano l'unicità della specie bovina per quanto riguarda il controllo del metabolismo del glucosio. Quando questi dati sono considerati collettivamente, indicano che l'espressione della PC svolge un ruolo fondamentale nel promuovere l'ingresso dei precursori endogeni nella gluconeogenesi quando l'assunzione è compromessa, mentre l'espressione della PEPCK-C è legata al controllo della gluconeogenesi quando l'assunzione di cibo non è vincolata. Questo modello differenziale di regolazione è di vitale importanza perché una sovraregolazione dell'attività della PEPCK senza sufficiente disponibilità di precursori glucogenici potrebbe sottrarre OAA al ciclo TCA. La conseguenza sarebbe un'ossidazione ridotta di acetil-CoA e alternativamente un aumento della sintesi dei chetoni (*Baird et al., 1968; Grummer, 1993*). Al contrario, una maggiore attività del PC in periodi di bilancio energetico negativo permette al piruvato di essere incanalato attraverso OAA sostenendo la produzione epatica di glucosio e, contemporaneamente, riducendo al minimo la chetogenesi

1.3. Metabolismo lipidico

I lipidi includono che è necessario prendere in considerazione in questa sede sono colesterolo, fosfolipidi e trigliceridi. Questi e i loro derivati forniscono energia e risultano essere le componenti essenziali di un' ampia varietà di processi endocrini (Mattos *et al.*, 2000; Wathes *et al.*, 2007b). Il tessuto adiposo è il sito di stoccaggio principale, nonostante i lipidi vengano immagazzinati anche in altri tessuti, inclusi quello muscolare e quello epatico, costituendo i principali componenti di tutte le membrane cellulari. La quantità di lipidi presenti nel corpo in ogni momento è controllato da segnali metabolici centrali e periferici che regolano l'accumulo e la mobilitazione. La maggioranza (95%) del volume del tessuto adiposo è composto da trigliceridi, stoccati in goccioline lipidiche con un core lipidico neutro ed un monostrato fosfolipidico esterno (Arner, 2005). Il tessuto adiposo secerne diverse sostanze, tra cui la leptina , la resistina , il fattore di necrosi tumorale (TNF- α) e l'interleuchina (IL-6), che contribuiscono al controllo dell'omeostasi energetica (Vernon, 2005).

Negli ultimi anni, la biochimica del metabolismo lipidico è stata rivista in dettaglio (Drackley *et al* 2001; Vernon, 2005). La lipogenesi avviene essenzialmente mediante due meccanismi. La prima via metabolica riguarda i trigliceridi circolanti, che, attraverso le lipoproteine, vengono idrolizzati dalle lipasi lipoproteiche, rilasciando acidi grassi che vengono assorbiti dai tessuti. Una volta all'interno degli adipociti, gli acidi grassi vengono convertiti in triacetilgliceroli, da enzimi intermediari come l'acil-CoA sintetasi, la glicerol-3-fosfato aciltransferasi (GPAT), la fosfoidrolasi dell'acido fosfatidico e la diacil gliceracetil transferasi (DGAT; Arner 2005; Vernon 2005). La seconda forma di lipogenesi coinvolge la sintesi *ex novo* degli acidi grassi. Nei ruminanti questo avviene in seguito all'assorbimento dell'acetato a livello ruminale, sotto il controllo dell' acetil-CoA carbossilasi (ACC1). Il primo passo dell'esterificazione prima dello stoccaggio è catalizzato dal GPAT (Vernon, 2005). Infine, va ricordato che la ghiandola mammaria può utilizzare anche il β -idrossibutirrato (BHBA) per la sintesi *ex novo* degli acidi grassi.

Durante la lattazione, l'attività lipogenica è ridotta, diminuendo sia l'assorbimento da parte del tessuto adiposo, che lo stoccaggio attraverso l'espressione ridotta dell'ACC1 e della lipasi lipoproteica. Allo stesso tempo, il rilascio di acidi grassi è stimolato dalla sovraregolazione di alcune lipasi, tra cui l'HSL (hormone-sensitive lipase). La fase della scissione finale porta al rilascio diglicerolo e acidi grassi non esterificati (NEFA). Questi vengono esportati dal tessuto adiposo attraverso la fatty acid binding protein 4 (FABP4) e trasportati nel sangue legati principalmente all'albumina (*Martin et al., 2006*).

La concentrazione dei NEFA circolanti comincerà ad aumentare circa 2 settimane prima del parto, con un picco intorno al 0-10° giorno dopo il parto (*Contreras & Sordillo, 2011; Kawashima et al., 2012*). Questi NEFA consistono principalmente in acidi grassi saturi, compreso il palmitato (C16:0) e lo stearato (C18:0), e l'acido grasso oleico monoinsaturo (C18:1n9c; *Contreras & Sordillo 2011*).

Così come per quanto concerne il metabolismo glicidico, il fegato gioca un ruolo fondamentale nel metabolismo lipidico. L'aumento dei NEFA durante il post-partum fornisce un substrato energetico per il glucosio attraverso la β -ossidazione. L'ossidazione, a sua volta, porta ad un accumulo di acetil-CoA, che può essere parzialmente ossidato a formare acido acetico e, quindi, corpi chetonici, quali il BHBA, riesterificato a formare trigliceridi, che possono essere conservati o esportati come lipoproteine a bassa densità (VLDL). Quando è superata la capacità mitocondriale, l'ossidazione non è associata alla produzione di ATP e i NEFA possono essere ossidati a perossisomi, producendo perossido di idrogeno e calore piuttosto che ATP (*Grummer, 2008*). Poiché la capacità di esportazione del fegato è limitata, l'accumulo di trigliceridi negli epatociti porta ad una degenerazione epatica che si traduce in steatosi (*Vernon, 2005*). Questo accade prevalentemente nelle vacche da latte, con un picco alla seconda settimana dopo il parto (*Drackley et al., 2001; Kruip et al., 2001*).

Durante il peri-partum, le concentrazioni di NEFA e quelle di BHBA sono correlate. Tuttavia, mentre le concentrazioni di NEFA iniziano a diminuire da circa 1-2 settimane dopo il parto, le concentrazioni di BHBA continuano ad aumentare fino alle 6 settimane post-partum, mentre il triacilglicerolo epatico viene utilizzato per la

produzione di energia (*Wathes et al., 2007c*). Se l'accumulo di triacilglicerolo è eccessivo, possono verificarsi non solo danni fisici a carico degli epatociti, ma è possibile che si inneschi l'apoptosi cellulare a causa dello stress cui va incontro il reticolo endoplasmatico e i danni a carico delle membrane mitocondriali (*Contreras & Sordillo, 2011*).

Durante il picco di lattazione, più dell'80% del glucosio disponibile è destinato alla ghiandola mammaria per la sintesi del latte (*Bell, 1995; Hocquette & Bauchart, 1999*) e la maggior parte dei grassi mobilitati dal tessuto adiposo contribuiscono alla sintesi dei grassi del latte (*Grummer, 1991*). Dal momento che la selezione genetica ha incrementato notevolmente il volume del latte prodotto, si è assistito a due ordini di fenomeni: da un lato una progressiva diminuzione della concentrazione di grasso del latte, che però non è stata direttamente proporzionale all'aumento produttivo registrato nelle bovine in termini quantitativi. Ciò ha comportato una concentrazione di grasso intorno al 3,5% e la necessità per le moderne vacche da latte, di una maggiore mobilitazione delle riserve adipose per far fronte all'eccessiva domanda energetica.

La composizione del grasso del latte è complessa: sono stati identificati più di 500 diversi acidi grassi, circa il 75% dei quali sono saturi, il 21% monoinsaturi e il 4% polinsaturi (*Mansbridge e Blake, 1997*). La maggior parte di quelli dal C4:0 al C14:0 sono sintetizzati ex novo dal glicerolo e dagli acidi grassi liberi, mentre circa il 50% dei C16:0 e la maggior parte degli acidi grassi a catena lunga sono derivati dalla circolazione dovuta alla digestione o alla lipolisi dei depositi adiposi (*Grummer, 1991*). L'espressione degli enzimi coinvolti nella sintesi di grassi del latte, quali stearoil-CoA desaturasi 1 (SCD1), possono influenzare la quantità di energia partizionata nel latte (*Macciotta et al., 2008*).

Il passaggio da lipogenesi a lipolisi è promosso dal cambio del pattern endocrino durante il periodo del peripartum. La rapida crescita dei tessuti fetali nell'ultimo periodo di gestazione, seguito dalla lattogenesi esaurisce le riserve corporee di glucosio (*Bell, 1995*). Questo, a sua volta, riduce la secrezione di insulina. Alte concentrazioni di insulina promuovono l'anabolismo, mentre basse concentrazioni promuovono il catabolismo, influenzando così la suddivisione dei nutrienti nei vari compartimenti anatomici. La regolazione dell'insulina è principalmente svolta a valle del

recettore, da elevate concentrazioni di lipidi circolanti, che promuovono una insulino-resistenza periferica. Tramite tale meccanismo, gli animali sono in grado di diminuire l'assorbimento di glucosio nei tessuti non essenziali durante periodi caratterizzati da carenza di nutrienti (*Drobny et al., 1984; White, 2006*). L'ormone della crescita (GH) plasmatico raggiunge il picco di secrezione al momento del parto o poco dopo, poi diminuisce gradualmente (*Kawashima et al., 2007*). Anche se il GHR1A, la variante del recettore del GH (GHR) epato-specifica, è inibito durante il periodo perinatale (*Kobayashi et al., 1999; Fenwick et al., 2008*), i GHRs continuano ad essere espressi nel tessuto adiposo. Quando le concentrazioni ematiche di insulina sono basse, il GH, insieme alle catecolamine, promuovono la lipolisi (*Vernon, 2005*). La tempistica del passaggio ad uno stato catabolico può essere valutata misurando le concentrazioni circolanti di NEFA. Nelle primipare, queste concentrazioni generalmente iniziano a salire qualche settimana prima del parto, mentre in animali più anziani l'aumento coincide con l'inizio della lattazione (*Wathes et al., 2007a*). La massiva diminuzione di GHR1A è anche responsabile della diminuzione pronunciata delle concentrazioni circolanti di insulin-like growth factor-1 (IGF-1), che inizia prima del parto e di solito raggiunge il punto più basso nella prima settimana del post-partum (*Taylor et al., 2004; Fenwick et al. 2008*).

Ruolo chiave nel metabolismo lipidico nei ruminanti è inoltre svolto dalla leptina, un ormone che contribuisce alla regolazione dell'assunzione di cibo, alla ripartizione energetica e alla deposizione del tessuto adiposo durante i cambiamenti a lungo e breve termine nello stato nutrizionale (*Ingvarsen & Boisclair, 2001*). La leptina circolante è prodotta principalmente dal tessuto adiposo bianco, anche se ci può essere una produzione locale in altri tessuti, come nei muscoli e nella placenta (*Hoggard et al., 1997; Ramsay & Caperna 2009*). Le vacche da latte presentano alte concentrazioni di leptina prima del parto, proporzionali al BCS dell'animale e sono più significative nelle manze che nelle pluripare.

Le concentrazioni diminuiscono al momento del parto per permanere poi basse anche quando lo status energetico è migliorato (*Ingvarsen & Boisclair, 2001; Wathes et al. 2007c*). Si pensa che l'ipoleptinemia possa contribuire alla resistenza periferica all'insulina nel post-partum (*Ingvarsen & Boisclair, 2001*). Ci sono anche

significative interazioni tra le azioni intracellulari della leptina e le IGF, indicando cross-talk tra le rispettive modalità di azione (*Saxena et al., 2008*).

Le misurazioni del BCS, inoltre, forniscono un utile indizio per valutare i depositi lipidici e la rispettiva mobilitazione, anche se dette misurazioni si concentrano sul sottocutaneo piuttosto che sui siti di stoccaggio profondo. Il profilo degli acidi grassi dei NEFA in circolazione riflette più da vicino le caratteristiche dei depositi di grasso addominale piuttosto che quelli sottocutanei, suggerendo che questi siano più prontamente mobilitati dopo il parto (*Hostens et al., 2012*).

L'assunzione di sostanza secca è il principale fattore che influenza il BCS, ma anche la dieta somministrata agli animali nel periodo pre-partum influenza la velocità e l'entità della successiva mobilitazione dei tessuti (*Hayirli et al., 2002; Wathes et al., 2007c*). A tal proposito, è stato osservato che vacche troppo grasse (BCS >3,5 su una scala da 1-5) o troppo magre (BCS < 2,5) prima del parto presentano una riduzione della fertilità successivamente. In uno studio retrospettivo (*López-Gatius et al., 2003*) sono stati raggruppati i risultati di 15 studi, nei quali era stato correlato il BCS degli animali (calcolato su di una scala da 1 a 5) con la fertilità dei soggetti (*Pryce et al., 2001*). Gli autori hanno osservato che la perdita di oltre 1 unità di BCS dopo il parto e un BCS scadente al momento della prima inseminazione conduceva a un significativo aumento del periodo parto-concepimento. Il BCS è spesso usato come una valutazione della situazione energetica negli studi di genetica, trattandosi di un fattore ereditabile, negativamente correlato con i fattori di fertilità, come il tasso di gravidanza e l'intervallo interparto (*Pryce et al., 2002*).

1.4. Metabolismo proteico

Il metabolismo proteico nei ruminanti è il risultato dell'attività metabolica dei microrganismi presenti nel rumine (*Owens & Bergen, 1983*). In quest'ottica la struttura delle proteine rappresenta un fattore chiave nel determinare la loro suscettibilità alle proteasi microbiche e, quindi, la biodegradabilità. La degradazione proteica a livello ruminale risente sia del pH che delle specie microbiche predominanti all'interno della popolazione. Il rumine rappresenta un insuperabile sistema di coltura per batteri anaerobi, protozoi e funghi. Circa il 70-80% dei microrganismi ruminali hanno azione verso particelle di alimento indigerito nel rumine (*Craig et al., 1987*), ed il 30-50% di questi presentano attività proteolitica (*Prins et al., 1983*). Durante la digestione ruminale, i microbi si moltiplicano e sintetizzano una considerevole quantità di proteina grezza microbica (PGM), utilizzando proteine o azoto non proteico (NPN) quale fonte di N. Del totale delle proteine che raggiungono il duodeno, dal 40 all'80% è rappresentato da PGM, in base a diversi fattori, legati sia alla dieta somministrata che all'animale stesso (*Bach et al., 2005*).

Quando sono riforniti di una adeguata quantità di azoto alimentare, le proteine microbiche sintetizzate nel rumine rendono i ruminanti indipendenti dalla forma da cui sono approvvigionati. Basti pensare che alcuni studi hanno dimostrato la possibilità di alimentare bovini esclusivamente con una fonte azotata non proteica ed ottenere comunque la produzione di una buona percentuale di proteine del latte. Questo perché le diverse forme dell'azoto della dieta sono degradate dai microbi ruminali in ammoniaca, la principale forma di azoto usata per la sintesi di proteine microbiche. A differenza dei monogastrici, infatti, la scissione delle proteine nel rumine non si ferma alla produzione di aminoacidi, ma prosegue con reazioni di deaminazione che portano al distacco del gruppo aminico ($-NH_2$), che viene successivamente trasformato in ammoniaca (NH_3). Le proteine assunte con la dieta sono degradate dai microrganismi ruminali in peptidi, amminoacidi e ammoniaca, ma il 50-80% dell'azoto incorporato nelle proteine microbiche proviene dall'ammoniaca, e per il resto la prevalenza è per piccoli peptidi (*Tamminga, 1979*). La maggior parte dei batteri ruminali ha sistemi di trasporto per una varietà di peptidi e per l'ammoniaca ma non per gli amminoacidi

liberi. L'utilizzazione dell' NH_3 da parte dei batteri ruminali dipende dalla capacità di questi di moltiplicarsi: infatti, l' NH_3 viene incorporata dai batteri per sintetizzare la PGM necessaria per l'accrescimento e la loro moltiplicazione. Tuttavia, la capacità di moltiplicarsi è in relazione alla disponibilità di energia: se la produzione di NH_3 non è accompagnata dall'utilizzazione dei batteri (capacità di utilizzazione legata alla disponibilità di energia), la NH_3 in eccesso si accumula nel rumine, passa dal rumine al sangue e da qui al fegato, dove viene detossificata in urea (*Tamminga, 1979*). L'anaerobiosi costituisce il limite alla quantità di aminoacidi che possono essere forniti dai microrganismi ruminali all'animale. Questo è sufficiente per il mantenimento e una parte della produzione e della crescita corporea, ma per alti livelli di produzione di carne o latte la dieta deve includere proteine che sfuggano alla degradazione ruminale ("by-pass") a vantaggio di una digestione nel piccolo intestino. Solo il 10-20% della proteina nel foraggio fresco sfugge alla degradazione ruminale, ma la percentuale può essere aumentata trattando il foraggio con il calore o con prodotti chimici quale acido formico o formaldeide, oppure più comunemente con l'aggiunta di concentrati proteici a medio o elevato contenuto in proteine "by-pass". Diversi sono i fattori che possono influire sulla velocità di degradazione a livello ruminale delle proteine (*Bach et al., 2005*), tra cui è opportuno ricordare:

- ✓ **Il tipo di proteina:** la solubilità delle proteine è un fattore chiave nel determinare la loro suscettibilità alle proteasi microbiche e, quindi, la loro biodegradabilità. Per esempio, prolamine e gluteline sono insolubili e lentamente degradate, mentre le globuline sono solubili e altamente degradabili nel rumine (*Romagnolo et al., 1994*).
- ✓ **Le interazioni con altri nutrienti** (principalmente carboidrati): diversi autori (*Bach et al., 2005*) hanno dimostrato come l'amido presente nella razione interferisca con la degradazione delle proteine a livello ruminale. Ad esempio, l'aggiunta di amilasi incrementa la degradazione totale delle proteine ruminali dei cereali tra il 6 ed il 20%. Allo stesso modo, la degradazione proteica *in vitro* risulta accelerata dal 42 al 53% in caso di aggiunta di enzimi in grado di scindere la cellulosa. In altri casi è stato invece osservato un effetto negativo del NDF, al punto che le proteine legate all'NDF sono degradate dai batteri

proteolitici solo dopo l'inizio della depolimerizzazione microbica della cellulosa.

- ✓ **Il pH ruminale:** è interessante notare che il range di pH ottimale per gli enzimi proteolitici varia da 5,5 a 7,0. Sia in diete caratterizzate da un'elevata concentrazione di foraggi che in quelle con più concentrati, la degradazione delle proteine tende a diminuire allorché il pH scende al di sotto del 5,4. Inoltre, in uno studio condotto diversi anni addietro (*Endres & Stern, 1993*) è stato osservato che un abbassamento del pH da 6,3 a 5,9 ha determinato una riduzione della degradazione delle proteine e del NDF. Nel medesimo studio è stato osservato che la conta dei batteri proteolitici non è risultata influenzata, mentre i cellulolitici sono risultati ridotti di circa il 50%. È quindi possibile che con diete caratterizzate da un'eccessiva presenza di concentrati, si verifichi una predominanza di batteri amilolitici, e di conseguenza una diminuzione dei cellulolitici, riducendo la degradazione della fibra e delle proteine. Sembra quindi accertato che la degradazione proteica a livello ruminale richiede la presenza di enzimi proteolitici e non proteolitici, nonché la combinazione di diverse attività microbiche ed enzimatiche.
- ✓ **La popolazione microbica predominante** (dipendente dal tipo di razione, velocità di passaggio ruminale, e pH ruminale): in quanto a riferito in precedenza.

L'azoto richiesto per la sintesi della PGM ha anche origine endogena. Questo include l'urea derivante dell'ammoniaca in eccesso prodotta nel rumine che, come accennato in precedenza, giunta nel fegato può essere eliminata sotto forma della meno tossica urea (*Lapierre & Lobley, 2001*). La maggioranza dell'urea è normalmente escreta attraverso i reni, ma nei ruminanti, la perdita di azoto ureico è diminuita riciclandolo attraverso il rumine stesso. Questo avviene con il rilascio di urea nella saliva e tramite la diffusione di urea attraverso la parete ruminale, secondo un gradiente di concentrazione dal sangue: in entrambi i casi la concentrazione di urea nel rumine mantiene l'attività ureolitica dei batteri attaccati all'epitelio ruminale. Di conseguenza la maggior parte del rifiuto del metabolismo azotato ritorna nel rumine anche magari a distanza di poche ore, e può essere quindi riutilizzato in un momento di carenza

azotata nella sintesi di proteine microbiche che poi verranno digerite nell'abomaso ed assorbite come amminoacidi nell'intestino tenue.

Anche per le proteine, quindi, così come descritto per glucidi e lipidi, il fegato svolge un ruolo chiave nel metabolismo: nel momento in cui la razione somministrata agli animali presenta una carenza proteica, la quota di urea che ritorna al rumine attraverso la saliva o le pareti ruminali è più elevata, mentre se la percentuale di proteine grezze della razione aumenta, si riduce la quota di urea riciclata e ne viene eliminata una maggior parte con le urine (*Reynolds & Krinstensen, 2009*). Il riciclo dell'urea riduce anche la quantità d'acqua richiesta per l'escrezione dell'urea. Di conseguenza, una diminuzione dell'assunzione di acqua riduce l'escrezione di urea e aumenta il tasso di riciclo di azoto con l'urea attraverso il rumine.

Oltre ad essere il principale sito deputato alla genesi dell'urea nell'organismo, il fegato rappresenta il principale sito di eliminazione di alcuni aminoacidi, sia nei ruminanti che nei non-ruminanti (*Lobley e Lapierre, 2003; Hanigan, 2005*) e allo stesso tempo, uno dei principali siti di sintesi di proteine che sono utilizzate per diverse funzioni vitali dell'organismo, oltre che per la crescita (*Raggio et al., 2007*). Proprio in quanto svolgono funzioni fondamentali, quali, solo per citarne alcune, il mantenimento della pressione osmotica vascolare (albumine), la coagulazione (fibrinogeno), l'immunità (proteina C-reattiva), la sintesi di tali proteine a livello epatico è vitale al fine di mantenere l'integrità metabolica dell'organismo (*Raggio et al., 2007*). Pertanto, anche in condizioni di ingestione di razioni caratterizzate da basso contenuto in proteine, la sintesi di tali proteine a livello epatico è mantenuta. Come sarà spiegato meglio in seguito, queste particolarità dei ruminanti in generale, nel caso della specie bufalina, sono ancora più evidenti ed accentuate: questa infatti, specie di origine tropicale, è stata costretta nel corso dei millenni ad elaborare meccanismi di sopravvivenza adeguati al territorio, in cui si verificano periodi di abbondanza alimentare, subito dopo la stagione delle piogge, e periodi di carenza. Proprio per tale motivo, il sistema di ricircolo dell'azoto elaborato da questa specie è molto più efficiente se comparato alla specie bovina.

CAPITOLO 2 – IL RAZIONAMENTO NELLA SPECIE BUFALINA IN ITALIA

2.1. Cenni di alimentazione e razione

Al fine di ottenere una produzione ottimale è fondamentale coprire tutti i fabbisogni degli animali in produzione evitando eccessi o carenze. Il razione parte quindi dalla conoscenza delle caratteristiche chimico nutrizionali degli alimenti, nonché dei fabbisogni dell'animale in ogni sua fase fisiologica e per ogni capacità produttiva.

La copertura dei fabbisogni trova però due grossi ostacoli quali la capacità di ingestione e la quota di fibra grezza necessaria alla corretta ruminazione, che limitano il razione anche perché “di segno opposto”: per la corretta ruminazione e il mantenimento della condizione di normalità, i foraggi (ricchi in fibra grezza) non dovrebbero costituire meno del 60% della razione, ma a causa delle caratteristiche chimico nutrizionali e della capacità di ingombro, all'aumentare della loro presenza diminuisce il valore energetico della dieta (*Campanile et al., 1997a*). Pertanto all'aumentare del livello produttivo, risulta più complicato coprire i crescenti fabbisogni mantenendo una corretta fisiologia degli animali. Il problema viene parzialmente risolto dalla capacità di catabolizzazione propria dei ruminanti (*Chiesa et al., 1991; Bertoni et al., 1993*), grazie alla quale vengono utilizzate risorse endogene capaci di limare il gap esistente tra le richieste dell'animale e quanto la razione è in grado di fornire; il processo di catabolizzazione si instaura chiaramente nel momento di maggior stress energetico e cioè nella prima fase della lattazione. La bufala, pur essendo capace di una certa tesaurizzazione, non “brucia” più di 700 g al giorno di peso vivo, mostrando quindi una capacità nettamente inferiore alla vacca, e ciò comporta, in caso mancata copertura dei fabbisogni alimentari, la riduzione della produzione di latte (*Zicarelli, 2001*).

La produzione di latte è il risultato di un complesso processo endocrino-metabolico utile a favorire il potenziale genetico di un animale. Essa risulta condizionata da fattori

ambientali (temperatura, umidità, escursione termica, velocità ed esposizione ai venti) e da fattori manageriali (benessere, tecniche di allevamento, alimentazione). Tra questi ultimi sicuramente il soddisfacimento dei fabbisogni nutrizionali rappresenta il punto focale al fine di ridurre al minimo il ricorso alle riserve endogene e favorire la massima espressione delle potenzialità intrinseche dell'individuo.

In particolare, uno degli errori che spesso si commette nel razionare la bufala, così come accade per altri ruminanti in produzione zootecnica, è considerare i gruppi in produzione come entità statiche e non dinamiche. Infatti il dinamismo del gruppo produttivo, è condizionato anche dalla pressione selettiva attuata e di conseguenza dall'età media della mandria che influisce sui fabbisogni nutrizionali di accrescimento cui vanno aggiunti quelli di produzione. Il periodo stagionale e l'esposizione ai venti, l'umidità ambientale etc. sono altri fattori che possono modificare l'esigenza nutrizionale degli animali in produzione. Bisogna, inoltre, considerare che durante l'anno la disomogenea distribuzione dei parti, particolarmente evidente nella specie bufalina a causa della nota stagionalità riproduttiva, fa sì che l'incidenza dei soggetti ad inizio e a fine lattazione varia notevolmente rendendo più complesso il razionamento soprattutto negli allevamenti in cui non si effettua la suddivisione in gruppi (almeno tre) con diversa lunghezza della lattazione. È noto, infatti, che l'inizio così come la fase finale della lattazione è caratterizzata da una elevata lipomobilizzazione di cui si deve tenere conto per ottimizzare la produzione quantitativa. L'inizio della lattazione, nella specie bufalina, è caratterizzato da un continuo modificarsi del quadro endocrino-metabolico, condizionato dal rapporto tra l'energia assunta con gli alimenti e quella eliminata con la produzione di latte.

2.2. Ingestione di sostanza secca e comportamento alimentare

Nel bufalo, come in altri ruminanti domestici, l'assunzione di sostanza secca (ss) dipende da diversi fattori: caratteristiche chimiche e organolettiche della dieta, condizioni di conservazione dell'alimento, presenza di contaminazioni chimiche, condizione fisiologica dell'animale, età, sesso e, non ultimo, il livello produttivo. La specie bufalina, presenta un'ingestione più veloce dell'alimento e un tempo di ruminazione più lungo rispetto alla bovina, caratteristica questa da sfruttare per migliorare l'efficienza nutrizionale della dieta somministrata (Tabella 1).

Tabella 1. Sostanza secca (SS) ingerita e tempo (m') impiegato per ingerire (DI), ruminare (DR) e masticare (DM) delle bufale nelle diverse distanze dal parto (DIP)

DIP (gg)	SS ingerita (Kg)	DI (minuti)	DR (minuti)	DM (minuti)
24	12,37	121	438	559
52	16,64	163	481	644
87	16,39	177	591	768
113	17,93	173	491	664
147	18,29	174	504	678
181	14,82	158	476	634
243	11,94	125	424	558
Totale	15,48	156	486	648

In questa specie la somministrazione di razioni caratterizzate da elevata variabilità delle fonti proteiche ed energetiche favorisce, infatti, l'attività ruminale, le sintesi

microbiche e, quindi, l'efficienza nutrizionale della dieta. In definitiva, garantendo il soddisfacimento delle esigenze energetiche e azotate dell'intera flora microbica, si facilita e si massimizza la produzione di proteine batteriche essenziali a garantire la fonte amminoacidica ed energetica al tessuto mammario e a favorire l'attività degli epatociti. Il tempo di ruminazione, nella specie bufalina, è influenzata dalla quantità di foraggio e principalmente dal contenuto di ADF (cellulosa e lignina).

La produzione di latte e la percentuale di foraggio presente nella dieta influenza, inoltre, il tempo necessario all'assunzione della razione.

Il contenuto della parete cellulare (cellulosa, emicellulosa e lignina) e la densità energetica e proteica della dieta possono influenzare l'assunzione di sostanza secca. L'aumento delle frazioni fibrose e della concentrazione proteica determina una inferiore ingestione di alimento, mentre l'aumento della densità energetica della dieta ha un effetto contrario. Quest'ultima affermazione è vera laddove la densità energetica risulta inferiore alle 0,75 UFL/kg di ss (gruppo di bufale in asciutta, animali in accrescimento, diete utilizzate nei paesi in via di sviluppo), mentre nelle diete caratterizzate da concentrazioni energetiche comprese tra gli 0,80 e 0,95 UFL/kg di ss un ulteriore aumento potrebbe determinare una riduzione dell'ingestione legata al repentino innalzamento dell'insulinemia. Un eccesso energetico o proteico, infatti, aumenta il glucosio ematico, responsabile del feed-back negativo sull'ingestione di sostanza secca attraverso cambiamenti endocrino-metabolici. Va precisato che i livelli di energia fermentescibile della dieta devono essere proporzionati al livello produttivo e alla fase di lattazione del gruppo da razionare, così come verrà riportato successivamente.

L'ingestione di sostanza secca aumenta in funzione dell'età del soggetto. Quest'ultima varia, nei soggetti in accrescimento, tra il 1,6% e il 2,2% del peso vivo per raggiungere negli animali adulti il 3,2% del peso vivo. In particolare se ci riferiamo al peso metabolico ($PV^{0.75}$) degli animali, nelle manze l'ingestione di sostanza secca è di $90g/kg PV^{0.75}$, nella bufala adulta l'ingestione di ss varia da 112 a $137g/kg PV^{0.75}$, mostrando oscillazioni tra 102 e $164 g / kg PV^{0.75}$ in funzione della distanza dal parto, dei livelli produttivi e delle caratteristiche della dieta. Negli ultimi due mesi di

lattazione l'ingestione di ss risulta più bassa (93-104 g/kg PV^{0.75}) ed è condizionata positivamente dalla produzione quali-quantitativa di latte.

Durante alcuni studi condotti sul comportamento alimentare della bufala durante la lattazione, l'ingestione di ss è risultata, escludendo l'apporto necessario per il mantenimento (91 g/kg PV^{0.75}), pari a 275 g per Kg di latte corretto (ECM = 740 kcal).

2.3. Fabbisogni energetici

I fabbisogni di mantenimento sono calcolati con riferimento a dei fabbisogni di base corretti per la deambulazione, dipendente dallo spazio a disposizione, per la gerarchia esistente nella mandria, in caso di utilizzo del pascolo ed in relazione al management in generale. Nella pratica del razionamento della bufala italiana i fabbisogni di mantenimento sono calcolati pari a UFL 1,4+0,6 per ogni 100 kg di peso vivo (Zicarelli, 1992). Il fabbisogno teorico così calcolato va adattato ad ogni mandria sulla base dello stato di nutrizione (BCS): a parità di peso, più elevato è il BCS dei soggetti tanto maggiore è il fabbisogno di mantenimento, in quanto nella composizione del peso vivo prevarrà il tessuto lipidico (Zicarelli, 2001).

I fabbisogni di mantenimento della bufala sono fortemente condizionati dal clima ed in particolare dalle basse temperature, alle quali la bufala, animale di origine tropicale, è chiaramente più sensibile. Ne sono una prova i livelli ematici degli ormoni tiroidei riscontrati in inverno per bufale allevate in Campania, più elevati negli allevamenti pedemontani rispetto ai livelli riscontrati nelle aziende limitrofe al mare (Campanile et al., 1994). La termoregolazione necessita quindi di energia, ricavata dalla metabolizzazione delle risorse endogene che ha come risultato una certa produzione acidica, riscontrabile anche nell'aumento di acidità titolabile del latte soprattutto quando gli animali sono esposti al vento e i fabbisogni non sono coperti (Zicarelli, 2001). La spesa energetica per la termoregolazione grava maggiormente se l'abbassamento delle temperature coincide con la fase ascendente della lattazione, ma anche nella fase terminale, l'elevato contenuto lipidico del latte bufalino e la contemporanea riduzione di ingestione di sostanza secca suggeriscono una oculata formulazione della dieta (Zicarelli, 2001).

La quantità di energia netta che occorre assicurare per produrre 1 kg di latte standard (740 kcal) è pari al valore calorico del latte prodotto, indipendentemente dalla capacità di utilizzazione dei vari foraggi da parte delle bufale (Zicarelli, 2001). In prove di campo è emerso (Di Palo, 1992; Di Lella et al., 1997) che occorrono oltre 0,5 UFL per ottenere 1 kg di latte ECM. Il surplus energetico di cui sopra è necessario per indurre il recupero di peso, o eventuale incremento, da parte di alcuni soggetti; a questo va

aggiunta l'alimentazione dei tori, l'energia necessaria per far fronte alle diverse condizioni ambientali e sociali riscontrabili in una mandria, nonché la variazione delle esigenze al variare del BCS. Il body condition score acquisisce nella bufala un significato particolare e strettamente legato alla produzione, in quanto nel latte bufalino la percentuale in grasso oscilla dal 5,5% al 13% (*Zicarelli, 2001*). La maggiore variabilità comporta una oggettiva difficoltà nel razionamento: le bufale in grado di produrre un latte più ricco in grassi utilizzeranno per questo scopo l'eventuale surplus energetico, mentre la carenza si tradurrà con una flessione della produzione di latte (ma con un contenuto lipidico inalterato); contrariamente, nei soggetti incapaci di produzioni simili, il surplus energetico viene destinato all'accumulo di riserve corporee (*Zicarelli, 2001*). Da ciò scaturisce che nella valutazione del BCS, comunque fondamentale, è necessario tener presente che la spiccata capacità della bufala di incrementare il tenore lipidico del latte (incremento fino al 92%) riduce la possibilità che essa ingrassi a seguito di eccessi energetici (*Zicarelli, 2001*).

La bufala, pur essendo caratterizzata da un habitus moderatamente catabolico, registra una perdita di peso durante la prima fase della lattazione che dovrà essere compensata nei mesi successivi; anche nella bufala, come nella vacca, il catabolismo di 1 kg corporeo fornisce un'energia pari a 3,5 UFL, mentre occorrono 4,5 UFL per ricostituirlo nella fase anabolica della lattazione (*Zicarelli, 2001*). Il calo di peso caratteristico della fase catabolica della lattazione fa quindi aumentare le esigenze energetiche successive: le UFL occorrenti per produrre 1 kg di latte ECM risultano pari a 0,35 nei primi 40 giorni (*Di Palo, 1992*) mentre risultano mediamente superiori a 0,5 nel corso dell'intera lattazione (*Zicarelli, 2001*).

Ultimo parametro da considerare nel calcolo dei fabbisogni energetici è l'incidenza delle primipare; tali animali avranno un peso di circa 100 kg inferiore agli animali adulti e quindi oltre ai fabbisogni di mantenimento e produzione, dovranno disporre di una quota energetica sufficiente a garantire un accrescimento di circa 330 g/ die. Il supplemento energetico deve essere pari a 1,5 UFL/die (*Zicarelli, 2001*). Nella bufala la quota di UFL da somministrare per questo parametro è mediamente maggiore a quella destinata alle vacche per lo stesso motivo; la discrepanza è dovuta dalla diversa età in cui avviene il primo parto, che nella bufala è mediamente maggiore di 8-10 mesi

rispetto alle razze bovine da latte più comuni. All'aumentare dell'età peggiora l'efficienza di trasformazione degli alimenti e di conseguenza l'energia necessaria per l'incremento ponderale deve ritenersi maggiore che nella vacca (*Zicarelli, 2001*).

2.4. Fabbisogni proteici

Se il latte bufalino è corretto con la formula elaborata per trasformarlo in latte standard (Di Palo, 1992):

$$((((((\text{grasso (g)}-40)+(\text{proteine (g)}-31))*0,01155)+1)*\text{kg di latte prodotto})$$

è possibile riportarlo allo stesso tenore calorico del latte bovino standard (FMC= 740 kcal con 4% in grasso, 3,1 di proteine). In tal modo si ottiene un latte (EMC) con 26,47 g di proteine su kg di latte (Zicarelli, 2001). Il latte EMC è quindi meno proteico del latte FMC, che contiene 31 g di proteine su kg di latte: ne consegue che a parità di energia endogena o esogena la bovina produce più proteine con il latte rispetto alla bufala (Zicarelli, 2001). Tale differenza fa sì che a parità di soddisfacimento energetico ma con carenza proteica nella dieta, la perdita di peso sarà maggiore nella vacca, poiché i litri di latte concessi dal livello energetico della dieta, necessitano in quest'animale di una quantità di proteina maggiore rispetto alla bufala. Pertanto, il fabbisogno proteico della bufala, a parità di energia prodotta, è inferiore a quello della vacca.

Una delle caratteristiche che contraddistingue la bufala è quella di attaccare e fermentare le proteine a livello ruminale molto più velocemente rispetto alla vacca (Zicarelli, 2001); ciò, unito alla più lunga permanenza dell'alimento nel rumine rispetto alla vacca, riduce la quota di proteine che by-passano il rumine. Nella bufala il calcolo dei fabbisogni proteici risulta perciò più complesso che in altri ruminanti e richiede una particolare attenzione allo stato metabolico del soggetto, all'efficienza del riciclo dell'urea, nonché alla tendenza al risparmio di cui dispone (Zicarelli, 2001).

Nella pratica del razionamento viene suggerito l'utilizzo della proteina grezza (PG) per il calcolo dei fabbisogni: 700 gr di proteine grezze sono ritenute sufficienti a coprire il fabbisogno proteico di mantenimento per una bufala di 650 kg, stimabili in circa 400 gr di PDI. Per il recupero di peso sono stimabili 500 gr di PG per kg da recuperare (300 gr di PDI) da aggiungere agli altri fabbisogni. Per quanto riguarda il fabbisogno di produzione viene suggerito (Zicarelli, 2001) un fabbisogno di 2,742 g PG per

grammo di proteina sintetizzata nel latte in quanto nella vacca si ritengono necessari 85 g di PG per un kg di latte col 3,1% di proteine ($85/31=2,742$). Il razionamento proteico nella bufala è quindi relativo al suo stato fisiologico, al quantitativo di proteine presenti nel latte ed all'eventuale incremento di peso; la pratica aziendale non può poi prescindere dall'incidenza delle primipare (di norma 20%) e dalla loro maggiore richiesta proteica per l'accrescimento.

2.5. Utilizzo di carboidrati nel razionamento della bufala

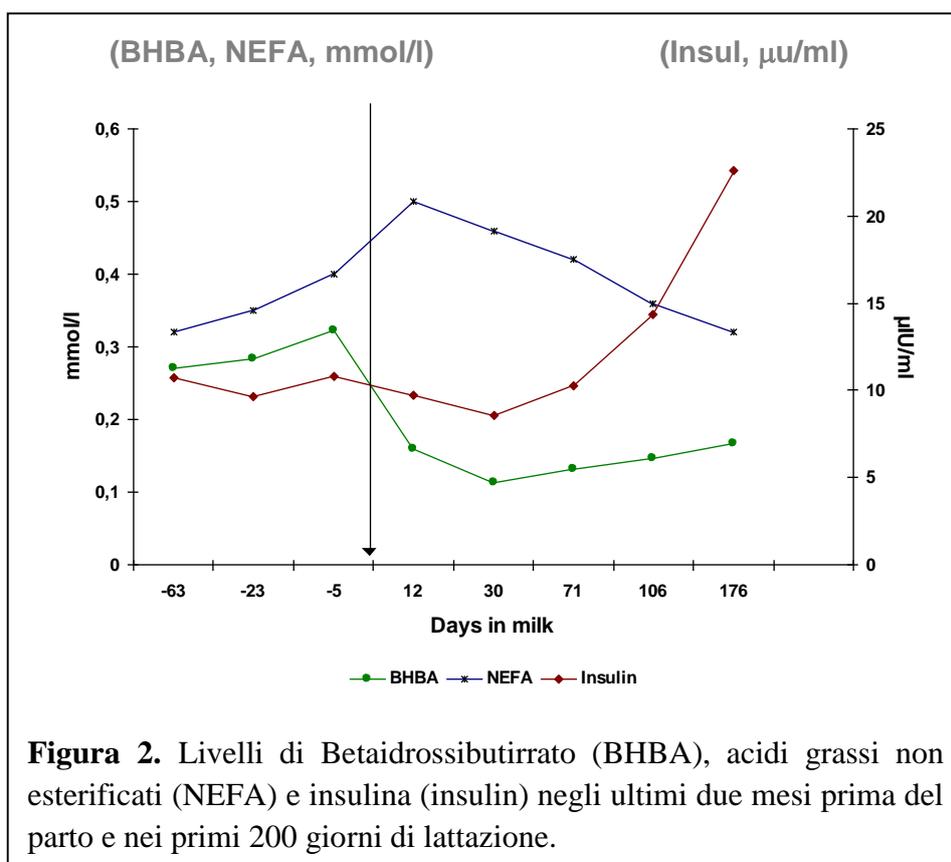
Una particolarità del razionamento della bufala da latte in Italia, da tenere in grande considerazione, è che diete caratterizzate da una elevata concentrazione di carboidrati strutturali riduce l'ingestione di sostanza secca, mentre l'alta concentrazione di amido e carboidrati fermentescibili, causano un aumento del grasso corporeo e una riduzione della durata della lattazione, per un innalzamento precoce dell'insulina. Questo ormone, infatti, è responsabile della concentrazione del glucosio ematico nei tessuti periferici per la sintesi lipidica. Il bufalo mostra una maggiore capacità di utilizzare l'azoto della dieta, anche in presenza di moderate quantità di carboidrati. L'ambiente intra-ruminale di questa specie è più favorevole per la crescita dei microrganismi che utilizzano urea. Durante la degradazione di alimenti fibrosi, come la paglia, il bufalo produce una quantità di acido propionico, che è noto come uno dei precursori del glucosio ematico, superiore a quella che si osserva rispetto ad altri ruminanti domestici. Il rapporto NSC (carboidrati non strutturali)/PG deve essere correlato ai giorni di lattazione: questo sarà massimo all'inizio della lattazione (primi 100 giorni dal parto), e più basso dopo i 100 giorni. Infatti, nella seconda fase della lattazione (dopo 100 giorni) si ha l'innalzamento dell'insulina e di conseguenza inizia la sintesi lipidica. L'aumento della densità energetica della dieta, mediante la riduzione dei foraggi e l'aumento eccessivo di carboidrati fermentescibili rappresenta un fattore deleterio per la produttività e per la sfera riproduttiva (steatosi epatica, aumento di endometriti causa di acidosi sub - clinica) degli animali, se non è limitata ai primi 100 giorni di lattazione.

Ragion per cui si consiglia la formulazione di diete caratterizzate da almeno il 45 % di foraggi, al fine di garantire un'attività ruminale ottimale. Per ottenere una maggiore densità energetica della dieta, limitando l'uso di concentrati e somministrare almeno il 45% di foraggi nella razione, è necessario l'uso di foraggi di qualità ottimale e altamente digeribili, e se del caso, grassi by-pass. L'uso di questi ultimi deve essere eseguito solo durante la prima fase della lattazione, perché, se usati per tutta la durata della lattazione, le proteine e il grasso del latte risulteranno influenzati negativamente. L'integrazione minerale (in particolare di calcio e fosforo) deve essere correlata alle

esigenze di produzione, al fine di garantire la produzione di latte e di evitare il depauperamento dell'apparato scheletrico. Quest'ultimo aspetto risulta particolarmente importante durante l'asciutta degli animali: non va infatti dimenticato che mentre nella bovina la durata dell'asciutta è di circa 60 giorni, nel caso della bufala è stimata una durata di questa fase fisiologica di circa 120 giorni. Ne consegue che carenze minerali durante questa fase incidono in maniera molto più significativa nella specie bufalina rispetto a quella bovina. A mero titolo esemplificativo, basti pensare che una carenza di soli 10 grammi/die di Calcio durante l'asciutta comporta un depauperamento delle riserve scheletriche di questo minerale pari al 6,7% e al 13,3% nella bovina e nella bufala rispettivamente. Allo stesso modo una simile carenza di Fosforo si traduce in un depauperamento pari al 12 ed al 24% delle riserve scheletriche nella bovina e nella bufala rispettivamente.

2.6. Razionamento della bufala e lipomobilizzazione

Come vedremo meglio in seguito, l'esordio della lattazione è caratterizzato da un bilancio energetico negativo (BEN), che risulta meno intenso nella bufala rispetto alla bovina da latte, conseguenza della "disoressia" fisiologica post-partum. I ruminanti domestici (bovine, bufale ed ovini) nei primi giorni di lattazione, anche se ricevono diete ben bilanciate, non riescono ad ingerire una quantità di sostanza secca (ss) necessaria a coprire i propri fabbisogni e vengono a trovarsi, così, in una condizione di iponutrizione "fisiologica". In determinate condizioni entro il 110° giorno di lattazione è possibile osservare un incremento del BHBA all'aumentare dei livelli ematici di insulina e di trigliceridi per sopperire alla copertura del fabbisogno energetico che è necessario ad assicurare i fisiologici livelli di grasso del latte, tipici della specie e della fase anabolica e terminale della lattazione (Figura 2).



Nella fase iniziale della lattazione, errori di razionamento (carenza energetica, carenza proteica, eccessi di insilato, ecc.) possono amplificare il fenomeno in seguito ad un

eccessivo ricorso alle riserve endogene ed ad un conseguente aumento degli acidi organici che si sviluppano. L'origine tropicale della specie bufalina, la poca adattabilità alle basse temperature e specialmente alle notevoli escursioni termiche, acuite dall'esposizione ai venti freddi e da stalle che non garantiscono una buona termoregolazione dei soggetti, possono essere causa di dismetabolie subcliniche particolarmente evidenti nei passaggi da periodi caldi a periodi freddi. Questo fenomeno è frequentemente osservato nei primi mesi dell'anno anche nei soggetti a metà ed a fine lattazione. È proprio in questi periodi che si avverte un intenso odore di acetone anche nei paddocks all'aperto.

I progressi in campo genetico compiuti negli ultimi anni hanno portato alla selezione di animali le cui produzioni sono sempre più spinte. La difficoltà nel soddisfare i fabbisogni produttivi di questi soggetti e il continuo ricorso alle riserve corporee rappresentano i maggiori fattori di stress che possono favorire l'insorgenza di patologie. La complessità della gestione aziendale legata principalmente all'aumentato di capi per mandria, con conseguente riduzione dello spazio vitale, ha favorito l'insorgenza di fenomeni patologici indicati come tecnopatie, che modificando l'assetto endocrino-metabolico hanno peggiorato le performance riproduttive. Pertanto, la densità energetica della dieta per la bufala da latte deve essere calcolata tenendo conto della quantità di sostanza secca e di energia necessaria a garantire la produzione dell'intera mandria e non del singolo animale. La concentrazione proteica è generalmente superiore alle effettive necessità che deriverebbero da semplici calcoli matematici derivanti dal rispetto dei fabbisogni di mantenimento e produzione. L'elevata concentrazione energetica e proteica adottata nel razionamento delle bufale è necessaria, in quanto tiene conto non solo del soddisfacimento del fabbisogno produttivo, dell'accrescimento corporeo, del recupero di peso, ma perché è utile per l'effetto stimolante mediato dalle modificazioni endocrino-metaboliche indotte dalla proteina sull'attività produttiva. Vale la pena sottolineare che un leggero eccesso di proteine nel razionamento della bufala non determina gli effetti negativi osservati in altri ruminanti ed in particolare nelle vacche da latte: alcune ricerche effettuate sullo stato metabolico durante la lattazione, hanno mostrato che concentrazioni proteiche maggiori rispetto a quelle richieste dai fabbisogni dell'animale, aumentano i livelli

ematici di azoto, ma determinano un aumento della glicemia e una riduzione della insulina nel sangue. Questa particolare condizione metabolica garantisce una maggiore disponibilità di glucosio per la sintesi del lattosio a livello mammario, e di conseguenza favorisce la produzione di latte a causa di un meccanismo osmotico.

CAPITOLO 3 – INTERRELAZIONI TRA NUTRIZIONE E RIPRODUZIONE

3.1. Influenza dell'alimentazione sulle performance riproduttive

I bufali posseggono una capacità di *conversione alimentare* più efficiente rispetto a quella posseduta dai bovini (*Bos taurus*), che permette loro di produrre in condizioni alimentari che risulterebbero invece limitanti per la specie bovina (*Zicarelli, 1994*). Nonostante la buona efficienza alimentare della specie bufalina, la nutrizione può però avere una grande influenza sulla funzionalità riproduttiva: ad esempio, le bufale in condizione di bilancio energetico negativo durante il post-partum, presentano cicli ovarici con follicoli dominanti di dimensioni ridotte ed un ritardo nella ripresa dell'ovulazione (*Campanile et al., 2001a; 2001b*). Inoltre, bufale adulte sottoposte a un regime di restrizione alimentare, sopprimono il turn-over follicolare dopo 60 giorni di trattamento e presentano un declino della qualità oocitaria dopo 80 giorni (*Campanile et al., 1999*).

Nelle bufale il BCS, al momento del parto, può avere una forte influenza sull'intervallo parto-concepimento (*Hegazy et al., 1994; Baruselli et al., 2001*). Tuttavia, in uno studio condotto in luoghi siti a latitudini più alte, non si presenta alcun apparente rapporto tra condizione fisica e concepimento durante il periodo di allungamento delle ore di luce (*Campanile et al., 2006*). Essendo il bufalo una specie a giorno breve (*Zicarelli, 1994*) recenti studi indicano come il fotoperiodo possa avere una significativa influenza modulatrice sulla nutrizione in relazione all'attività riproduttiva (*Campanile et al., 2006*).

A differenza delle bufale adulte, le manze sono meno sensibili agli effetti della lunghezza del giorno sulla riproduzione (*Zicarelli, 1994*), di conseguenza, lo sviluppo

riproduttivo nelle manze e il raggiungimento della pubertà sono determinate principalmente dalla nutrizione al momento dello svezzamento (*Campanile et al., 2001b*). Questo rende la giovenca bufalina il modello preferito per studiare le interrelazioni tra alimentazione e riproduzione all'interno degli studi di specie.

3.2. Il bilancio energetico negativo (BEN) di inizio lattazione

Il periodo del puerperio nelle bovine da latte è spesso caratterizzato da stati infiammatori. Questa condizione è probabilmente il risultato del rilascio di citochine pro infiammatorie (*Grimble, 1990*), prime fra tutte l'interleuchina 6 (IL-6) e il tumor necrosis factor α (TNF- α), inducendo conseguenze che coinvolgono l'attività riproduttiva, la sintesi a livello epatico e l'anoressia. Nel fegato, le suddette citochine, stimolano la produzione delle proteine positive della fase acuta, come l'aptoglobina, e inibiscono la sintesi delle proteine negative della fase acuta, come l'albumina (*Fleck, 1989*). Inoltre inducono stress immunitario e peggiorano lo stato anoressico intorno al periodo del parto ed interferiscono anche con il rilascio di LH, che provoca disturbi dell'attività riproduttiva. Tutti questi effetti possono contribuire a una diminuzione della produzione lattea (*Bionaz et al., 2007*) e della fertilità (*Bertoni et al., 2000*). In particolare, i maggiori problemi di fertilità sono stati riscontrati nelle bovine che presentavano malattie del periparto e patologie infettive quali la mastite (*Schrack et al., 2001*). Le citochine possono esacerbare il bilancio energetico negativo (*Pryce et al., 2001*) ed aumentare il rischio di steatosi epatica, di disturbi metabolici che possono avere un effetto negativo sull'immunità dell'organismo, soprattutto nel periodo di transizione dove vi sono anche cambiamenti endocrini in atto.

L'alterazione della secrezione dell'ormone luteinizzante LH e la successiva alterazione dei cicli ovarici conduce a un allungamento del periodo interparto e quindi a un aumento dei costi indiretti da parte dell'allevatore. Già oltre 50 anni fa (*Ashida & Asahi, 1960*) si sottolineava come l'insufficienza epatica sarebbe all'origine delle turbe dell'attività ovarica e del metabolismo degli ormoni steroidei, con particolare riferimento all'inattivazione degli estrogeni. Un'eventuale alterazione della funzione riproduttiva (presenza di cisti ovariche, infiltrazione adiposa del surrene) avverrebbe proprio nella fase di lipomobilizzazione quando il metabolismo energetico nelle prime due settimane della lattazione è deficitario.

Sommer includeva la diminuita fertilità in una sindrome da lui definita “*Parturition syndrome*” e che definisce un complesso di alterazioni anatomo-funzionali durante il peri-partum. In questo periodo si ha una ridotta liberazione delle lipoproteine dal fegato che è soggetto, più o meno gravemente, all'infiltrazione lipidica. Essendo proprio le lipoproteine a fornire il colesterolo necessario per la sintesi degli ormoni steroidei del corpo luteo, al surrene e, forse ai follicoli, l'inattivazione ovarica e la formazione di cisti ovariche sarebbero dovute alla loro scarsa immissione in circolo.

Il bilancio energetico della bovina durante il periodo post parto è la principale causa della chetosi e della lipidosi epatica. Il profilo metabolico durante le prime settimane post-partum include basse concentrazioni ematiche di insulina e glucosio, e alte concentrazioni di glucagone, GH, BHBA e NEFA. Profili metabolici di questo tipo sono stati osservati in vari studi riguardanti la lipidosi epatica e stati di chetosi metabolica (*Veenhuizen et al., 1991; Drackley et al., 1992*). Alla depressione dell'assunzione di alimento nelle settimane seguenti il parto (direttamente correlata al NEB) sono stati associati bassi livelli ematici di insulina ed acetato, alti livelli di NEFA e un aumento del tasso di rimozione del glicerolo dalle cellule epatiche. In assenza di patologie metaboliche, la maggior parte dei trigliceridi (TG) viene asportata dal fegato tramite le lipoproteine a bassa densità (VLDL). Tra i maggiori fattori che possono influenzare l'insorgenza di lipidosi epatica vengono considerati la carenza di acidi grassi a lunga catena, la mancata incorporazione dei TG nelle VLDL e un difetto nel trasporto VLDL-mediato (*Gruffat et al., 1996*). Una riduzione della Apolipoproteina-B 100 (apoB), una delle principali lipoproteine incorporate nelle VLDL nel fegato, è accompagnata dall'aumento della concentrazione epatica di TG (*Gruffat et al., 1996*). L'effetto della sintesi e della degradazione dell'insulina sull'attività delle VLDL è controverso. Infatti alcuni ricercatori (*Chirieac et al., 2000*) suggeriscono un effetto negativo sulla secrezione delle VLDL in particolare dell'apoB, mentre altri hanno evidenziato un effetto positivo. È stato comunque osservato in alcuni studi che diete stimolanti la produzione di insulina migliorano la ripresa dell'attività ciclica dell'ovaio dopo il parto, anche senza influenzare significativamente il bilancio energetico (*Garnsworthy et al., 2009*).

La concentrazione plasmatica di IGF-1 è principalmente mediata dalla funzionalità del fegato, sotto stimolo del GH. In situazioni di aumentata richiesta energetica, come in caso di bilancio energetico negativo, l'asse GH-IGF è disaccoppiato nel fegato e questo è associato ad una riduzione dell'IGF-1 circolante ed ad un aumento del GH (*Thissen et al., 1994*). Il livello di IGF-1 è regolato a differenti livelli. Nella vacca da latte la riduzione nel periodo peri-parto della sintesi di IGF-1 è associata, in particolare, alla concomitante riduzione dei recettori per il GH tipo 1 nel tessuto epatico (*Le Roith et al., 2001*). È ormai da molti dimostrato che il bilancio energetico negativo è in grado di influenzare la crescita follicolare a livello dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio (*Beam and Butler, 1997; Lucy, 2000; Lucy, 2003*) essenzialmente tramite due vie:

- 1) Variazioni metabolico-ormonali, che alterano la sensibilità dell'ovaio alle gonadotropine e riducono l'entità e la pulsatilità della secrezione di LH, fondamentale per la crescita e la maturazione degli oociti (azione indiretta).
- 2) Variazione della concentrazione di estrogeni (azione diretta), dovuta ad una bassa estrogenicità dei follicoli che hanno bisogno di una fase di crescita più lunga per accrescere le loro dimensioni e stimolare così la secrezione di LH (*Sartori et al., 2004*).

Inoltre è stato riportato che durante la fase post-parto, una situazione di bilancio energetico negativo può stimolare il metabolismo estrogenico da parte delle cellule epatiche, riducendo così la concentrazione plasmatica di estrogeni in fase pre-ovulatoria (*Sangsrivong et al., 2002*). L'alterata concentrazione di estrogeni interferisce con la maturazione follicolare. Queste variazioni ormonali possono spiegare la tendenza al prolungamento della fase di crescita follicolare e al ritardo dell'ovulazione, che caratterizza spesso l'attività ovarica delle bovine ad alta produzione durante il periodo post-parto.

Come accennato in precedenza, lo stato di ipoglicemia che caratterizza il bilancio energetico negativo può influire direttamente sulla qualità degli oociti. Infatti, il glucosio presente nel fluido follicolare è di fondamentale importanza per i processi di maturazione e sviluppo dell'oocita, tramite la via metabolica dei pentoso-fosfati (*Leroy et al., 2004*). La liberazione di acidi grassi non esterificati (NEFA) e corpi

chetonici nel circolo ematico durante il NEB, può compromettere lo sviluppo follicolare. I NEFA hanno un forte effetto citotossico diretto sulle cellule dell'ovocita in quanto ad alte concentrazioni ematiche corrispondono alti livelli di NEFA nel fluido follicolare. Durante la mobilizzazione dei lipidi di riserva, si può verificare il rilascio di progesterone conservato negli adipociti, portando il progesterone plasmatico a livelli sopra-basali. Queste concentrazioni ($> 5\text{nmol/l}$) al momento della prima inseminazione post-parto possono portare ad una diminuzione del tasso di concepimento (Waldmann *et al.*, 2001).

L'utero della bovina durante il periodo post-parto è particolarmente suscettibile agli agenti patogeni e la suscettibilità all'infezione batterica sembra associata allo stato di immunosoppressione e allo stato energetico di questo periodo produttivo. I neutrofili (PMN) sono le cellule che svolgono il ruolo immunitario maggiore, come prima linea di difesa contro la colonizzazione batterica nell'utero. La funzione difensiva dei neutrofili inizia a ridursi a partire da 3-5 settimane prima del parto (con un minimo al momento del parto) e ritorna lentamente a livelli normali solo a partire da 2-4 settimane postparto. Secondo i dati raccolti in uno studio (Hammon *et al.*, 2005) esiste un'associazione tra bilancio energetico durante il periodo pre-parto e la compromissione della funzionalità dei neutrofili. L'attività dei PMN e la concentrazione plasmatica di NEFA sono correlate negativamente: questo suggerisce che le bovine in bilancio energetico negativo sono predisposte a stati di immunosoppressione post-parto. Risultati simili sono stati osservati anche in altri studi. Secondo Reist *et al.* (2003) ad una alta concentrazione di acetone nel latte si associa un aumento del rischio di insorgenza di ritenzione di placenta e metriti. In uno studio recente (Wathes *et al.*, 2009) sono stati prelevati campioni di tessuto endometriale di bovine a circa 15 giorni post-parto, allo scopo di valutare l'espressione genica e la risposta immunitaria dell'endometrio durante il NEB. Le bovine con NEB più grave risultano ancora sottoposte ad una risposta infiammatoria uterina più attiva in confronto alle bovine con bilancio energetico normale. Un bilancio energetico negativo grave impedisce una risposta immunitaria efficace all'attacco dei batteri dopo il parto, prolungando le tempistiche di guarigione dell'utero e compromettendo in seguito l'efficienza riproduttiva.

Data la ormai conosciuta influenza del BEN sul controllo metabolico-ormonale dell'efficienza riproduttiva, molti gruppi di ricerca hanno valutato l'effetto del BCS sui parametri riproduttivi, utilizzando questa scala come stima dello stato energetico della bovina durante il periodo peri-parto. La durata del periodo di anaestro post-parto è stato associata alle variazioni del BCS. In particolare sembra che la variazione di BCS dal parto alle prime settimane di lattazione possa portare a:

- 1) Ritardata ripresa dell'attività ovarica post-parto;
- 2) Riduzione della frequenza di pulsazione della secrezione di LH ipofisario;
- 3) Riduzione della risposta follicolare all'azione delle gonadotropine;
- 4) Riduzione della competenza funzionale dei follicoli.

Roche et al. (2007) hanno riportato un'associazione negativa tra la comparsa di sintomi clinici di estro prima del termine del periodo di attesa volontario (PAV) e le variazioni di body condition score dal parto al minimo livello raggiunto appena dopo il parto. In accordo con questa associazione, Wathes et al. (2007d) hanno osservato differenze statisticamente significative nel profilo metabolico plasmatico di bovine con ritardata ripresa dell'attività ovarica post-parto, dati connessi con la variazione di condizione corporea ad inizio lattazione. Secondo Diskin et al. (2003) la variazione del bilancio energetico (espresso come BCS) non influenza il numero dei follicoli o lo sviluppo follicolare durante il periodo seguente il parto, ma può influenzare l'ovulazione del primo follicolo dominante come possibile conseguenza della riduzione della competenza funzionale dei follicoli durante il bilancio energetico negativo.

3.3. Il BEN di inizio lattazione nella specie bufalina

L'inizio della lattazione nella specie bufalina è caratterizzato da un continuo modificarsi del quadro endocrino-metabolico condizionato dal rapporto tra l'energia assunta con gli alimenti e quella eliminata con la produzione di latte (*Campanile, 1997*). In considerazione degli eventi metabolici che caratterizzano questa fase fisiologica, negli animali domestici, e nei ruminanti in particolare, la curva di lattazione può essere suddivisa per grandi linee in una fase catabolica e in una anabolica. La prima inizia già alcuni giorni prima del parto e termina a seconda della specie e, nell'ambito di questa, in funzione della potenzialità produttiva dell'individuo tra gli 87 ed i 130 giorni di lattazione, epoca in cui si verifica l'innalzamento dell'insulinemia che segna il passaggio alla fase successiva. Durante la fase anabolica si assiste al ripristino delle riserve corporee da utilizzare nella successiva lattazione (*Campanile, 1997*).

Le bufale, così come le bovine, nei primi giorni di lattazione, anche se ricevono diete ben bilanciate, non riescono ad ingerire una quantità di sostanza secca (ss) necessaria a coprire i propri fabbisogni e vengono a trovarsi, così, in una condizione di iponutrizione o disoressia "fisiologica". La minore assunzione di sostanza secca può essere ricollegata a due fattori fondamentali, uno di tipo "ancestrale" e l'altro di tipo "anatomico-funzionale". Le attuali specie domestiche, appartenenti al genere ruminanti, in passato, prima della domesticazione e del confinamento in allevamenti stabulati, hanno sempre rappresentato, specialmente i soggetti più vecchi e quelli più giovani in quanto più deboli ed indifesi, le vittime preferite dei predatori. La madre per non lasciare incustodito il neonato, non in grado di coprire lunghe distanze, rimaneva nei dintorni cibandosi solo di ciò che era disponibile, in ogni caso insufficiente a coprire i fabbisogni. La produzione del latte per far sopravvivere il vitello veniva in parte realizzata ricorrendo alle riserve endogene, cui conseguiva un intenso dimagrimento. Nel corso dei secoli sono sopravvissuti quei soggetti che grazie al loro assetto endocrino metabolico erano in grado di accumulare riserve nella fase di minore produzione e di utilizzarle convenientemente all'esordio della lattazione.

Inoltre bisogna considerare, che i ruminanti ingeriscono nella fase di asciutta una quantità di sostanza secca e, quindi, di nutrienti che nella bovina da latte è pari al 50% (nella bufala oscilla tra il 55 e il 60% e ciò, unitamente al periodo di asciutta più lungo, favorisce un maggior ristoro) di quella che si registra nella fase di massima assunzione di alimenti. Successivamente, al momento de parto, il meccanismo fisico di controllo dell'assunzione di sostanza secca e l'attività secretoria delle ghiandole digestive necessitano di un periodo di adattamento per adeguarsi alle mutate necessità: l'incremento dell'energia prodotta con il latte e la minore assunzione di sostanza secca e, quindi, di energia, provoca un abbassamento temporaneo dei valori ematici di glucosio. È risaputo che la glicemia rappresenta una delle costanti emato-chimiche, dal momento che valori al di sotto della soglia limite potrebbero determinare insufficiente nutrizione alle cellule cerebrali con conseguente stato comatoso e morte del soggetto. L'organismo, pertanto, risponde a quest'emergenza innalzando i livelli di GH e abbassando quelli del T4 (ipotiroidismo temporaneo). L'ormone della crescita agisce riducendo l'attività o quanto meno la risposta del tessuto adiposo all'insulina, modificando il rapporto insulina: glucagone a favore di quest'ultimo. Ciò garantisce una diversa ripartizione del glucosio ematico (sistema nervoso centrale e mammella) e attiva la neoglucogenesi a partire da altre molecole (NEFA, gruppi carbossilici, etc.). Tale meccanismo facilita, tra l'altro, la mobilizzazione dei tessuti di deposito e delle proteine muscolari che forniscono energia e precursori necessari a mantenere i livelli ematici di glucosio entro valori sufficienti a garantire al soggetto di espletare le proprie attività fisiologiche.

La lipomobilizzazione nella bufala, responsabile dell'innalzamento dei NEFA, così come nella vacca da latte (*Bertoni & Lombardelli, 1991; Chiesa et al., 1991*), inizia nell'ultima fase della gestazione (*Campanile et al., 1995*). All'esordio della lattazione, tuttavia, la concentrazione ematica dei NEFA, pur presentando un picco a circa 20 gg dal parto che solitamente risulta il valore più elevato rispetto ad altre fasi della lattazione, è sempre al di sotto dei valori che si registrano nella bovina da latte. L'alto livello produttivo e la più bassa ingestione di sostanza secca, tipica dell'inizio della lattazione, determinano una perdita di peso corporeo che è in media di circa 1,6% nelle primipare e al 3,8% nelle pluripare (*Campanile et al., 2001a*).

Col progredire della lattazione i NEFA si abbassano e a circa 110 gg già si riscontrano i valori tipici delle prime fasi dell'asciutta (*Campanile et al., 1995*). In questa stessa epoca (110 giorni) si osserva, inoltre, un innalzamento dei livelli plasmatici di insulina, che costituisce il segnale endocrino del passaggio dalla fase catabolica a quella anabolica della curva di lattazione (*Campanile et al., 1995*). L'insulina e il glucagone presentano un andamento simile fino agli ultimi giorni di gestazione; dopo il parto il loro andamento risulta diametralmente opposto (*De Rosa et al., 2001*). I livelli di insulina presentano andamenti simili nella fase immediatamente prima del parto e poi opposti rispetto al glucagone (*De Rosa et al., 2001*). Analogamente all'insulina l'IGF-1 risulta bassa ad inizio lattazione, così come accade nella bovina da latte, verosimilmente in seguito alla carenza energetica che si registra in questo periodo.

La capacità dello stroma mammario di secernere IGF-1 (*Hauser et al., 1990*) e l'inibizione dell'apoptosi delle cellule mammarie propria di quest'ormone ad inizio lattazione, fanno ipotizzare un abbassamento dei livelli ematici e un innalzamento di quelli mammaryi utili a garantire l'attività produttiva del soggetto (*De Rosa et al., 2001*).

3.4. BEN di inizio lattazione e performance riproduttive nella specie bufalina

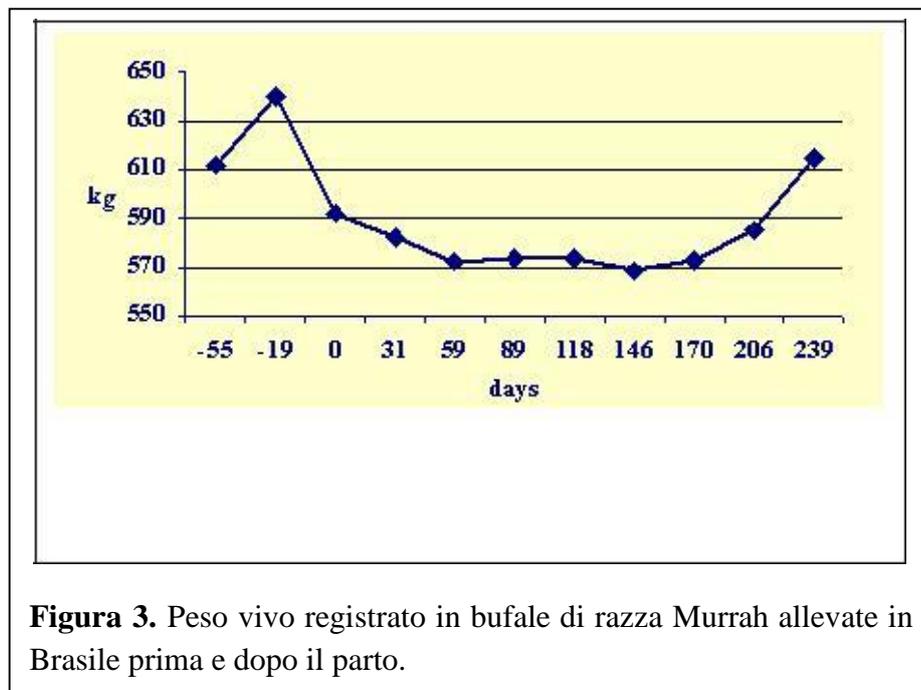
Indipendentemente dalla potenzialità produttiva degli animali, il periodo di interparto è in genere più alto ($P < 0,05$) nei soggetti di primo parto (Tabella 2)

Tabella 2. Perdita di peso corporeo (%) durante i primi 60 giorni di lattazione, coefficiente di variabilità (CV %), energia utilizzata per kg di latte ECM, in relazione alla categoria (pluripare o primipare), al livello produttivo (kg) e all'intervallo interparto (giorni).

		Perdita di peso corporeo (%)	CV (%)	UFL/kg ECM	Interparto (gg)
Pluripare					
	n.				
> 5.000 kg	13	5,6 ± 5,1	91	0,447	479
< 5.000 kg	18	2,0 ± 4,0	200	0,445	436
Totale	31	3,8 ± 5,2	137	0,446	452
Primipare					
> 5.000 kg	12	4,2 ± 4,6	110	0,436	520
< 5.000 kg	9	3,06 ± 7,6	245	0,436	476
Totale	21	0,51 ± 7,4	1187	0,436	502

È risaputo che lo stress da parto, infatti, è molto più intenso nelle primipare che nelle pluripare e che esso sembra essere responsabile del fenomeno di anaestrosi post-partum in tutte le specie domestiche. Tuttavia, in entrambe le categorie, i soggetti più produttivi mostrano un allungamento dell'intervallo interparto (circa 50 gg). Questa differenza tende a divenire statisticamente significativa ($P < 0,09$) se, all'interno del gruppo delle pluripare, i soggetti più produttivi sono confrontati con quelli meno produttivi. L'allungamento dell'intervallo interparto non è legato al BEN che si verifica nei primi 60 giorni di lattazione, ma è probabilmente dovuto alla relazione

negativa, riscontrata anche nella specie bovina, esistente tra produzione e fertilità. Infatti, in bufale che hanno mostrato una perdita di peso corporea più alta dell'8% durante i primi 60 giorni di lattazione, indipendentemente dalla produzione a 270 giorni, la media dell'intervallo interparto è stata di 452 giorni, che è più bassa di 27 giorni rispetto alle bufale che producevano più di 5.000 kg di latte ECM, anche se queste ultime perdevano soltanto il 5,6% del peso corporeo. Inoltre, in bufale di razza Murrah (Bernardes, dati non pubblicati), che avevano partorito in una condizione ottimale di stato d'ingrassamento (BCS), ma avevano perso circa il 10% del peso corporeo durante i primi 110 giorni di lattazione, a causa delle variazioni qualitative degli alimenti somministrati con la razione, l'intervallo interparto è risultato di 72 giorni e il numero di inseminazioni per concepimento è stato di 1,5 (Figura 3).



Nella specie bovina il BEN causa una riduzione dei livelli di IGF1s e di insulina nel sangue (*Gluckman et al., 1987; Lucy et al., 1992*), che rappresenta una condizione critica per lo sviluppo (*Adashi et al., 1985*) e la crescita follicolare (*Lucy et al., 1992*). Nella specie bufalina il BEN ritarda l'ovulazione e riduce la percentuale di follicoli grandi (>10 mm; *Campanile et al., 2001b*). In una prova effettuata su bufale di razza Mediterranea Italiana (*Campanile et al., 1999*) si è osservato che in soggetti sottoposti

ad Ovum Pick-up bi-settimanalmente, il BEN determina un rallentamento del turnover follicolare. Questo è dimostrato dalla riduzione dei follicoli grandi nel gruppo caratterizzato da BEN (Gruppo B) dopo 60 giorni di prova (distanza dal parto = 190 giorni), insieme alla drastica riduzione della concentrazione energetica della dieta ed alla presenza di un deficit pari a circa il 40% dei reali fabbisogni (Figura 4).

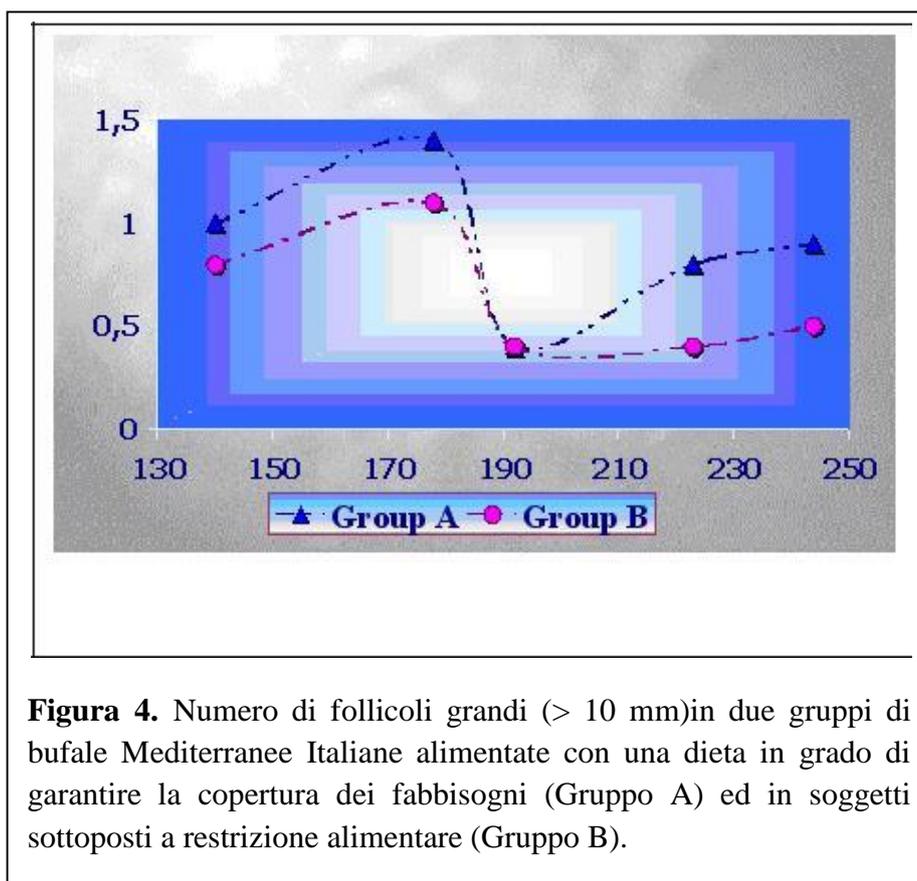


Figura 4. Numero di follicoli grandi (> 10 mm) in due gruppi di bufale Mediterranee Italiane alimentate con una dieta in grado di garantire la copertura dei fabbisogni (Gruppo A) ed in soggetti sottoposti a restrizione alimentare (Gruppo B).

In questi soggetti, alla fine della prova, quindi intorno ad 80 giorni dopo la reale restrizione alimentare (Figura 5), è stato possibile osservare una riduzione degli oociti di buona qualità (COCs di grado A+B). Gli effetti dell'iponutrizione, infatti, sono molto più evidenti sui follicoli primordiali (Britt, 1991), che necessitano di circa 110 giorni per passare dallo stadio di primordiale a quello preovulatorio (Lussier et al., 1987).

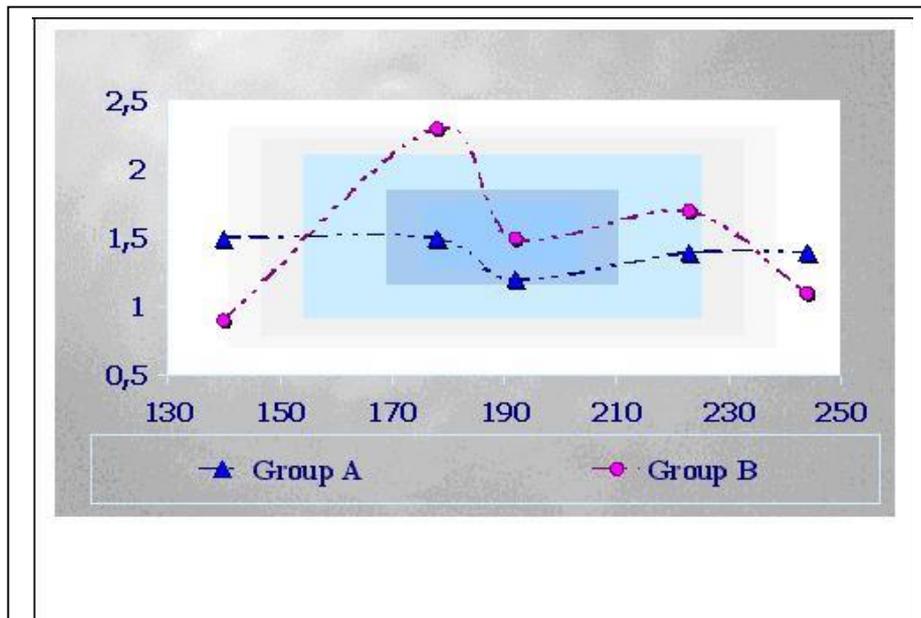


Figura 5. Numero di oociti di grado A+B recuperati in due gruppi di bufale Mediterranee Italiane alimentate con una dieta in grado di garantire la copertura dei fabbisogni (Gruppo A) ed in soggetti sottoposti a restrizione alimentare (Gruppo B).

I livelli di IGF-1, progesterone (P_4) ed estradiolo (E_2) nel fluido follicolare, non sono risultati differenti tra i gruppi ed è stato osservato soltanto un aumento della concentrazione plasmatica di E_2 nel gruppo B (29 vs. 14 pg/ml; $P < 0.05$). I livelli di IGF-1 nel liquido follicolare sono risultati significativamente correlati con quelli dell' E_2 ($r = 0.426$; $P < 0.05$). Più alti livelli di IGF-1 (70.2 vs. 57.3 ng/ml; n.s) sono stati inoltre riscontrati nel fluido follicolare quando i campioni di sangue sono stati raccolti in corrispondenza di un'effettiva deficienza energetica (dieta caratterizzata da livelli $< 0,9$ UFL/Kg di sostanza secca) (Gasparrini et al., 2002). Studi effettuati in Brasile hanno dimostrato che, aumentando il numero di capi/ettaro, la percentuale di parti durante l'anno diminuisce (Baruselli, 1993). In uno studio effettuato su bufale di razza Murrah, Kaur e Arora (1982) hanno riportato una grande riduzione nella percentuale di concepimento in soggetti sottoposti a restrizione alimentare (66,6% vs 16,6 %), rispetto a quelli per i quali la dieta andava incontro ai fabbisogni.

Un'ulteriore prova è stata effettuata su manze bufaline di razza Murrah che ricevevano due diete caratterizzate da una diversa concentrazione energetica (Gruppo H: 5,8

UFL/giorno; Gruppo L: 3,6 UFL/giorno) (Neglia et al., 2004; Campanile et al., 2010). Il gruppo a bassa concentrazione energetica (L) ha mostrato una significativa ($P < 0,05$) diminuzione del BCS a partire dalla 7th settimana di prova rispetto al gruppo alimentato con la dieta ad alta densità (H), mentre il peso corporeo è rimasto costante. Sono inoltre state osservate differenze ($P < 0,01$) per quanto riguarda il BCS (Gruppo H: 4,1; Gruppo L: 3,5) e per il peso corporeo (Gruppo H: 442 kg; Gruppo L: 407 kg) a partire dalla 7-8th settimana di prova. Riduzioni della grandezza dell'ovaio e del diametro del follicolo dominante sono state poi registrate nel gruppo L dopo 8 settimane di prova. Il diametro del follicolo dominante è risultato significativamente più basso nel Gruppo L vs. il gruppo H (13 vs. 10 mm rispettivamente; $P < 0,01$) alla fine della prova (18th – 24th settimana). Nessuna differenza è stata riscontrata tra i Gruppi H e L riguardo la media di follicoli presenti sull'ovaio e la qualità degli oociti. Un numero più elevato di oociti di buona qualità, sebbene non statisticamente significativo, è stato osservato nel gruppo H dopo più di 100 giorni dall'inizio della riduzione dei valori di BCS. I livelli di P_4 e E_2 nel fluido follicolare non sono risultati differenti tra i gruppi ed è stato osservato soltanto un aumento di IGF-1 nel Gruppo H vs. il Gruppo L (73,1 e 36,1 vs. 59,1 e 35,8 ng/ml rispettivamente; $P < 0,01$). I valori di IGF-1 sono stati riscontrati significativamente più elevati nel Gruppo H (96,8 e 29,5 vs. 81,8 e 27,7 ng/ml; $P < 0,01$) anche nel plasma, confermando i dati trovati nel fluido follicolare. In entrambi i gruppi i livelli di IGF-1 nel fluido follicolare sono stati significativamente correlati con i livelli plasmatici di E_2 ($r = 0,285$ and $0,249$ rispettivamente nei gruppi H e L; $P < 0,001$). Nel Gruppo L, i livelli di E_2 nel fluido follicolare sono stati positivamente correlati con i livelli di IGF-1 nel fluido follicolare ($r = 0,328$; $P < 0,001$), mentre nel Gruppo H non è stata riscontrata alcuna correlazione. Il BEN ha determinato una riduzione della concentrazione di IGF-1 nel sangue e nel fluido follicolare, in quanto si è avuta una diminuzione dell'attività dei recettori per il GH (Armstrong & Benoit, 1996). La funzione dei recettori per le gonadotropine ovariche è strettamente dipendente dall'IGF-1 (Spicer et al., 1993). Inoltre, è stato dimostrato che l'IGF-1 è uno dei principali fattori responsabili della stimolazione della maturazione in vitro degli oociti nella specie bufalina. È perciò possibile speculare che

il BEN nel bufalo riduca la concentrazione di IGF-1, che determina una riduzione della secrezione di gonadotropine, determinando l'anaestro.

L'aumento dei livelli di GH in pecore sottoposte a restrizione alimentare, riduce la stimolazione ovarica attraverso le gonadotropine (*Suttie et al., 1991*), al fine di favorire la sopravvivenza dei soggetti attraverso la riduzione della richiesta metabolica (*Adams et al., 1996*). La somministrazione esogena di GH nella specie bufalina, migliora la risposta alla superovulazione, aumentando il numero di soggetti responsivi al trattamento con FSH porcino, ma riduce il numero di embrioni recuperati per flushing positivo (*Zicarelli et al., 1994*). In alcuni studi effettuati sulla pecora, Davis et al. (1990) hanno osservato che la somministrazione di GH non influenza la percentuale di ovulazione.

Sastry (1988), ha riportato che nella bufala la perdita di peso corporeo durante i primi 4-5 mesi di lattazione, risulta inversamente correlata al periodo di accoppiamento ed al numero di servizi necessari per concepimento. Correlazioni negative tra la quantità media di latte giornaliera e lunghezza del periodo di accoppiamento sono state riportate da Zafar (1985); il guadagno di peso durante il periodo d'inseminazione (riguardante principalmente i soggetti meno produttivi) migliora la fertilità. Come prova di BEN, è stato riportato (*Eltohamy et al., 1994*) che soggetti che presentavano ipoattività ovarica, mostravano bassi livelli di glucosio e di colesterolo. Va sottolineato che l'abbassamento dei livelli di glucosio avviene soltanto quando ci sono alti deficit energetici, ma questo può essere registrato più facilmente quando ci sono carenze proteiche per la mancanza di gruppi carbossilici da destinare alla sintesi di glucosio. Infatti, solo il 10-15% del glucosio ematico ha origine dagli alimenti, mentre la rimanente porzione origina dalla sintesi di glucosio (*Otchere et al., 1974*).

Nei bufali un BCS ottimale al momento del parto (3,5 punti, seguendo una scala da 1 a 5) migliora l'efficienza riproduttiva (*Hegazy et al., 1994*), in seguito ad una diminuzione dell'intervallo parto-concepimento ed ad una riduzione del numero di servizi per concepimento. Baruselli et al. (1997) hanno registrato un peggioramento della fertilità in soggetti che erano troppomagri o grassi al momento del parto.

Questo è in accordo con altri autori (*Dhilon et al., 1994*), che hanno osservato in questi soggetti, una rapida ripresa dell'attività ovarica, ma un ritardato concepimento e un

aumento del numero di servizi per concepimento. Ciò dimostrerebbe che l'eccessivo accumulo di grasso potrebbe influenzare l'ambiente uterino. Così come i bufali, le bovine da latte che sono molto grasse al momento del parto, presentano una più alta incidenza di ritenzione degli invogli fetali ed atonia uterina, che ritarda l'espulsione dei loci. In accordo con quanto riportato da Hegazy et al. (1994), gli effetti della iponutrizione nel periodo immediatamente precedente al parto diminuiscono gli effetti degli alti livelli di energia all'inizio della lattazione. Inoltre, in accordo con altri autori, in una nostra prova (dati non pubblicati), valori di BCS più bassi di 6 (in una scala da 1 a 9) e più alti di 7,5, riducono la fertilità mediante inseminazione strumentale. All'inizio della lattazione, al fine di ridurre il BEN, la densità energetica della dieta deve essere aumentata, cambiando il rapporto foraggi:concentrati (F:C). Se tale obiettivo viene raggiunto aumentando la percentuale di amido, nella specie bufalina si verifica una condizione di acidosi metabolica sub-clinica. Questo determina un aumento della percentuale di endometriti, dell'intervallo parto-concepimento e del numero di soggetti vuoti (Campanile, 1997). In bufale superovulate con FSH porcino, il numero di embrioni recuperati per flushing è più basso se la densità energetica della dieta viene aumentata con una alta percentuale di amido (Di Palo et al., 1994). È perciò necessario aumentare la densità energetica della dieta con foraggi di alta qualità (grazing stage of ryegrass hay silage) invece di hay e/o con grassi rumino protetti.

Nelle bovine da latte, l'utilizzo di saponi di calcio ritarda l'attività ciclica ovarica (Sklan et al., 1991) e aumenta il numero di follicoli con diametro superiore a 15 mm, per cui si verifica un aumento degli estrogeni circolanti e mortalità embrionale (Lucy et al., 1991). Grassi alimentari rumino protetti stimolano la produzione di latte mediante l'aumento della mobilizzazione delle riserve corporee; ciò sarebbe confermato dall'aumento dei livelli di NEFA (Sklan et al., 1994). Questo fenomeno è stato osservato anche nella specie bufalina, in animali che ricevevano acidi grassi crio-cristallizzati dall'inizio della lattazione (Di Palo et al., 1997). Alcuni studi in corso dimostrano che nella bufala di razza Mediterranea Italiana l'aumento della densità energetica della dieta utilizzando grassi protetti, riduce l'intervallo parto-concepimento da 48 a 38 giorni, similmente a quanto si osserva nelle bovine da carne. Hightshoe et al. (1991) hanno riportato che l'integrazione della dieta con saponi di calcio non ha

alcun effetto sul ciclo e sulla ripresa dell'attività riproduttiva; bensì favorisce la crescita follicolare e l'aumento dei livelli ematici di P_4 e LH durante la fase luteinica, aumenta la concentrazione di acido linolenico, che consente la sintesi di $PGF_{2\alpha}$, per cui l'attività ciclica ricomincia e la percentuale di gravidanza aumenta.

PARTE

SPERIMENTALE

INTRODUZIONE

Le aziende bufaline in Italia negli ultimi anni sono andate incontro ad una profonda trasformazione: aziende di tipo estensivo e semi-estensivo, che rappresentavano la forma di allevamento più frequente fino a circa 40 anni fa, hanno lasciato il posto a forme di allevamento di tipo intensivo. Ciò ha comportato l'insorgenza di una serie di problematiche, prime fra tutte quelle di ordine metabolico, simili a quelle che si sono verificate in passato nell'allevamento bovino da latte. Sebbene la bufala non possa essere considerata una specie ad "habitus catabolico", come la bovina da latte ad alta produzione, è naturale che nel momento in cui si raggiungano determinati indirizzi produttivi, anche nella specie bufalina possano insorgere una serie di patologie, quali la chetosi, l'acidosi e la steatosi, che, sono responsabili sia di problematiche sanitarie e di benessere, che di una minore efficienza produttiva dei soggetti. Vanno inoltre sottolineate alcune peculiarità tipiche della specie, quali la lipomobilizzazione cui va incontro non solo ad inizio, ma anche a fine lattazione, al fine di rispondere ai fabbisogni di produzione e mantenere livelli di grasso elevati nel latte: tale comportamento, ad esempio, rende la bufala una specie assolutamente non comparabile alla bovina (Zicarelli, 2001).

I bufali (*Bubalus bubalis*) posseggono una capacità di conversione alimentare più efficiente rispetto a quella posseduta dai bovini (*Bos taurus*) che permette loro di produrre in condizioni alimentari che risulterebbero invece limitanti per la specie bovina (Zicarelli, 1994). Nonostante la buona efficienza alimentare della specie bufalina, la nutrizione può inoltre avere una grande influenza sulla funzione riproduttiva, ad esempio, le bufale con bilancio energetico negativo durante il post-partum, presentano cicli ovarici con follicoli dominanti di dimensioni ridotte e un ritardo nella ripresa dell'ovulazione (Campanile et al., 2001a). Inoltre, bufale adulte sottoposte a un regime di restrizione alimentare, sopprimono il turn-over follicolare dopo 60 giorni di trattamento e presentano un declino della qualità oocitaria dopo 80 giorni (Campanile et al., 1999).

Nelle bufale il BCS, al momento del parto, può avere una forte influenza sull'intervallo parto-concepimento (Hegazy et al, 1994; Baruselli et al, 2001). Tuttavia, in uno studio

condotto in luoghi siti a latitudini più alte, non si presenta alcun apparente rapporto tra condizione fisica e concepimento durante il periodo di allungamento delle ore di luce (*Campanile et al., 2006*).

In ogni caso l'origine tropicale della specie e la bassa adattabilità ai climi freddi, nonché gli elevati tenori lipidici del latte, specialmente a fine lattazione, fanno innalzare notevolmente i livelli di BHBA con notevoli ripercussioni sull'attività produttiva, riproduttiva e sulla caseificabilità del latte. Pertanto lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'influenza dello stato metabolico, effettuando analisi sul latte, sull'attività produttiva e riproduttiva della specie bufalina

Purtroppo ad oggi sono scarse le informazioni riguardo alla fisiologia della bufala, e ancora minori sono quelle disponibili nel caso di soggetti altamente produttivi e in allevamento di tipo intensivo e semi-intensivo. Come accennato in precedenza, l'Italia è da considerarsi un paese leader sia intermini di miglioramento genetico che di tecniche di allevamento in questa specie. Risulta pertanto fondamentale effettuare nuovi studi che possano incrementare la conoscenza sulla fisiologia metabolica della specie.

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della presente tesi di dottorato è stato quello di valutare:

- 1) il grado di destagionalizzazione e lo stato metabolico della popolazione bufalina sottoposta a controllo funzionale;
- 2) le modificazioni metaboliche che si verificano nel corso della lattazione e durante gli estremi stagionali;
- 3) l'applicabilità dei parametri dosati nel latte quale indice di rischio di dismetabolie;
- 4) gli effetti della produzione e di alcuni metaboliti sulla gravidanza.

MATERIALI & METODI

Disegno sperimentale

Nell'ambito del disegno sperimentale sono stati effettuati due esperimenti.

L'Esperimento 1 ha avuto come scopo principale quello di verificare la produzione di latte nonché i livelli di BHBA dell'intera popolazione bufalina sottoposta a controlli funzionali, sia nelle bufale primipare che nelle pluripare.

L'esperimento 2 è stato condotto contemporaneamente in 8 aziende bufaline commerciali localizzate nell'areale della mozzarella di bufala Campana DOP. Nell'ambito di ciascuna azienda, sono stati effettuati dei prelievi di materie prime utilizzate nella razione e si è proceduto all'analisi chimica di tutti gli alimenti. In tutti i soggetti in lattazione è stata registrata la produzione di latte a cadenza mensile e, nello stesso momento, è stato prelevato un doppio campione di latte (da ciascuna delle due mungiture giornaliere) per la determinazione dei seguenti parametri: grasso, proteina, lattosio, urea, proteina vera, caseina, CF, H index, indice crioscopico, acetone, BHBA, e la composizione in acidi grassi insaturi e saturi. Inoltre, 40 bufale a diversa distanza dal parto (5-50 gg; 50-120 gg; 120-200 gg e 200-270 gg) sono state selezionate in ciascuna azienda al fine di verificare lo stato metabolico e le relazioni esistenti tra i parametri ematici e la loro corrispondenza nel latte. Questi soggetti sono stati, pertanto, sottoposti a prelievi di sangue a cadenza bimestrale ed in corrispondenza con i controlli funzionali, per analizzare il profilo metabolico (vd. in seguito).

Durante l'intero periodo di osservazione sono stati effettuati in totale 3 prelievi di latte di massa (risalenti alla mungitura della sera e della mattina) provenienti dalle seguenti aziende: AV, D, AM, E e DV, che sono stati sottoposti sia ad analisi chimica che a prova di resa alla caseificazione.

Infine, in ciascuna delle aziende coinvolte, è stato valutato l'effetto dello stato metabolico sulla sfera riproduttiva, in particolare sulla competenza allo sviluppo degli oociti e sullo sviluppo embrionale. Pertanto, un numero rappresentativo di soggetti per

azienda è stato sottoposto a sincronizzazione dell'ovulazione e inseminazione strumentale.

ESPERIMENTO 1.

La presente prova è stata svolta in collaborazione con il servizio tecnico dell'Associazione Italiana Allevatori (AIA) ed ha previsto la raccolta e l'elaborazione dei dati produttivi e dei livelli di BHBA registrati nel 2014 su tutta la popolazione italiana sottoposta a controllo funzionale e per un totale di circa 20.000 campioni.

ESPERIMENTO 2.

1. Aziende

La prova è stata effettuata in 8 aziende commerciali localizzate nell'area di produzione della mozzarella di bufala Campana DOP e caratterizzanti l'allevamento bufalino, con tipologia di management e produzioni che bene rispecchiano la realtà dell'areale. Inoltre, al fine di verificare gli effetti delle condizioni climatiche sullo stato metabolico dei soggetti, sono state prese in considerazione sia aziende localizzate in pianura che in zone pedemontane. In particolare:

- ✓ Azienda Agricola Volturno (AV): in cui sono mantenute a stabulazione libera circa 300 bufale adulte. L'azienda è localizzata a Baia e Latina (CE) e quindi in ambiente pedemontano;
- ✓ Azienda Letizia (L): in cui sono mantenute a stabulazione libera circa 600 bufale adulte. L'azienda è localizzata a Pietramelara (CE) e quindi in ambiente pedemontano.
- ✓ Azienda Desideri (D): in cui sono mantenute a stabulazione libera circa 350 bufale adulte. L'azienda è localizzata a Dragoni (CE) e quindi in ambiente pedemontano.
- ✓ Azienda Agricola Meridionale (AM), in cui sono mantenute a stabulazione libera circa 400 bufale adulte. L'azienda è localizzata a Alife (CE) e quindi in ambiente pedemontano.
- ✓ Azienda Errichiello (E), in cui sono mantenute a stabulazione libera circa 350 bufale adulte. L'azienda è localizzata a Acerra (NA) e quindi in pianura.
- ✓ Azienda Di Vuolo (DV), in cui sono mantenute a stabulazione libera circa 250 bufale adulte. L'azienda è localizzata a Canello ed Arnone (CE) e quindi in pianura.

- ✓ Azienda La Teramana (T) in cui sono mantenute a stabulazione libera circa 1500 bufale adulte. L'azienda è localizzata a Cerignola (FG) e quindi in pianura.
- ✓ Azienda Casabianca (CB) in cui sono mantenute a stabulazione libera circa 450 bufale adulte. L'azienda è localizzata a Fondi (LT) e quindi in pianura.

In tutte e tre le aziende veniva applicata la tecnica di destagionalizzazione dell'attività riproduttiva (*Zicarelli, 1997*), per cui i parti, sia delle bufale primipare che delle pluripare, erano concentrati da fine Novembre ad inizio Agosto. Inoltre, tutti i soggetti delle aziende erano iscritti al Libro Genealogico della specie bufalina e, pertanto, sottoposti mensilmente a controlli funzionali da parte dell'Associazione Italiana Allevatori. All'interno di ciascuna azienda le bufale erano mantenute a stabulazione libera in paddocks cementati, in cui ciascuna bufala aveva a disposizione almeno 15 m² di spazio e un fronte mangiatoia di circa 1 metro. Le razioni giornaliere venivano somministrate agli animali con la tecnica unifeed e presentavano caratteristiche nutrizionali sulla sostanza secca simili (proteine grezze 15%, NDF 40%, NSC 31%, UFL/kg 0,90). Tutte le aziende prese in considerazione nel presente studio presentavano un management ottimale. In particolare, era monitorato sia l'aspetto alimentare, con razioni differenti nelle fasi di asciutta e lattazione, sia quello riproduttivo, mediante ripetute visite ginecologiche almeno una volta ogni 15 giorni.

2. Analisi degli alimenti

Ad inizio prova in ciascuna azienda sono state prelevate le materie prime somministrate agli animali per valutare la composizione chimica nutrizionale della dieta e risalire alla composizione chimico- nutrizionale della razione durante i vari mesi della prova.

Per la determinazione della composizione chimico-nutrizionale si sono adottate le metodiche ufficiali dell'AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) seguendo gli schemi Weende e Van Soest. Nello specifico ogni singolo alimento è stato macinato (granulometria 1 mm) e successivamente sottoposto all'analisi della composizione chimica. Su questi campioni è stata effettuata un'analisi chimica standard, al fine di verificare:

- ✓ il contenuto di sostanza secca (SS): mediante essiccazione in stufa a 103°C;
- ✓ il contenuto in ceneri, mediante incenerimento a 550°C per 5 ore della sostanza secca;
- ✓ il contenuto in Lipidi Grezzi/ Estratte Etereo (LG/EE), mediante estrattore automatico Soxhlet;
- ✓ il contenuto in proteina grezza (PG), effettuato tramite metodica Kjeldhal (Digestione/Mineralizzazione, Distillazione e Titolazione). Il metodo Kjeldhal si basa sull'ossidazione della materia organica con acido solforico e sulla trasformazione dell'azoto proteico in solfato ammonico. In un pallone Kjeldhal da 800 ml sono stati posti 5 gr di latte ben mescolati insieme a 15-18 gr di solfato di potassio, 0,3-0,5 gr di solfato di rame e 25 ml di acido solforico concentrato. Il pallone viene riscaldato a fiamma bassa fino a quando il liquido contenuto cessa di schiumeggiare; l'operazione procede a fiamma più forte in modo che il contenuto bolla vivamente per altri 20 minuti dopo la chiarificazione della soluzione. Al contenuto del pallone, dopo raffreddamento, sono stati addizionati 300 ml di acqua cui vengono aggiunti 25 ml di HCL 0,1-N in beuta da 300 ml e 3-5 gocce di un indicatore misto (ottenuto sciogliendo 1,25 gr di rosso di metile e 0,825 gr di blu di metilene in 1 litro di alcool etilico

a 90). Sono quindi addizionati 100 ml di una soluzione di NaOH, cui è stato aggiunto qualche pezzetto di zinco granulare. Il pallone viene poi collegato al distillatore e riscaldato fino all'ebollizione, mantenendo un movimento rotatorio. Sono quindi lasciati distillare 200 cc di liquido e si titola l'eccesso di HCL con NaOH 0,1-N: l'indicatore vira dal color porpora-violaceo al verde. La percentuale di proteine totali presente nel latte in esame si deduce dal numero di equivalenti di azoto corrispondenti all'ammoniaca sviluppata.

- ✓ il contenuto in fibra neutro detersa (NDF) e fibra acido detersa (ADF), effettuati entrambi mediante apparecchiatura Fibertec;
- ✓ Il contenuto in lignina acido detersa (ADL) mediante immersione in acido solforico al 72%.
- ✓ Il contenuto in amido: in tal caso è stata necessaria un'ulteriore macinazione (granulometria 0,5 mm). Tale analisi è avvenuta tramite determinazione polarimetrica dopo una previa idrolisi acida a caldo del campione e successivamente chiarificata con due soluzioni chiarificanti che ne hanno permesso il filtraggio e la successiva lettura al polarimetro.

Infine, per quanto concerne l'energia apportata dalla dieta, in termini di UFL (1 UFL = 1700 Kcal), questa è stata calcolata utilizzando le equazioni dell'INRA.

L'ingestione di sostanza secca è stata stimata con la seguente formula:

$$\text{ingestione (kg) di s.s.} = 91 \text{ g} \times \text{kg P}^{0,75} + 0,270 \text{ g} \times \text{kg ECM}.$$

Dal momento che si conosceva la composizione chimica della s.s. veniva stimata anche l'assunzione di UFL e le proteine grezze (PG) con le seguenti formule:

$$\text{UFL assunte} = \text{kg di s.s.} \times \text{UFL/kg s.s.};$$

$$\text{PG assunte} = \text{kg di s.s.} \times \text{PG/kg s.s..}$$

Le differenze tra l'energia e le proteine ingerite e quelle necessarie alla copertura dei fabbisogni vengono riportati nelle seguenti formule:

$$\Delta\text{UFL} = \text{UFL ingerite} - [(1.4 + 0.6 \times 100 \text{ kg PV}) \times 1.1 + 0.44 \text{ UFL} \times \text{kg ECM}].$$

$$\Delta\text{PG} = \text{g PG ingerite} - (80 \text{ g PG} \times 100 \text{ kg PV} + 2.7 \text{ g PG} \times \text{g proteina del latte prodotta}).$$

3. Analisi del latte e del sangue

Mensilmente è stata registrata la produzione di latte giornaliera di ogni bufala in lattazione allevata nelle aziende selezionate. Ciascun campione è stato sottoposto a determinazione (mediante Milkoscan) dei seguenti parametri: grasso, proteina, lattosio, urea, proteina vera, caseina, CF, H index, indice crioscopico, acetone, BHB, e la composizione in acidi grassi insaturi e saturi.

Inoltre, in tre diversi periodi dell'anno sono stati effettuati prelievi di latte da massa da 5 delle 8 aziende coinvolte nello studio. Su tali campioni è stata determinata la composizione chimica (sempre mediante Milkoscan), il pH e l'acidità titolabile ed è infine stata effettuata una prova di resa alla caseificazione. Tale determinazione è stata effettuata riscaldando a 38°C 1 kg di latte con l'aggiunta di un caglio sintetico e lasciato riposare per 30 minuti. Al termine dei 30 minuti si è provveduto alla rottura della cagliata, pressatura della stessa e pesata del residuo ottenuto.

Al fine di verificare lo stato metabolico e le relazioni esistenti tra i parametri ematici e la loro corrispondenza nel latte si è provveduto a selezionare 40 animali per ciascuna azienda a diverse distanze dal parto. In particolare, sono stati suddivisi gli animali in 4 gruppi, che rappresentano momenti critici dell'andamento metabolico (5-50 gg; 50-120 gg; 120-200 gg e 200-270 gg). Su ciascun soggetto mensilmente è stato anche valutato il Body Condition Score (BCS), utilizzando una scala da 1 a 9 (*Wagner et al., 1988*), modificata per la specie bufalina. In concomitanza con i controlli funzionali sono stati raccolti con cadenza bimensile campioni di sangue per la determinazione di urea, BHBA, ALT, ASP, γ GT, BID, NEFA, BILT, colesterolo, trigliceridi, glucosio, proteine totali e quadro elettroforetico.

4. Influenza dello stato metabolico sull'attività riproduttiva

Allo scopo di valutare l'effetto dello stato metabolico sulla sfera riproduttiva, in particolare sulla competenza allo sviluppo degli oociti e sullo sviluppo embrionale, un numero rappresentativo di soggetti per azienda è stato sottoposto a sincronizzazione dell'ovulazione e inseminazione strumentale a tempo fisso. Per l'espletamento del progetto sono state eseguite un totale di 1621 inseminazioni nel periodo Dicembre 2014 e Giugno 2015 nelle 8 aziende selezionate. L'inseminazione è stata effettuata utilizzando il programma di sincronizzazione Ovsynch-TAI (*Pursley et al., 1995*), sviluppata nella specie bovina e precedentemente applicata con successo anche in quella bufalina (*Neglia et al., 2003*). Brevemente, esso consiste nella somministrazione di 50 µg di GnRH agonista (Lecirelina, Ovucron[®], Zoetis, Italia) al giorno 0, 375 µg di PGF_{2α} (Dynolitic[®], Zoetis, Italia) al giorno 7 e 50 µg di GnRH (Lecirelina, Ovucron[®], Zoetis, Italia) al giorno 9. Il vantaggio offerto da questo programma di sincronizzazione è che consente l'inseminazione a tempo fisso, a prescindere dal rilevamento del calore, per cui a 16 ore dall'ultima somministrazione di GnRH gli animali sono stati inseminati con seme di torelli in prova di progenie, precedentemente testati per valutarne la capacità fecondante. A causa della relativa bassa intensità di manifestazioni estrali nella specie bufalina i soggetti sono stati sottoposti ad esplorazione rettale immediatamente prima dell'inseminazione strumentale per valutarne lo stato di estro (presenza di un follicolo superiore ad 1 cm ed utero tonico, in presenza o assenza scolo mucoso vaginale). Soltanto i soggetti con queste caratteristiche sono stati sottoposti ad IS. La diagnosi di gravidanza è stata effettuata a 40 giorni post-inseminazione, utilizzando un apparecchio portatile Sonoace Pico (Medison) con sonda lineare da 10 MHz appositamente adattato per l'esame transrettale in grossi animali.. In tutti i soggetti gravidi è stata valutata la presenza di una camera gestazionale di adeguate dimensioni e attività cardiaca fetale.

5. Analisi statistica

Le differenze tra i parametri esaminati nel latte e nel sangue è stata effettuata mediante il test dell'Analisi della Varianza (ANOVA; SAS-STAT, 2000), considerando come variabili la distanza dal parto, le stagioni e l'azienda e le relative interazioni.

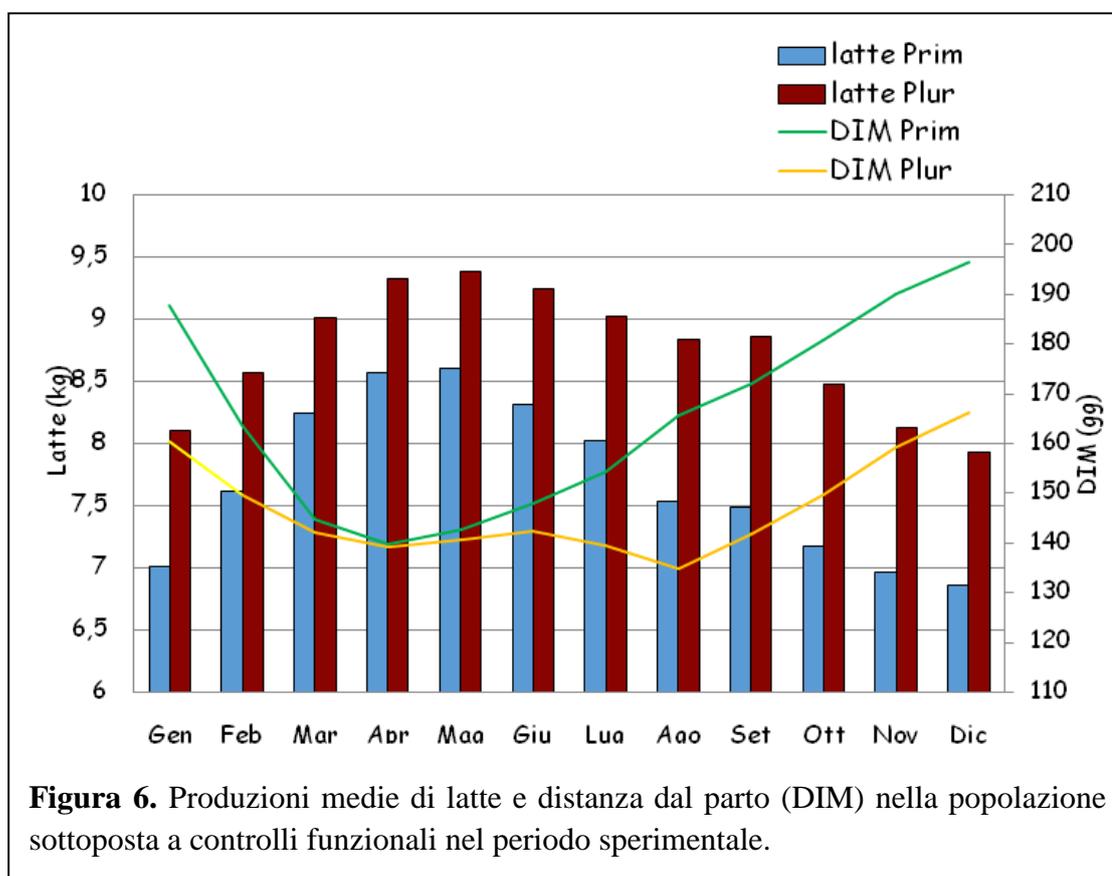
Per verificare le relazioni tra i diversi parametri analizzati sia nel latte che nel sangue sono state effettuate le analisi di correlazione (SAS-STAT, 2000). In particolare, al fine di verificare le relazioni tra l'acetone, il BHBA e le cellule somatiche del latte con i tutti i parametri dosati nel latte e nel sangue e con il Δ UFL e il Δ PG è stata utilizzata la regressione multipla lineare (SAS-STAT, 2000).

Il confronto dei dati in percentuale è stato effettuato utilizzando il test del Chi-quadro.

RISULTATI & DISCUSSIONE

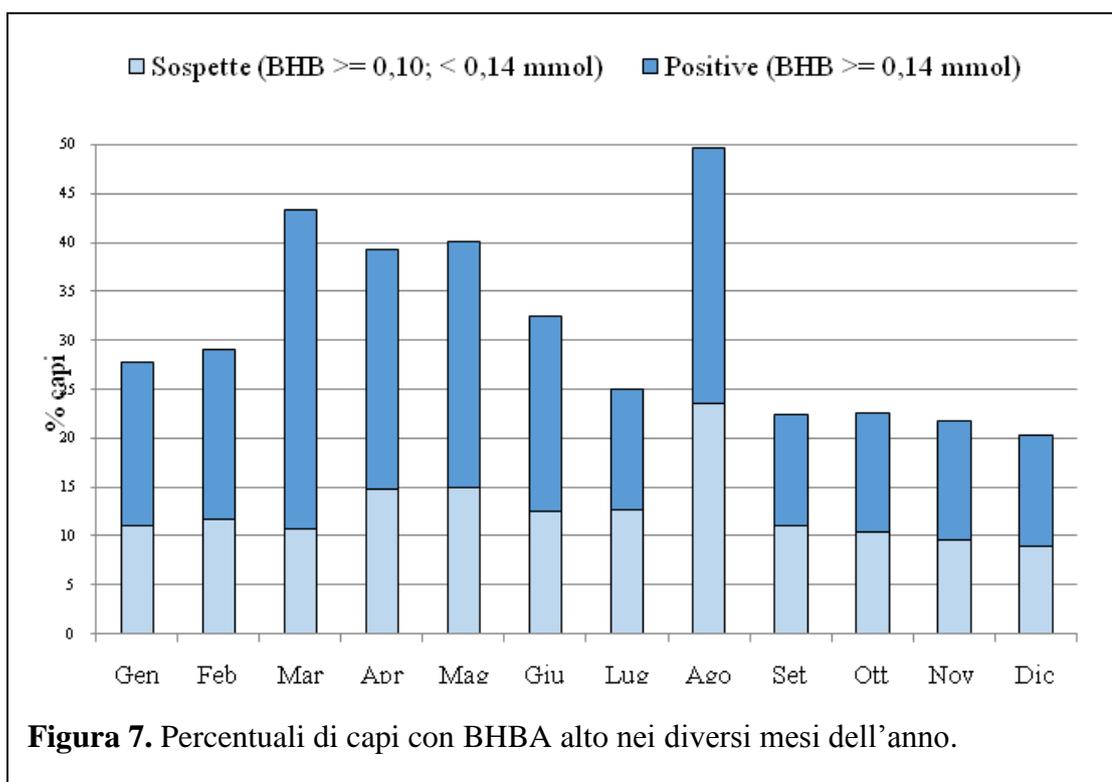
ESPERIMENTO 1.

Dall'elaborazione dei dati della popolazione bufalina sottoposta a controlli funzionali nel periodo sperimentale emerge (Figura 6) che la maggiore produzione di latte si verifica in corrispondenza con la minore distanza dal parto, e cioè tra Marzo e Settembre per le pluripare e tra Marzo e Luglio per le primipare. Questo pattern sta ad indicare che mentre per le primipare l'inizio dei parti e l'innalzamento della produzione di latte con le esigenze di mercato risultano alquanto sincrone, nelle pluripare, notoriamente più stagionali, gli allevatori per poter recuperare in fertilità ritardano l'epoca di interruzione della promiscuità sessuale con una coda di parti in tarda estate che è responsabile di una produzione di latte superiore alle richieste di mercato nel periodo autunno-inverno.

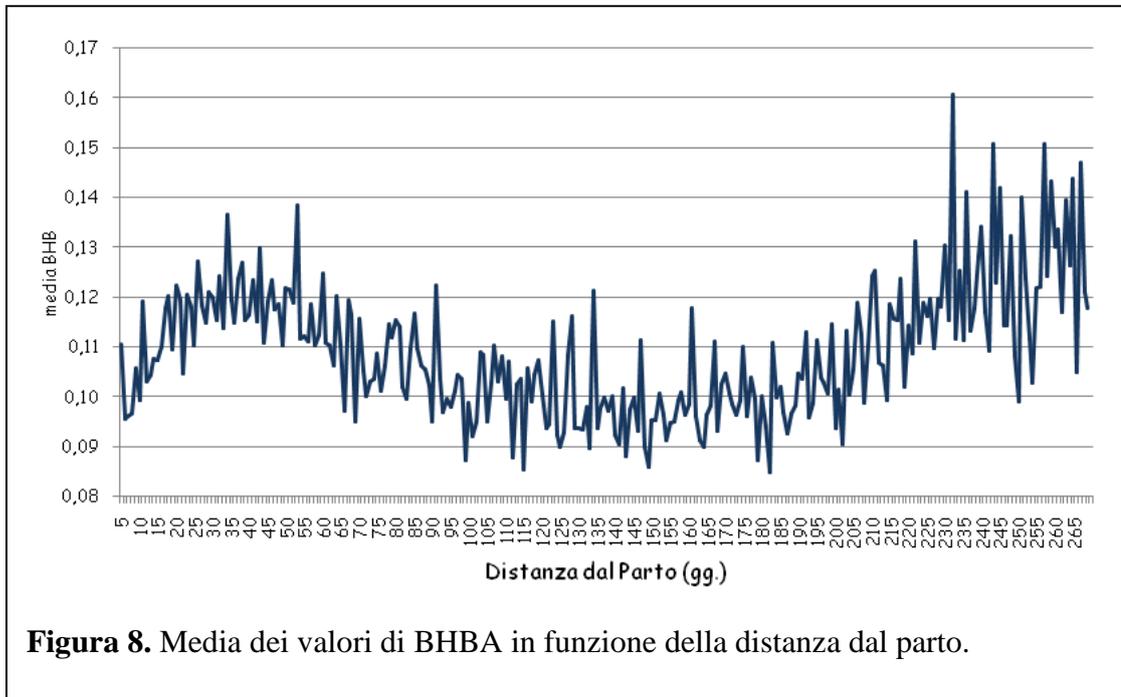


Infatti dall'analisi della Figura 6 si evidenzia chiaramente una netta caduta della produzione di latte nelle primipare già a partire da Agosto Settembre, mentre nelle pluripare la riduzione del latte prodotto risulta meno drastica. Dalla Figura 6 si osserva, inoltre, anche che le primipare producono circa il 10% in meno delle pluripare.

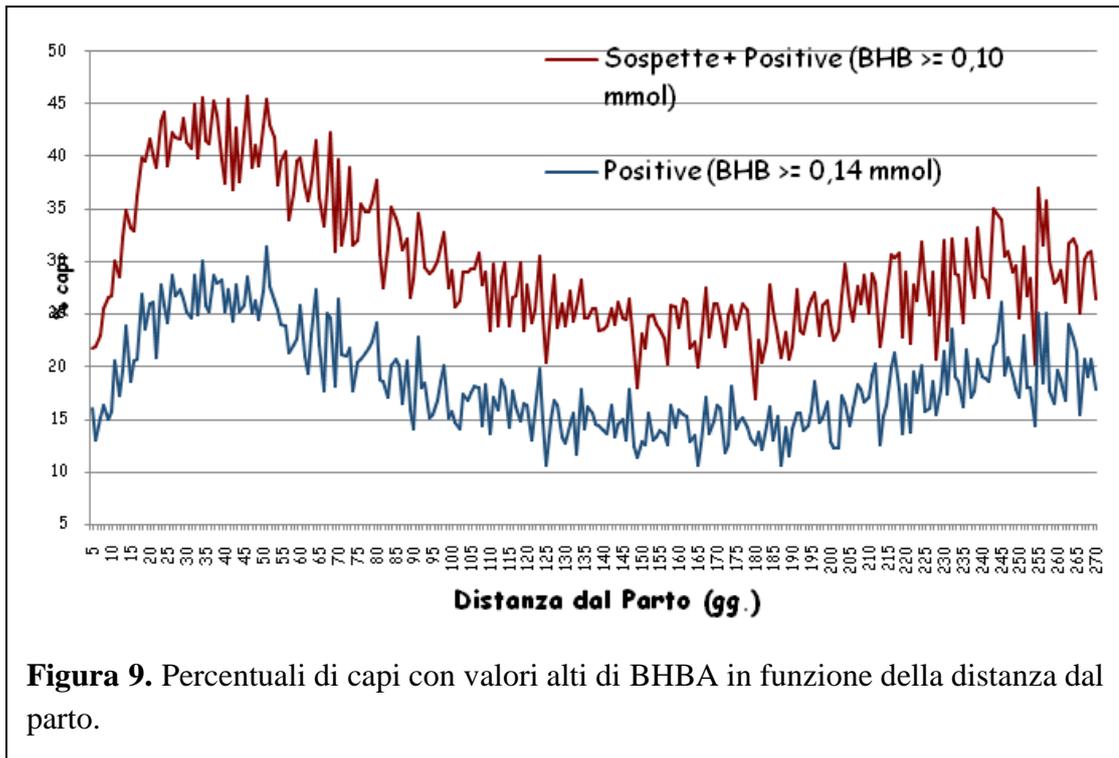
Per avere un'idea della diversa incidenza di dismetabolie, in particolare di chetosi nel corso dell'anno, è stata valutata la variazione dei valori medi di BHBA nel latte e la distribuzione dei soggetti che hanno mostrato valori elevati di BHBA. In particolare, sulla base della correlazione evidenziata tra i livelli di BHBA nel sangue e quelli riscontrati nel latte (di cui si riporta in seguito) i soggetti sono stati suddivisi in funzione dei valori di BHBA nel latte come: sospetti ($0.10 < \text{BHBA} < 0.14$ mmol) e positivi (con $\text{BHBA} \geq 0.14$ mmol). Dalla Figura 7, in cui sono riportate le percentuali di capi con valori di BHBA alto, è possibile osservare che circa il 10% dei soggetti mostra livelli sospetti e ben il 20% livelli positivi, ovvero indicativi di chetosi conclamata.



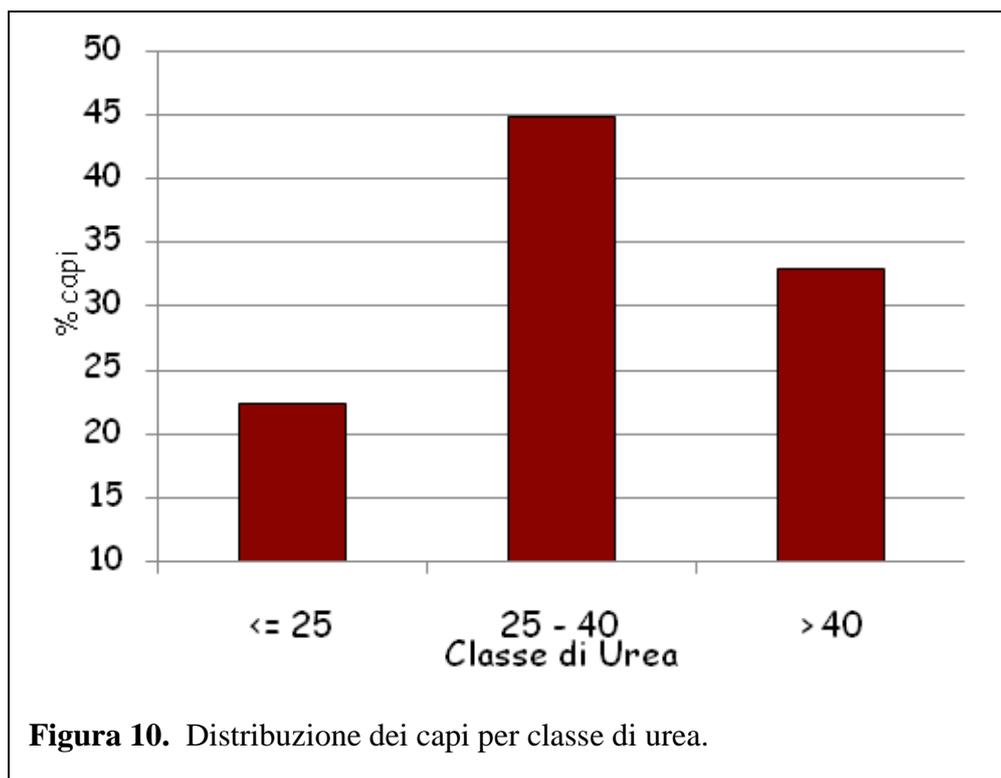
La percentuale di capi con BHBA alto aumenta proprio nei mesi corrispondenti al picco dei parti e d'altra parte ciò è meglio evidenziato nella Figura 8, in cui sono riportate le medie di BHBA in funzione della distanza dal parto.



È evidente che anche nella bufala, così come nella bovina, si osserva un aumento dei valori di BHB nella fase iniziale della lattazione dopodiché si assiste ad una normalizzazione per aumentare nuovamente nella fase finale della lattazione, quando l'animale va incontro ad uno sforzo energetico per mantenere i livelli alti di grasso tipici della specie a fine lattazione. Anche le percentuali dei capi a rischio e con chetosi conclamata (appunto sospetti e positivi) hanno seguito lo stesso pattern in funzione della distanza dal parto, con valori più alti ad inizio e fine lattazione (Figura 9).



Un altro dato interessante è emerso dall'analisi dei dati inerenti i valori di urea registrati nel latte. Infatti, come mostrato nella Figura 10, in cui sono riportate le distribuzioni dei capi per tre classi create in funzione dei range di urea nel latte (≤ 25 , $25-40$ e ≥ 40 mg/100 mL) circa il 50% dei soggetti sottoposti a controllo funzionale hanno mostrato valori di urea al di sotto o al di sopra del range fisiologico, indicando che esiste una problematica del management alimentare che influenza a sua volta il benessere degli animali.



La valutazione della concentrazione di urea nel latte rappresenta un indice di valutazione della nutrizione azotata che, inserito all'interno dei controlli funzionali, consentirebbe di evidenziare tempestivamente un possibile problema aziendale, da valutare con indagini più approfondite e correggere. È noto che il fattore principale che influenza la concentrazione di urea nel sangue e, quindi, nel latte è quello alimentare, ed in particolare l'apporto di proteine ed energia della razione. Tuttavia, i valori di urea possono essere anche influenzati dalla fase di lattazione, dalla stagione, in particolare dalle temperature elevate e da varie forme di stress, come stress di tipo fisico, psicologico, da malattie subcliniche o infiammazioni ecc.

ESPERIMENTO 2.

1. Relazioni tra stato metabolico e parametri del latte

L'analisi statistica dei dati ha fatto rilevare un'interazione significativa ($P < 0,01$) tra le stagioni ma non tra le aziende. In conseguenza di ciò i risultati saranno commentati indipendentemente dall'azienda e dalla stagione e successivamente tra le stagioni. Dall'elaborazione dei dati relativi al profilo metabolico dei soggetti sottoposti a prelievo di sangue è emerso che l'esordio della lattazione nella specie bufalina è caratterizzato da una lipomobilizzazione causata dalla minore assunzione di sostanza secca tipica di questa fase fisiologica della specie. I livelli di urea, infatti, risultano significativamente più bassi (Tabella 3) nei soggetti prelevati nei primi 50 giorni di lattazione e ciò a testimonianza della minore assunzione di proteine con la dieta che risulta condizionata dai quantitativi di sostanza secca ingerita.

Gli elevati livelli di urea risultano fisiologici e non conseguenza di turnover muscolare e/o danno renale, in quanto la creatinemia risulta immo modificata nel corso della lattazione e nei range fisiologici della specie (Tabella 3). Non sono emerse differenze degne di rilievo circa i parametri metabolici indice di attività epatica (Tabella 3) tranne che per l'ALT che risulta significativamente più elevata, ma sempre entro i range fisiologici, durante la fase di maggiore ingestione di sostanza secca e di maggiore attività metabolica del fegato.

Tabella 3. Parametri ematici nelle bufale a diversa distanza dal parto (DIP). I valori sono riportati come media \pm errore standard.

DIP	Urea	Creatinina	ALT	AST	γ GT	BID	BILT
< 50	48,4 \pm 1,1 ^{Aa}	1,7 \pm 0,04 ^a	121,5 \pm 2,9 ^A	152,4 \pm 2,7 ^a	19,9 \pm 0,7	0,14 \pm 0,03	0,46 \pm 0,02
50-120	56,2 \pm 1,2 ^B	1,6 \pm 0,04 ^A	138,8 \pm 2,3 ^B	156,6 \pm 2,6 ^A	26,1 \pm 0,8	0,32 \pm 0,16	0,47 \pm 0,02
120-200	56,8 \pm 1,2 ^B	1,7 \pm 0,04	133,7 \pm 2,1 ^{Ba}	150,7 \pm 2,6	26,7 \pm 0,6	0,21 \pm 0,15	0,47 \pm 0,02
200-270	54,9 \pm 1,1 ^{ABb}	1,8 \pm 0,05 ^{Bb}	124,4 \pm 2,2 ^{ACb}	141,2 \pm 2,4 ^{Bb}	24,9 0,9	0,39 \pm 0,23	0,52 \pm 0,03

Valori nella stessa colonna con lettere differenti, sono significativamente differenti (^{a,b} P<0,05; ^{A,B} P<0,01).

L'aumento produttivo, tipico dell'inizio della lattazione, e la minore energia disponibile e di derivazione dalla dieta ha causato nei soggetti in prova una maggiore mobilizzazione dei tessuti di deposito testimoniata da livelli più alti di NEFA e più bassi di colesterolo e trigliceridi (Tabella 4). È interessante notare che nella nostra casistica relative a stalle ad elevato livello manageriale e con produzioni medie di circa 2.800 kg per lattazione, a differenza di quanto osservato nell'Esperimento 1 (media 2.200 kg), non sono emerse differenze significative dei livelli di BHBA nel sangue anche se i livelli basali si attestano risultano medio-alti. Ciò è spiegabile al modificarsi del metabolismo degli animali che pur incrementando il loro potenziale genetico condizionano la produzione all'energia assunta con la dieta. Questa caratteristica porrà grossi interrogativi in futuro in quanto la minore capacità di ricorrere alle riserve endogene in questa specie rappresenterà un fattore limitante la produzione ma nel contempo dovrebbe ridurre l'effetto diluizione, tipico della vacca da latte, che sta alla base del peggioramento qualitativo del latte.

L'entità della lipomobilizzazione nella specie bufalina risulta essere comunque lieve rispetto a quanto registrato in bibliografia per la specie bovina e ciò è evidenziato dai livelli di BHBA che non si modificano, almeno nella nostra casistica, nel corso della lattazione. Successivamente, l'incremento di nutrienti con la dieta e la loro trasformazione metabolica in componenti del latte causa un maggiore lavoro epatico così come dimostrato dall'innalzarsi delle transaminasi (Tabella 3). Infatti con il passaggio dalla fase catabolica della curva di lattazione alla fase anabolica, sancita dall'innalzarsi dell'insulinemia e che nella bufala avviene a circa 87 giorni di lattazione, i livelli di colesterolo si innalzano al fine di trasportare i trigliceridi a livello del tessuto adiposo. L'aumento del glucosio ematico registrato a fine lattazione può essere imputabile alla maggiore ingestione di alimenti; infatti essendo la bufala un animale "non da latte" gli allevatori nella fase finale della lattazione sovralimentano gli animali per aumentare le produzioni, la persistenza della lattazione stessa e la qualità del latte.

Tabella 4. Parametri ematici nelle bufale a diversa distanza dal parto (DIP). I valori sono riportati come media \pm errore standard.

DIP	NEFA	BHB	Colesterolo	Trigliceridi	Glucosio	Prot tot
< 50	0,19 \pm 0,01 ^A	0,45 \pm 0,01	86,3 \pm 3,1 ^A	12,2 \pm 0,6 ^A	52,5 \pm 1,2 ^A	7,2 \pm 0,07
50-120	0,16 \pm 0,01	0,45 \pm 0,01	132,2 \pm 2,9 ^{Ba}	15,0 \pm 0,7 ^{AB}	52,9 \pm 1,2 ^a	7,0 \pm 0,06
120-200	0,14 \pm 0,01 ^B	0,46 \pm 0,01	135,4 \pm 3,5 ^B	16,6 \pm 0,8 ^{Ba}	53,8 \pm 1,2 ^a	7,0 \pm 0,08
200-270	0,18 \pm 0,01	0,44 \pm 0,01	116,7 \pm 2,7 ^{Cb}	20,0 \pm 1,4 ^{Cb}	57,8 \pm 1,3 ^{Bb}	7,1 \pm 0,06

Valori nella stessa colonna con lettere differenti, sono significativamente differenti (^{a,b}, P<0,05; ^{A,B}, P<0,01).

Per quanto riguarda, invece, i parametri del latte, (Tabelle 5-7), le percentuali di proteine totali del latte risultano alte ad inizio lattazione per poi ridursi ($P < 0.01$) tra i 50 e 120 giorni e risalire successivamente a partire dai 120 giorni. Il suddetto andamento è spiegabile in quanto parte delle proteine di inizio lattazione sono rappresentate dalle siero proteine. Successivamente, così come è accaduto anche per il grasso in cui il tenore è aumentato significativamente a partire dal 120° giorno dal parto, l'effetto concentrazione legato alla riduzione della galattopoiesi giustifica l'aumento qualitativo del latte.

La produzione di latte, ovviamente, ha rappresentato il principale fattore condizionante i kg di ECM che sono risultati simili fino ai 120 giorni di lattazione e minori successivamente. Tuttavia, va sottolineato come, mentre il soddisfacimento dei fabbisogni proteici, durante l'intera fase di lattazione, sia stato assicurato pienamente (Tabella 6), l'energia assunta è risultata inferiore a quella richiesta nelle fasi iniziali della lattazione e ciò spiegherebbe l'innalzamento dei NEFA (Tabella 6) e del BHBA nel latte (Tabella 5).

Nella nostra casistica di soggetti ad elevata produzione (2800 kg/lattazione) durante le fasi iniziali della lattazione perdono circa 116 UFL che dovrebbero corrispondere ad una perdita di peso vivo pari a 25,8 kg per poi recuperare il peso nella fase anabolica della curva di lattazione. Infatti la maggiore ingestione di UFL pari a circa 99 UFL giustifica un incremento di peso vivo di 22 kg.

Tabella 5. Parametri del latte registrati nelle 4 categorie individuate in funzione della distanza dal parto, distanza dal parto calcolata (DIP) nei soggetti campionati, numero di lattazioni (Ordine), conta delle cellule somatiche (CS), body condition score (BCS), urea, acetone e betaidrossibutirrato (BHBA). I valori sono riportati come media \pm errore standard).

Gruppo (gg)	DIP	Ordine	CS	BCS	Urea	Acetone	BHBA
< 50	24,9 \pm 1,1 ^A	3,1 \pm 0,15	168,3 \pm 27,8 ^A	7,2 \pm 0,09	29,2 \pm 0,7 ^A	0,28 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01 ^a
50-120	79,3 \pm 1,6 ^B	3,1 \pm 0,17	328,6 \pm 101,9 ^a	7,2 \pm 0,03	31,4 \pm 0,8 ^A	0,31 \pm 0,02	0,15 \pm 0,01 ^b
120-200	162,7 \pm 1,87 ^C	2,8 \pm 0,15	286,3 \pm 37,0	7,3 \pm 0,03	30,4 \pm 0,9	0,26 \pm 0,02	0,12 \pm 0,17
200-270	233,8 \pm 1,93 ^C	2,8 \pm 0,17	425,6 \pm 1,12 ^{Bb}	7,4 \pm 0,05	27,3 \pm 1,1 ^B	0,34 \pm 0,03	0,13 \pm 0,01

Valori nella stessa colonna con lettere differenti, sono significativamente differenti (^{a,b} P<0,05; ^{A,B,C} P<0,01).

Tabella 6. Parametri del latte registrati nelle 4 categorie individuate in funzione della distanza dal parto. Sono anche riportati i dati riguardanti l'ingestione di sostanza secca (DMI), latte corretto (ECM) e la differenza in termini di proteine (PG) e energia (UFL) ingerite e utilizzate. I valori sono riportati come media \pm errore standard).

Gruppo	Latte	Lattosio	Grasso	Proteine	DMI	ECM	ΔPG	ΔUFL
(gg)	(Kg)	(%)	(%)	(%)	(Kg)	(Kg)		
< 50	12,6 \pm 0,2 ^A	4,86 \pm 0,02 ^A	7,07 \pm 0,09 ^A	4,45 \pm 0,04 ^A	15,1 \pm 0,09 ^A	19,0 \pm 0,4 ^A	57,1 \pm 26,9 ^A	- 1,45 \pm 0,13 ^A
50-120	12,7 \pm 0,2 ^A	5,05 \pm 0,02 ^B	7,66 \pm 0,10 ^B	4,25 \pm 0,02 ^B	16,5 \pm 0,12 ^B	19,6 \pm 0,4 ^A	313,1 \pm 22,7 ^B	- 0,62 \pm 0,12 ^B
120-200	9,4 \pm 0,2 ^B	4,86 \pm 0,02 ^A	8,70 \pm 0,12 ^C	4,51 \pm 0,03 ^A	15,9 \pm 0,10 ^C	15,9 \pm 0,4 ^B	528,4 \pm 17,8 ^C	0,48 \pm 0,09 ^{Ca}
200-270	7,03 \pm 0,3 ^C	4,75 \pm 0,02 ^C	8,04 \pm 0,26 ^C	4,71 \pm 0,03 ^C	14,9 \pm 0,12 ^A	12,2 \pm 0,4 ^C	578,4 \pm 21,8 ^C	0,86 \pm 0,11 ^{Cb}

Valori nella stessa colonna con lettere differenti, sono significativamente differenti (^{a,b}, P<0,05; ^{A,B,C}, P<0,01).

A differenza di quanto riscontrato nel sangue i livelli di BHBA del latte risultano più elevati tra i 50 e i 120 giorni.

La composizione acidica del latte ha mostrato una variazione che rispecchia la diversa distanza dal parto che, a sua volta, condiziona la capacità di ingestione degli alimenti (Tabella 7).

Tabella 7. Percentuali degli acidi grassi del latte in funzione della distanza dal parto

Distanza parto	TRANS FA (mg)	MONOINSATURI	POLINSATURI	SATURI
	MEDIA ± SE	MEDIA ± SE	MEDIA ± SE	MEDIA ± SE
< 50	0,02 ± 0,02 ^A	1,76 ± 0,04 ^{Aa}	0,22 ± 0,004 ^{Aa}	10,52 ± 0,09 ^A
50-120	0,04 ± 0,01 ^B	1,88 ± 0,04 ^{Ab}	0,24 ± 0,005 ^{Ab}	4,78 ± 0,10 ^B
120-200	0,04 ± 0,01	2,40 ± 0,04 ^B	0,28 ± 0,005 ^B	5,41 ± 0,10 ^C
200-270	0,03 ± 0,01	2,74 ± 0,04 ^C	0,10 ± 0,005 ^C	5,55 ± 0,10 ^C

Valori nella stessa colonna con lettere differenti, sono significativamente differenti (^{a,b}, P<0,05; ^{A,B,C}, P<0,01).

È interessante notare che i campioni di latte prelevati nei soggetti a meno di 50 giorni di distanza dal parto hanno mostrato una minore incidenza di mono e polinsaturi ed una maggiore incidenza di saturi, rispetto a quelli a metà e fine lattazione. Tale risultato è in accordo con quanto osservato in alcuni studi condotti nella specie bovina (*Auld et al., 1998*): anche in questo caso in vacche di razza New Zealand ad inizio lattazione è stato registrato un minor contenuto di acidi grassi da 4:0 a 12:0 rispetto a quelli osservati nei soggetti a metà (120 giorni), and fine (210 giorni) lattazione. Gli autori hanno attribuito questa differenza all'incapacità fisiologica dei soggetti ad inizio lattazione di ingerire una quantità di sostanza secca sufficiente a soddisfare i fabbisogni energetici. È stato infatti ampiamente dimostrato che nei ruminanti le diverse componenti del grasso hanno differente origine: mentre la sintesi degli acidi grassi a catena corta avviene direttamente nella ghiandola mammaria a partire da

nutrienti veicolati dal flusso circolatorio (principalmente acetato e β - idrossibutirrato), quelli saturi a catena lunga si ottengono dai lipidi plasmatici, che derivano dalla mobilizzazione delle riserve endogene. Per quanto riguarda, invece, gli acidi grassi monoinsaturi questi derivano sia dalla sintesi endogena a partire degli analoghi saturi, sia dai grassi assunti con l'alimentazione, mentre i polinsaturi sono prodotti esclusivamente a partire dai grassi alimentari. Dall'analisi dei dati ottenuti nel nostro studio, è possibile evidenziare come anche nella specie bufalina, sia supponibile che si verificano simili condizioni: i soggetti ad inizio lattazione, infatti, presentano la minor ingestione di sostanza secca (Tabella 6) e, pertanto, sono quelli che vanno incontro ad una maggiore lipomobilizzazione: ciò giustifica la maggiore presenza di acidi grassi saturi e la minore presenza di quelli mono e polinsaturi registrati rispetto a quelli a metà lattazione. Va sottolineato che le bufale a fine lattazione, pur facendo ricorso alle proprie riserve corporee per far fronte alle incrementate richieste metaboliche, presentano una significativa riduzione degli acidi grassi polinsaturi e dei saturi, accompagnata però da un incremento dei monoinsaturi. Questo interessante riscontro può essere solo parzialmente spiegato con la lipomobilizzazione cui vanno incontro tali soggetti e necessita di ulteriori approfondimenti.

Dall'analisi della regressione logistica, indipendentemente dalla distanza dal parto e dalle stagioni, è emerso che i livelli di BHBA nel latte risultano condizionati positivamente dai livelli di BHBA, glucosio, creatinina del sangue, nonché dai kg di mozzarella, dalla sostanza secca ingerita (DMI) , e dal tenore in grasso del latte e negativamente dall'acetone, dal rapporto grasso/proteine, dai trigliceridi, dal tasso proteico del latte, dai kg di ECM e dal Δ UFL così come riportato nella seguente equazione di regressione:

$$\mathbf{BHBA}_L = - 0.873 + 0.195 \text{ ACET}_L + 0.738 \text{ G/P} - 0.179 \%GR_L - 0.188 \text{ BHBA}_S + 0.004 \text{ Trys mg/dl} + 0.332 \%Pr_L - 0.044 \text{ CR}_S + 0.122 \text{ ECM} - 0.702 \text{ MR (Kg)} + 0.050 \Delta\text{UFL} - 0.029 \text{ DMI} - 0.001 \text{ GI}_S; R^2 = 0.349.$$

Dove:

$BHBA_L$ = Livelli di BHBA nel latte;

$ACET_L$ = Livelli di acetone nel latte (mg/dl);

G/P = Rapporto Grasso / Proteine nel latte,

$BHBA_S$ = Livelli di BHBA nel sangue (mmol/l);

Gr_L = Grasso nel latte (%);

$Trys$ = Livelli di trigliceridi nel sangue (mg/dl);

Pr_L = Proteine nel latte (%);

CR_S = Livelli di creatinina nel sangue (mg/dl);

ECM = Quantità di latte corretto (Kg);

MR = Quantità di mozzarella prodotta (Kg)

ΔUFL = differenza tra energia assunta con la dieta e utilizzata;

DMI = Ingestione di sostanza secca (Kg)

Gl_S = Livelli di glucosio nel sangue (mg/dl);

In definitiva una minore ingestione di sostanza secca acuendo il bilancio energetico negativo (ΔUFL) dell'animale che in seguito una riduzione dei livelli ematici di glucosio, incrementa la lipomobilizzazione e di conseguenza aumenta i livelli di BHBA del sangue che condizionano il dosaggio del metabolita nel latte. Tutto ciò si traduce in una minore produzione quanti-qualitativa del latte e ad una interruzione della lipodeposizione così come testimoniato dalla relazione negativa con i trigliceridi ematici.

Relativamente all'acetone dosato nel latte l'equazione di regressione ricalca ciò che è stato osservato per il BHBA del latte con la sola differenza che all'aumentare dei livelli di acetone si riducono i livelli di BHBA. E' noto, infatti, l'aumento dei NEFA durante il post-partum fornisce un substrato energetico per il glucosio attraverso la β -ossidazione. L'ossidazione, a sua volta, porta ad un accumulo di acetyl-CoA, che può essere parzialmente ossidato a formare corpi chetonici e acetone.

$$\text{ACET}_L = -1.099 + 0.002 \text{ Gl}_S + 0.111 \text{ PT} - 0.174 \text{ CR}_S + 0.218 \text{ G/P \%} + 0.302 \text{ BHBA}_S \\ + 0.356 \text{ NEFA}_S - 0.004 \text{ UR}_L + 0.165 \text{ L} - 0.026 \text{ DMI} - 0.144 \text{ BILT mg/dl}; R^2 = 0.325.$$

Dove:

Gl_S = Livelli di glucosio nel sangue (mg/dl);

PT_S = Proteine totali nel sangue (g/dl);

CR_S = Livelli di creatinina nel sangue (mg/dl);

G/P = Rapporto Grasso / Proteine nel latte;

BHBA_S = Livelli di BHBA nel sangue (mmol/l);

NEFA_S = Livelli di NEFA nel sangue (mmol/l);

UR_L = Livelli di Urea nel latte (mg/dl);

L = Livelli di lattosio (g);

DMI = Ingestione di sostanza secca (Kg);

BILT = Livelli di bilirubina totale (mg/dl);

Dall'analisi dell'equazione di regressione dell'urea del latte, così come riportato in precedenti lavori (*Campanile et al., 2001*), si evidenzia una stretta correlazione del suddetto metabolita con i valori registrati nel sangue.

$$\text{UR}_L = 16.881 + 0.290 \text{ UR}_S - 6.499 \text{ ACET}_L - 0.214 \text{ TRIGLYCERIDES mg/dl} + 3.085 \\ \text{CREATININE mg/dl} - 0.025 \text{ GIM} + 0.003 \Delta \text{PG g}; R^2 = 0.300.$$

Dove:

UR_L = Livelli di Urea nel latte;

UR_S = Livelli di Urea nel sangue (mg/dl);

ACET_L = Livelli di acetone nel latte (mg/dl);

Tr_S = Livelli di trigliceridi nel sangue (mg/dl);

CR_S = Livelli di creatinina nel sangue (mg/dl);

GIM = Giorni in mungitura;

Δ PG = Differenza tra proteine assunte con la dieta e utilizzate.

Inoltre i livelli di urea risultano condizionati dalla distanza dal parto e dal soddisfacimento dei fabbisogni proteici, nonché dalle condizioni del metabolismo energetico. Nei nostri dati è interessante rilevare che all'aumentare della lunghezza dal parto si osserva una riduzione dei livelli di urea. Ciò è da attribuire al cambio di razionamento e alla conseguente riduzione dei livelli proteici della dieta che sono soliti osservarsi nelle bufale dopo i 200 giorni di lattazione al passaggio da due ad una mungitura giornaliera. Il suddetto andamento è confermato anche da quanto riportato in Tabella 5 in cui i livelli di urea del sangue risultano significativamente inferiori ($P < 0,01$) nell'ultima fase della lattazione.

Se si dividono i soggetti in funzione dei livelli di BHB ematico (Tabella 8).

Tabella 8. Suddivisione in classi delle bufale in prova in funzione dei livelli di BHBA nel sangue e nel latte.

Categoria	BHB nel sangue	BHB nel latte
Bassi	$0,19 \pm 0,02^A$	$0,10 \pm 0,02^A$
Medi	$0,39 \pm 0,01^B$	$0,11 \pm 0,01^B$
Alti	$0,63 \pm 0,01^C$	$0,14 \pm 0,01^C$

A,B,C Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0,01$.

I dati più rilevanti emersi dall'analisi dei dati organizzati in funzione dei livelli di BHB nel sangue hanno evidenziato che, confermando quanto emerso dall'analisi di correlazione, i soggetti con valori elevati di BHB nel sangue mostravano valori più elevati di BHB nel latte e valori inferiori di urea. Inoltre i soggetti con elevati livelli di BHB mostravano ridotte percentuali di C14-0 e C16-0 e valori più alti di C18-0.

2. Influenza del clima sullo stato metabolico

In Tabella 9 vengono riportati i parametri dosati nel latte e nel sangue risultati statisticamente significativi tra i due estremi stagionali considerati.

Tabella 9. Differenze statisticamente significative per i parametri registrati nel latte e nel sangue durante la stagione calda (estate) e fredda (inverno).

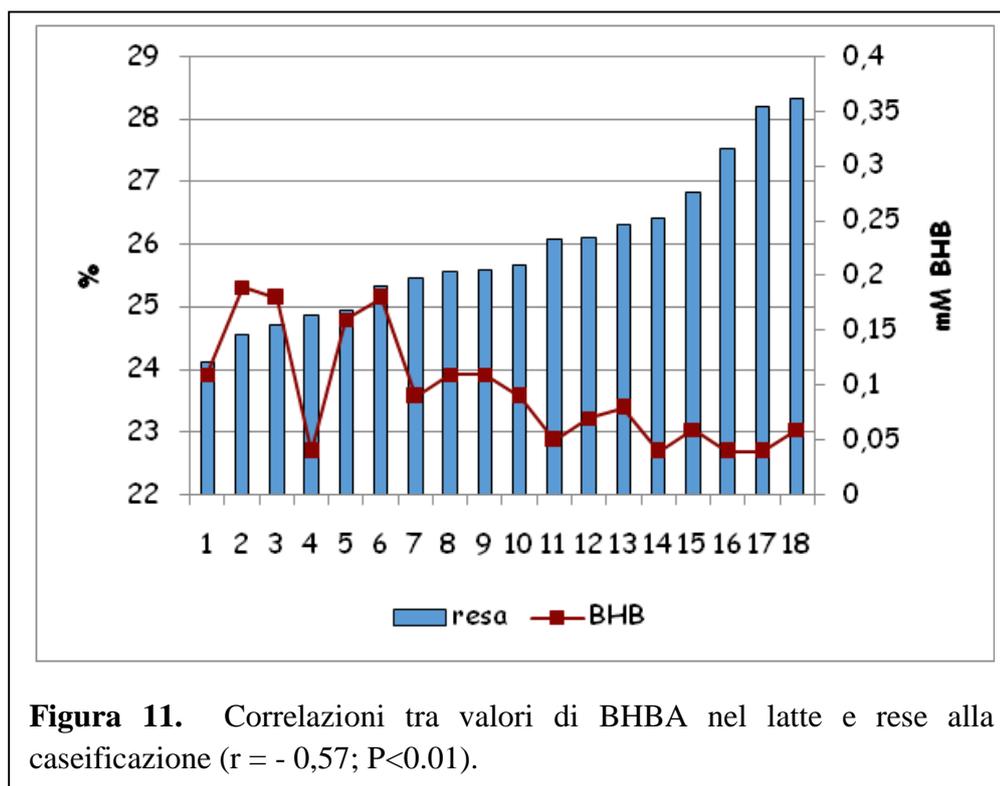
		Estate	Inverno
Latte	(Kg)	10,96±0,20 ^a		10,16±0,32 ^b
ECM	(Kg)	17,35±0,30 ^a		16,29±0,47 ^b
Lattosio	(%)	4,94±0,01 ^A		4,88±0,01 ^B
Proteine	(%)	4,36±0,02 ^A		4,66±0,02 ^B
Urea	(mg/dl)	32,89±0,51 ^A		27,10±0,67 ^B
Acetone	(mg/dl)	0,28±0,01 ^A		0,50±0,01 ^B
G/P		1,85±0,02 ^A		1,75±0,02 ^B
Resa	(%)	24,21±0,16 ^A		25,24±0,26 ^B
Δ PG		399,51±17,46 ^A		266,36±32,19 ^B
Prot tot	(g/dl)	6,81±0,05 ^A		7,46±0,04 ^B
Colest	(mg/dl)	122,58±2,27 ^A		106,36±2,75 ^B
Glu	(mg/dl)	51,60±0,83 ^A		61,47±0,94 ^B
ALT	(mg/dl)	133,76±1,64 ^A		125,40±2,60 ^B
YGT	(mg/dl)	25,71±0,48 ^a		23,99±0,67 ^b
BID	(mg/dl)	0,19±0,01 ^a		0,61±0,25 ^b
NEFA	(mmol/l)	0,13±0,01 ^A		0,24±0,01 ^B
BILT	(mg/dl)	0,49±0,01 ^a		0,44±0,01 ^b
BHBA	(mmol/l)	0,44±0,01 ^a		0,47±0,01 ^b

Le minori temperature medie e l'elevata escursione termica che caratterizza il periodo di transizione (metà dicembre – fine febbraio) hanno fatto registrare una minore produzione di latte, di lattosio e del rapporto grasso/proteine. Ciò è da attribuire alla maggiore richiesta energetica in conseguenza delle peggiori condizioni climatiche. Infatti si nota una più alta lipomobilizzazione testimoniata dall'aumento dei livelli di acetone dosati nel latte e dall'incremento dei NEFA e del BHBA nel sangue. Questa condizione è legata all'effetto stressante del clima su questa specie come è possibile evidenziare dai livelli significativamente più elevati di glucosio e più bassi di transaminasi (Tabella 9) legati all'aumento della cortisolemia. Nella specie bufalina i cambiamenti climatici, infatti, influenzano l'attività fisiologica degli animali agendo attraverso diverse vie metaboliche sull'organismo animale (*Campanile e Balestrieri, 2002*). Quest'ultimo, difatti, è il risultato di una serie di adattamenti comportamentali o fisiologici del metabolismo influenzati dalla temperatura e dall'umidità. Le condizioni climatiche, le aziende e i terreni che costituiscono "l'ambiente complessivo", sono interdipendenti ed esercitano una notevole influenza sia individualmente che collettivamente sulla vita degli animali e sui loro modelli comportamentali (*Shalash, 1994*). Gli animali attivano contro gli effetti negativi delle condizioni ambientali, meccanismi di difesa. L'esposizione a climi freddi causa, nella specie bufalina, un aumento dei livelli di T3 e T4; il TSH (Thyroid-stimulating hormone=ormone tireostimolante) mostra, invece, un pattern opposto a quello degli ormoni tiroidei (*Campanile et al., 1994*). L'accresciuta attività tiroidea durante le stagioni più fredde, che è fisiologicamente necessaria per aumentare il metabolismo basale, potrebbe essere responsabile dei livelli di TSH. In bufali, allevati in un'area caratterizzata da un inverno rigoroso ed ampie escursioni termiche, i valori di TSH risultavano più bassi (1.5 µU/dl) rispetto ad altre aziende (>1.5 µU/dl) in cui sono stati ritrovati bassi livelli di T3 e T4. La situazione potrebbe essere ascritta ad una attività ipotalamo-ipofisi quiescente dovuta alla persistenza di livelli particolarmente alti di T3 (> 2ng/ml) e T4 (> 6 µg/dl). Nelle bufale, gli ormoni tiroidei sono in ogni caso positivamente correlati alla stagione e influenzati dallo stadio di lattazione. Anche nelle manze, T3 e T4, mostrano un aumento progressivo in inverno (*Avallone et al., 1994*). Alti livelli di colesterolo totale sono stati trovati in allevamenti bufalini con climi piuttosto freddi.

Infatti è risaputo che le catecolamine, che sono stimolate da fattori di stress, aumentano la mobilitazione del grasso e, quindi, i livelli ematici di NEFA (acidi grassi non esterificati) con lo scopo di produrre calore endogeno necessario a garantire la termoregolazione (*Campanile et al., 1994*). Il bilancio energetico negativo (BEN) tipico delle fasi precoci della lattazione potrebbe essere aumentato dalle basse temperature con concomitante danno all'attività produttiva e riproduttiva delle bufale. Ai primi freddi dell'inverno ad esempio, nel latte aumenta il valore di SH° (*Zicarelli, 2001*). Inoltre durante l'inverno è stato osservato che il bufalo riduce la sua produzione e aumenta il contenuto proteico del latte. La riduzione di della produzione lattea, conseguente alle condizioni climatiche, ha comportato un effetto concentrazione esclusivamente sul tenore proteico (Tabella 9), mentre la minore energia disponibile non ha fatto rilevare lo stesso effetto sulla percentuale di grasso. I migliori livelli proteici del latte riscontrati nel periodo più freddo hanno fatto registrare una maggiore resa e un più basso rapporto grasso/proteine.

3. Influenza dello stato metabolico sulla resa alla caseificazione

Un altro aspetto che si è ritenuto interessante investigare è stato quello di verificare l'effetto dei livelli di BHBA e di urea del latte sulla resa alla caseificazione nei diversi mesi del periodo sperimentale nelle 8 aziende. L'analisi statistica dei dati ha evidenziato una correlazione negativa ($r = -0.57$; $P < 0.01$) tra i livelli di BHBA del latte e la resa alla caseificazione, come illustrato nella Figura 11, in cui è evidente come all'aumentare del BHBA si osserva una diminuzione della resa alla caseificazione. Questa caratteristica risulta condizionata dal peggioramento della qualità del latte, in termini di proteine e grassi, che si osserva in corso di lipomobilizzazione anche lieve.



Inoltre è stata valutata la resa nei soggetti che mostravano valori alti (>0.11) e bassi (<0.11) di BHB nel latte (Tabella 10).

Tabella 10. Resa alla caseificazione e valori di urea nel latte di soggetti con alti vs bassi livelli di BHB nel latte.

Livelli di BHB	Resa caseificazione (%)	Urea (mg/dl)
Alto BHB (> 0.11)	25,2 ± 0,2 ^A	28,3 ± 2,6
Basso BHB (<0.11)	26,6 ± 0,3 ^B	30,8 ± 1,5

^{A,B}Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; P<0.01

Anche in questo caso, si è osservato che il latte dei soggetti con elevati livelli di BHB, presenta una minore resa, traducendosi ovviamente in una perdita economica per l'imprenditore zootecnico. Sebbene la differenza in resa sia di soli 1,4 punti percentuali la perdita economica si assesterebbe a circa il 5 %.

Non è emersa, invece, nessuna correlazione tra la resa e i valori di urea nel latte, come si osserva dalla Figura 12.

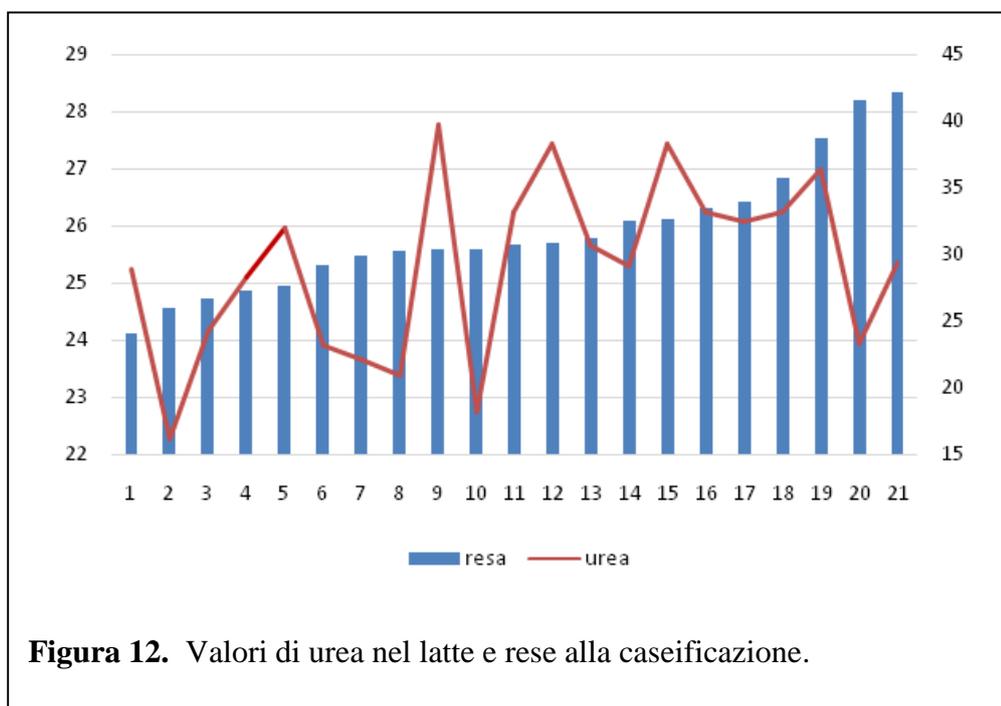


Figura 12. Valori di urea nel latte e rese alla caseificazione.

Analogamente non è stata registrata alcuna variazione nella resa tra soggetti con valori di urea nel latte inferiori e superiori a 0.25 mg/dl (Tabella 11).

Tabella 11. Resa alla caseificazione e valori di urea nel latte di soggetti con alti vs bassi livelli di BHB nel latte.

Livelli di urea	Resa caseificazione (%)	BHBA (mmol/L)
Bassi (< 25)	25,6 ± 0,5	0,13 ± 0,02
Normali (>25<40)	26,0 ± 0,3	0,09 ± 0,01

4. Influenza dello stato metabolico sull'attività riproduttiva

L'analisi dei dati effettuata a posteriore tra soggetti gravidi vs. non gravidi non sono emerse differenze significative per la distanza dal parto, numero dei parti, urea e acetone dosato nel latte. Contrariamente il BHBA nel latte dei soggetti non gravidi è risultato maggiore ($P < 0.05$) rispetto alle bufale diagnosticate gravide a 45 giorni (Tabella 12).

Tabella 12. Differenze nei valori di BHBA nel latte tra bufale gravide e non gravide.

Gruppi	n	GIM	n. parti	β -HB latte mmol/L
Gravide	825	$109,0 \pm 2,7$	$2,6 \pm 0,1$	$0,15 \pm 0,01^a$
Vuote	736	$110,9 \pm 3,2$	$2,5 \pm 0,1$	$0,17 \pm 0,01^b$
Totale	1561	109.9 ± 2.1	2.6 ± 0.05	0.16 ± 0.01

^{a,b}, Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0.05$

L'analisi della regressione logistica mostra che all'aumentare del BHB diminuisce la probabilità che la bufale si ingravidino (odds ratio = 0,406; $P < 0,05$). In particolare la probabilità stimata di essere gravidi, per i soggetti con valori superiori ai 0,25 mmol/L di BHBA, è inferiore al 50%. Sulla base di questo dato abbiamo ritenuto opportuno suddividere le bufale in 2 gruppi in funzione dei livelli di BHBA nel latte, ad alto rischio (≥ 0.25 mmol/L) e a basso rischio (≤ 0.25 mmol/L) di chetosi. L'incidenza dei soggetti con valori elevati (≥ 0.25 mmol/L) di BHBA sul totale è stata pari al 22%. I soggetti dei due gruppi hanno fatto registrare una distanza dal parto e un numero di parti sovrapponibili (in media rispettivamente 115.7 giorni e 2.7 parti). È interessante rilevare come, a conferma del dato precedente, il tasso di gravidanza dopo

inseminazione strumentale sia aumentato in maniera significativa nelle bufale con bassi livelli di BHBA rispetto a quelle che hanno mostrato valori più elevati (55.8 vs 45.3%; $P < 0.01$). A conferma dello stato di chetosi evidente, i soggetti con valori di BHBA alti hanno mostrato una riduzione significativa ($P < 0.01$) della concentrazione di urea nel latte ed un aumento ($P < 0.01$) dell'acetone e delle cellule somatiche (Tabella 13).

Tabella 13. Tassi di gravidanza ed alcuni parametri del latte in soggetti con valori di BHB < 0.25 o ≥ 0.25 mmol/L. I valori sono riportati come media \pm errore standard.

Gruppi	% gravide	SNF	urea	acetone	BHB	Cell som
< 0.25	55,8 \pm 1,7 ^A	10,3 \pm 0,01 ^A	33,9 \pm 0,4 ^A	0,3 \pm 0,01 ^A	0,1 \pm 0,002 ^A	258,7 \pm 18,4 ^A
≥ 0.25	45,3 \pm 3,6 ^B	10,2 \pm 0,04 ^B	30,6 \pm 1,1 ^B	0,6 \pm 0,03 ^B	0,4 \pm 0,02 ^B	466,5 \pm 56,9 ^B

^{A,B} Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; $P < 0.01$

La dismetabolia è risultata particolarmente evidente nelle bufale che producevano latte con livelli più elevati di grasso (Tabella 14). È noto, infatti, che lo sforzo metabolico per produrre grasso fa innalzare i valori del metabolismo dei lipidi di deposito e la riduzione dei livelli glicemici risulta responsabile di una minore quantità di lattosio e della sintesi proteica (Tabella 14).

Tabella 14. Composizione del latte e produzione di soggetti con valori di BHB <0.25 o ≥ 0.25 mmol/L.

Gruppi BHB	Kg ECM	grasso	proteine	lattosio	caseina
<0.25	18,6 \pm 0,2	8,0 \pm 0,05 ^A	4,4 \pm 0,01 ^a	4,9 \pm 0,01 ^A	3,5 \pm 0,01 ^A
≥ 0.25	19,4 \pm 0,6	9,5 \pm 0,1 ^B	4,3 \pm 0,02 ^b	4,8 \pm 0,02 ^B	3,4 \pm 0,02 ^B

^{A,B} Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; P<0.01

Non sono state invece rilevate differenze nelle produzioni medie di latte (11,8 vs 11,1 Kg, rispettivamente nei soggetti con bassi e alti valori di BHB) e di latte corretto (18,6 e 19,4 Kg, rispettivamente nei soggetti con bassi e alti valori di BHB).

I livelli di urea del latte non hanno influenzato la percentuale di soggetti gravidi a 40 giorni e ciò probabilmente è legato alla capacità di questa specie, come tutte le specie tropicali, di modificare la clearance renale del suddetto metabolita, a seconda delle condizioni di eccesso o carenza di proteine assunte con la dieta, e della maggiore efficienza epatica nel trasformare l'ammoniaca in urea (*Campanile et al., 1998*).

In linea generale la distribuzione dei capi per tre classi create in funzione dei range di urea nel latte (≤ 25 , 25-40 e ≥ 40 mg/100 mL) ha confermato quanto già riportato osservato in precedenza su un maggior numero di animali (esperimento 1). Infatti l'incidenza dei soggetti con valori ≤ 25 , compresi nel range 25-40 e ≥ 40 mg/100 mL è stata rispettivamente del 21,6%, 50,0% e 28,3%. Ne consegue che circa il 50% dei soggetti analizzati ha mostrato valori di urea al di sotto o al di sopra del range fisiologico, confermando che esiste una problematica del management alimentare che influenza a sua volta il benessere degli animali. È stato innanzitutto osservato che la percentuale di gravidanza dopo inseminazione strumentale non è stata differente tra le 3 classi (Tabella 15).

Tabella 15. Tassi di gravidanza ed alcuni parametri del latte di soggetti raggruppati in diverse classi in funzione dell'urea del latte.

Gruppi urea	DIP	% gravide	urea	acetone	BHBA
< 25	127,8±5,6 ^{Aa}	52,5±3,1	18,5±0,3 ^A	0,43±0,02 ^A	0,20±0,01 ^A
25-40	105,8±3,1 ^B	53,8±2,0	32,9±0,2 ^B	0,26±0,01 ^B	0,15±0,01 ^B
>40	110,0±5,2 ^b	53,1±2,7	48,3±0,4 ^C	0,26±0,02 ^B	0,14±0,01 ^B

^{A,B,C} Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; P<0,01.

^{a,b}Valori contrassegnati da lettere diverse sono differenti significativamente; P<0,05.

Significatività statistiche sono emerse, invece, per produzione di latte, caratteristiche qualitative del latte, distanza dal parto (GIM), acetone e BHB. In effetti i soggetti con livelli di urea elevati hanno fatto registrare una maggiore produzione di energia (ECM) ma una minore quantità di proteine e grasso. Mentre i minori livelli di urea conseguenti al mancato soddisfacimento dei fabbisogni proteici ha favorito una maggiore mobilitazione tissutale come testimoniato dai livelli più elevati di acetone e BHB (Tabella 15). Quest'ultimo è stato responsabile, come già evidenziato in precedenza dell'innalzamento delle cellule somatiche (Tabella 15).

CONCLUSIONI

Lo sforzo metabolico legato alla maggiore produzione, alle condizioni climatiche e alla sintesi di grasso del latte fanno registrare un aumento dei cataboliti energetici nel sangue e nel latte. L'intensificarsi della lipomobilizzazione agisce negativamente sulla qualità e quantità del latte riducendo nel contempo la resa alla caseificazione ed agendo negativamente sullo stato di benessere degli animali. Ulteriore aggravio del bilancio energetico negativo è rappresentato dalla riduzione dell'efficienza riproduttiva che riduce la probabilità di ingravidamento. La relazione tra condizioni metaboliche e parametri dosabili mensilmente nel latte dimostrata con la presente tesi permetterà lo sviluppo di un piano di supporto di decisioni strategiche aziendali facilmente fruibile e con periodicità legata alla tempistica dei controlli funzionali. L'identificazione e la facilità di dosaggio nel latte degli indicatori di dismetabolie possono favorire interventi che mirano al miglioramento dello stato di benessere degli animali e all'aumento produttivo attraverso piani di intervento mirati. Sono stati, inoltre, messi in evidenza ulteriori problematiche relative alla poca conoscenza della specie bufalina e da affrontare al fine di evitare sul mercato un prodotto che sia dal punto di vista igienico-sanitario ineccepibile e prodotto nel rispetto degli animali allevati.

RINGRAZIAMENTI

Grazie al Prof Giuseppe Campanile, relatore di questa tesi, per avermi consigliato durante tutto il mio percorso universitario, per avermi dato un tema così interessante e ambizioso e per essere stato indispensabile in questo lavoro di tesi, ma soprattutto grazie per avermi inconsapevolmente insegnato l'importanza dell'onestà personale e intellettuale.

Grazie al Prof Gianluca Neglia per essere stato il mio punto di riferimento in questi tre anni di dottorato, per aver sempre creduto in me anche quando non ci credevo più nemmeno io.

Desidero ringraziare profondamente la Dott.ssa Ester De Carlo e la Dott.ssa Alessandra Martucciello dell'istituto zooprofilattico sperimentale del mezzogiorno (IZSM), l'Ufficio Tecnico l'AIA di Benevento e tutte le aziende sperimentali (Agricola volturmo, Letizia, Desideri, Agricola Meridionale, Errichiello, Di Vuolo, La Teramana, Casabianca) per la disponibilità e la professionalità dimostrate

Grazie al Prof. Antonio Zullo per l'indispensabile aiuto nell'elaborazione statistica.

Un amorevole grazie ad Angela Salzano, la nostra amicizia è l'esperimento riuscito meglio nelle mura del laboratorio. I "nostri sushini" hanno dato il sole a molte giornate burrascose.

Grazie a TE, per avermi fatto scoprire quanto è bello "essere simili", in ogni tua parola, in ogni tuo sguardo e in ogni tuo pensiero ho trovato la forza per combattere e l'amore sincero che solo tu sai dare.

Grazie a Ciccio e Gio e alle loro guanciotte, con il loro sorriso riempiono di gioia e freschezza la vita.

BIBLIOGRAFIA

1. Adams N.R., Briegel J.R., Rigby R.D.G., Sanders M.R., Hoskinson R.M. (1996). Responses of sheep to annual cycles in nutrition. 1. Rôle of endogenous growth hormone during under nutrition. *Animal Science* **62**: 279-286.
2. Adashi E.Y., Resnick C.E., D'Ercole A.J., Svoboda M.E., Van Wyk J.J. (1985). Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocrinology* **6**: 400-420.
3. Al-Trad B., Wittek T., Penner G.B., Reisberg K., Gabel G., Furll M., Aschenbach J.R. (2010). Expression and activity of key hepatic gluconeogenesis enzymes in response to increasing intravenous infusions of glucose in dairy cows. *Journal of Animal Science* **88**: 2998–3008.
4. Annison E.F., Bickerstaffe R., Linzell J.L. (1974). Glucose and fatty acid metabolism in cows producing milk of low fat content. *Journal of Agricultural Science* **82**: 87-95.
5. Armstrong J.D., Benoit A.M. (1996). Paracrine, autocrine, and endocrine factors that mediate the influence of nutrition on reproduction in cattle and swine: An in vivo, IGF-I perspective. *Journal of Animal Science* **74**: 18-35.
6. Arner P. (2005). Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **19**: 471–482.
7. Aschenbach J.R., Bhatia S.K., Pfannkuche H., Gabel G. (2000a). Glucose is absorbed in a sodium-dependent manner from forestomach contents of sheep. *Journal of Nutrition* **130**: 2797–2801.
8. Aschenbach J.R., Wehning H., Kurze M., Schaberg E., Nieper H., Burckhardt G., Gabel G. (2000b). Functional and molecular biological evidence of SGLT-1 in the ruminal epithelium of sheep. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* **279**: G20–G27.
9. Ashida K., Asahi O. (1960). Studies on ovarian disorder in the dairy cow. III. Effect of experimental liver dysfunction on sexual function. *Bulletin National Institute of Animal Health, Tokyo*, **40**: 19-27.
10. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1980. Official methods of analysis. 13th ed. AOAC, Washington, DC.

11. Auldist M.J., Walsh B.J., Thomson N.A. (1998). Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand. *Journal of Dairy Research* **65**: 401-411.
12. Bach A., Calsamiglia S., Stern M.D. (2005). Nitrogen Metabolism in the Rumen. *Journal of Dairy Science* **88** (Suppl. 1): E9-E21.
13. Baird G.D., Hibbitt K.G., Hunter G.D., Lund P., Stubbs M., Krebs H.A. (1968). Biochemical aspects of bovine ketosis. *Biochemical Journal* **107**: 683.
14. Baird G.D., Van der Walt J.G., Bergman E.N. (1983). Whole-body metabolism of glucose and lactate in productive sheep and cows. *British Journal of Nutrition* **50**: 249-265.
15. Baruselli P.S. (1993). Manejo reprodutivo de bubalinos. Inst. Zoot. Estacao Experimental de Zootecniq do Vale do Ribeira, Registro SP., Brazil.
16. Baruselli P.S., Barnabe V.H., Barnabe R.C., Visintin J.A., Molero-Filho J.R., Porto Filho R., (2001). Effect of body condition score at calving on postpartum reproductive performances in buffalo. *Buffalo Journal* **1**: 53-65.
17. Baruselli P.S., Mucciolo R.G., Visintin J.A., Viana W.G., Arruda R.P., Madureira E.H., Oliveira C.A., Molero- Filho J.R. (1997). Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* **47**: 1531-1547.
18. Beam S.W., Butler W.R. (1997). Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biology of Reproduction* **56**: 133-142.
19. Bell A.W. (1995). Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science* **73**: 2804-2819.
20. Benson J.A., Reynolds C.K., Aikman P.C., Lupoli B., Beever D.E. (2002). Effects of abomasal long chain fatty acid infusion on splanchnic nutrient metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **85**: 1804-1814.
21. Bergman E.N., Brockman R.P., Kaufman C.F. (1974). Glucose metabolism in ruminants: comparison of whole-body turnover with production by gut, liver, and kidneys. *Federation Proceedings* **33**: 1849-1854.
22. Berthiaume R., Dubreuil P., Stevenson M., McBride B.W., Lapierre H. (2001). Intestinal disappearance and mesenteric and portal appearance of amino acids in dairy cows fed ruminally protected methionine. *Journal of Dairy Science* **84**: 194-203.
23. Bertoni G. (2000). Effect of feeding pattern and behaviour on hormonal changes and milk composition. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **480**: 217-223.
24. Bertoni G., Amici A., Lombardelli R., Bartocci S. (1993). Variations of metabolic profile and hormones in blood of buffaloes, cattle and sheep males fed the same diets.

- Proc. of the Inter. Symp. "Prospect of buffalo production in the Mediterranean and the Middle East", Cairo, Egypt, 9-12 November: 345-348.
25. Bertoni G., Lombardelli L. (1991). Effetti dell'alimentazione sul quadro endocrino e metabolico degli animali da latte. Atti IX Congr. ASPA, 1161-1189.
 26. Bionaz M., Trevisi E., Calamari L., Librandi F., Ferrari A., Bertoni G. (2007). Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science* **90**: 1740-1750.
 27. Campanile G. (1997). Interrelazioni tra nutrizione e riproduzione nella bufala. 3° corso sulle biotecnologie della riproduzione nella bufala. Caserta, 6-10 ottobre. II: 217-235.
 28. Campanile G., Avallone L., d'Angelo A., Di Palo R., Di Meo C. (1994). Influence of the season and of the number of days after calving on the pattern of thyroid hormones in buffalo cows. IV Buffalo congress, San Paulo, Brazil: 564-566.
 29. Campanile G., Baruselli P.S., Vecchio D., Prandi A., Neglia G., Carvalho N.A.T., Sales J.N.S.J., Gasparrini B., D'Occhio M.J. (2010). Growth, metabolic status and ovarian function in buffalo heifers fed a low energy or high energy diet. *Animal Reproduction Science* **122**: 74 – 81.
 30. Campanile G., De Filippo C., Di Palo R., Taccone W., Zicarelli L. (1998). Influence of dietary protein on urea levels in blood and milk of buffalo cows. *Livestock Production Science* **55**: 135–143.
 31. Campanile G., Di Palo R., De Filippo C., Zicarelli L. (1997a). Tempi di ingestione e di ruminazione nella bufala in funzione della distanza dal parto. Atti L Conv.Naz. S.I.S-Vet.: 569-570.
 32. Campanile G., Di Palo R., Esposito L., Boni R., Di Meo C. (1995). Variazioni di alcune costanti ematiche in bufale in lattazione. Atti XI Congr. Naz. A.S.P.A., Grado (GO), Italia, 19-22 June: 77-78.
 33. Campanile G., Di Palo R., Gasparrini B., D'Occhio M.J., Zicarelli L. (2001b). Effects of early management system and subsequent diet on growth and conception in maiden buffalo heifers. *Livestock Production Science* **71**: 183-191.
 34. Campanile G., Di Palo R., Gasparrini B., Spadetta M., Neglia G., Zicarelli L. 1999. Follicle and oocyte characteristics in buffaloes fed different diets. Proceedings of the Scientific Association of Animal Production (A.S.P.A.) XIII Congress, Piacenza, Italy, June 21–24, 1999: 241–243.
 35. Campanile G., Neglia G., Di Palo R., Gasparrini B., Pacelli C., D'Occhio M.J., Zicarelli L. (2006). Relationship of body condition score and blood urea and ammonia to

- pregnancy in Italian Mediterranean buffaloes. *Reproduction Nutrition and Development* **46**: 57–62.
36. Campanile, G., Di Palo, R., Zicarelli, L., (2001a). Bilancio energetico e attività riproduttiva nella specie bufalina. In: Proc. I Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo, Eboli (SA) 3–5 Ottobre: 114–127.
 37. Campanile, G.; Balestrieri, M. L. Interaction of environment factors for better production in buffaloes. Proceedings of the 1st Buffalo Symposium of Americas, Belém, Pará, Brazil, 1-4 September 2002 2002 pp. 287-297
 38. Chiesa F., Gaiani R., Formigoni A., Accorsi P.A. (1991). Modificazioni del quadro endocrino e metabolico in bovine da latte ad elevata potenzialità produttiva durante l'asciutta e la lattazione. *Archivio Veterinario Italiano* **42**: 157-179.
 39. Chirieac D.V., Chirieac L.R., Corsetti J.P., Cianci J., Sparks C.E., Sparks J.D. (2000). Glucose-stimulated insulin secretion suppresses hepatic triglyceride-rich lipoprotein and apoB production. *American Journal of Physiology Endocrinology & Metabolism* **279**: E1003-1011.
 40. Contreras G.A., Sordillo L.M. (2011). Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* **34**: 281–289.
 41. Craig W.M., Broderick G.A., Ricker D.B. (1987). Quantification of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. *Journal of Nutrition* **117**: 56–62.
 42. Davis S.R., Smith J.F., Gluckman P.D. (1990). Effect of growth hormone injections on ovulation rate in ewes. *Reproduction, Fertility and Development* **2**: 173-178.
 43. De Rosa C., Campanile G., Amante L., Banchelli L., Midea D., Zicarelli L. (2001). Modificazioni endocrino-metaboliche nella fase di transizione e nei primi mesi di lattazione. Atti 1° Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo. Eboli (SA) 3-5 Ottobre. 293-297.
 44. Dhillon J.S., Tiwana M.S., Bhalaru S.S. (1994). Body weight changes during early lactating and its influence on reproductive performance of buffaloes. IV World Buffalo Congress, São Paulo, Brazil, June 1994, 3: 555-557.
 45. Di Lella T., Sarubbi F., Cutrignelli M.I., Infascelli F. (1997). Energy and efficiency for milk production in buffalo cows. Proceeding V World Buffalo Congress, Caserta, Italy: 363-366.
 46. Di Palo R. (1992). Produzione latte nella bufala con diete tradizionali e con l'impiego di acidi grassi. Ph.D. Thesis, Università di Napoli "Federico II".

47. Di Palo R., De Filippo C., Princigalli D., Campanile G., Zicarelli L. (1997). Effect of dietary supplementation with cryo-crystallized fatty acids on milk production and metabolic profile in buffalo cows. Proceeding V World Buffalo Congress, Caserta, Italy, October: 372-377.
48. Diskin M.G., Mackey D.R., Roche J.F., Sreenan J.M. (2003). Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science* **78**: 345-370.
49. Doepel L., Lobley G.E., Bernier J.F., Dubreuil P., Lapierre H. (2009). Differences in splanchnic metabolism between late gestation and early lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science* **92**: 3233–3243.
50. Drackley J.K., Beaulieu A.D., Elliott, J.P. (2001). Responses of milk fat composition to dietary fat or nonstructural carbohydrates in Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science* **84**: 1231–1237.
51. Drackley J.K., Richard M.J., Beitz D.C., Young J.W. (1992). Metabolic changes in dairy cows with ketonemia in response to feed restriction and dietary 1,3-butanediol. *Journal of Dairy Science* **75**: 1622-1634.
52. Drobny E.C., Abramson E.C., Baumann G. (1984). Insulin receptors in acute infection: a study of factors conferring insulin resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **58**: 710–716.
53. Eltohamy M.M., Ahmed W.M, Abdon A.S.S. (1994). Ovarian activity in relation to some blood composition. IV World Buffalo Congress, São Paulo, Brazil, June 1994, 3: 612-614.
54. Endres M.I., Stern M.D. (1993). Effects of pH and diets containing various levels of lignosulfonate-treated soybean meal on microbial fermentation in continuous culture. *Journal of Dairy Science* **76**: 177.
55. Fenwick M.A., Fitzpatrick R., Kenny D.A., Diskin M.G., Patton J., Murphy J.J., Wathes D.C. (2008). Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology* **34**: 31–44.
56. Fleck A. (1989). Clinical and nutritional aspects of changes in acute-phase proteins during inflammation. *Proceeding of the Nutrition Society* **48**: 347-54.
57. Garnsworthy P.C., Fouladi-Nashta A.A., Mann G.E., Sinclair K.D., 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.

58. Gasparri B., Di Palo R., Neglia G., Prandi A., Zicarelli L., Campanile G. (2002). The effect of feed restriction on some plasma and follicular fluid parameters in Italian Mediterranean Buffalo cows (*Bubalus bubalis*). *Reproduction in Domestic Animals* **37**: 220–221.
59. Giesecke D., Stangassinger M. (1977). Rumen acidosis and metabolic kinetics of D(2) lactic acid. In: Proceedings of the 3rd International Conference on Production Disease in Farm Animals (van Adrichem, P. W. M., ed.), Pudoc, Wageningen, The Netherlands: 85–87.
60. Gluckman P.D., Breier B.H., Davis S.R. (1987). Physiology of the somatotrophic axis with particular referenceto the ruminant. *Journal of Dairy Science* **70**: 442–466.
61. Greenfield R.B., Cecava M.J., Donkin S.S. (2000). Changes in mRNA expression for gluconeogenic enzymes in liver of dairy cattle during the transition to lactation. *Journal of Dairy Science* **83**: 1228–1236.
62. Grimble R.F. (1990). Nutrition and cytokine action. *Nutrition Research Reviews* **3**: 193–210.
63. Gruffat D., Durand D., Graulet B., Bauchart D. (1996). Regulation of VLDL synthesis and secretion in the liver. *Reproduction Nutrition and Development* **36**: 375–789.
64. Grummer R.R. (1991). Effect of feed on the composition of milk fat. *Journal of Dairy Science* **74**: 3244–3257.
65. Grummer R.R. (1993). Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* **76**: 3882–3896.
66. Grummer R.R. (2008). Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *The Veterinary Journal* **176**: 10–20.
67. Hammon H.M., Sturmer G., Schneider F., Tuchscherer A., Blum H., Engelhard T., Genzel A., Staufenbiel R., Kanitz W. (2009). Performance and metabolic and endocrine changes with emphasis on glucose metabolism in high-yielding dairy cows with high and low fat content in liver after calving. *Journal of Dairy Science* **92**: 1554–1566.
68. Hanigan M.D. (2005). Quantitative aspects of ruminant splanchnicmetabolism as related to predicting animal performance. *Animal Science* **80**: 23–32.
69. Harmon D.L., Britton R.A., Prior R.L. (1983). Influence of diet on glucose turnover and rates of gluconeogenesis, oxidation and turnover of D-(2)-lactate in the bovine. *Journal of Nutrition* **113**: 1842–1850.
70. Harmon D.L., McLeod K.R. (2001). Glucose uptake and regulation by intestinal tissues: implications and whole-body energetics. *Journal of Animal Science* **79**: E59–E72.

71. Hartwell J.R., Cecava M.J., Donkin S.S. (2001). Rumen undegradable protein, rumen-protected choline and mRNA expression for enzymes in gluconeogenesis and ureagenesis in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* **84**: 490–497.
72. Hauser S.D., McGrath M.F., Collier R.J., Krivi G.G. (1990). Cloning and in vivo expression of bovine growth hormone receptor mRNA. *Molecular Cellular Endocrinology* **72**: 187-200.
73. Hayirli A., Grummer R.R., Nordheim E.V., Crump, P.M. (2002). Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. *Journal of Dairy Science* **85**: 3430–3443.
74. Hegazy M.A., Essawy S.A., Teleb H.M., El-Wishy A.A., Youssef A.H. (1994). Effect of body condition score on reproductive performance of buffaloes. Proc. IV World Buffalo Congress, São Paulo, Brazil, June, 3: 630-631.
75. Hightshoe R.B., Cochran R.C., Corah L.R., Kiracofe G.H., Harmon D.L., Perry R.C. (1991). Effects of calcium soaps of fatty acids on postpartum reproductive function in beef cows. *Journal of Animal Science* **69**: 4097.
76. Hocquette J.F., Bauchart D. (1999). Intestinal absorption, blood transport and hepatic and muscle metabolism of fatty acids in preruminant and ruminant animals. *Reproduction Nutrition and Development* **39**: 27–48.
77. Hoggard N., Hunter L., Duncan J.S., Williams L.M., Trayhurn P., Mercer J.G. (1997). Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A.* **94**: 11073-11078.
78. Hostens M., Fievez V., Leroy J.L., Van Ranst J., Vlaeminck B., Opsomer G. (2012). The fatty acid profile of subcutaneous and abdominal fat in dairy cows with left displacement of the abomasum. *Journal of Dairy Science* **95**: 3756–3765.
79. Huntington G.B., Reynolds P.J. (1986). Net absorption of glucose, Lactate, volatile fatty acids, and nitrogenous compounds by bovine given infusions of starch or glucose. *Journal of Animal Science* **69**: 2428–2436.
80. Ingvarstsen K.L., Boisclair Y.R. (2001). Leptin and the regulation of food intake, energy homeostasis and immunity with special focus on periparturient ruminants. *Domestic Animal Endocrinology* **21**: 215–250.
81. Karcher E.L., Pickett M.M., Varga G.A., Donkin S.S. (2007). Effect of dietary carbohydrate and monensin on expression of gluconeogenic enzymes in liver of transition dairy cows. *Journal of Animal Science* **85**: 690– 699.

82. Kaur H., Arora S.P. (1982). Influence of the level of nutrition and season on the oestrus cycle rhythm and on the fertility in buffaloes. *Tropical Agriculture* **59**: 274-278.
83. Kawashima C., Matsui M., Shimizu T., Kida K., Miyamoto A. (2012). Nutritional factors that regulate ovulation of the dominant follicle during the first follicular wave postpartum in high-producing dairy cows. *Journal of Reproduction and Development* **58**: 10–16.
84. Kawashima C., Sakaguchi M., Suzuki T., Sasamoto Y., Takahashi Y., Matsui M., Miyamoto A. (2007). Metabolic profiles in ovulatory and anovulatory primiparous dairy cows during the first follicular wave postpartum. *Journal of Reproduction and Development* **53**: 113–120.
85. Kobayashi Y., Boyd C.K., Bracken C.J., Lamberson W.R., Keisler D.H., Lucy, M.C. (1999). 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.
86. Koser S.L., Thomas M., Donkin, S.S. (2008). Cloning the promoter region for bovine phosphoenolpyruvate carboxykinase gene and identification of propionate responsive region. *Journal of Dairy Science* **91** (Suppl 1): 424.
87. Kreikemeier K.K., Harmon D.L. (1995). Abomasal glucose, maizestarch and maize dextrin infusions in cattle: small-intestinal disappearance, net portal glucose flux and ileal oligosaccharide flow. *British Journal of Nutrition* **73**: 763–772.
88. Kristensen N.B., Harmon D.L. (2004a). Effect of increasing ruminalbutyrate absorption on splanchnic metabolism of VFA absorbed from the washed reticulo rumen of steers. *Journal of Animal Science* **82**: 3549–3559.
89. Kristensen N.B., Harmon D.L. (2004b). Splanchnic metabolism of VFA absorbed from the washed reticulo rumen of steers. *Journal of Animal Science* **82**: 2033–2042.
90. Kristensen N.B., Raun B.M.L. (2007). Ruminal and intermediary metabolism of propylene glycol in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science* **90**: 4707–4717.
91. Kruip T.A.M., Wensing T., Vos P.L.A.M. (2001). Characteristics of abnormal puerperium in dairy cattle and the rationale for common treatments. In ‘*British Society of Animal Science Occasional Publication*’ **26** (Vol. 1), Ed. M. Diskin: 63–79.
92. Lapierre H., Lobley G.E. (2001). Nitrogen recycling in the ruminant: a review. *Journal of Dairy Science* **84** (Suppl. E): E223-E236.

93. Larsen M., Kristensen N.B. (2009). Effect of abomasal glucoseinfusion on splanchnic amino acid metabolism in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* **92**: 3306–3318.
94. Le Roith D., Scavo L., Butler A. (2001). What is the role of circulating IGF-I? *Trends Endocrinology Metabolism* **12**: 48-52.
95. Leng R.A. (1970). Glucose synthesis in ruminants. *Advances in Veterinary Science* **14**: 209-260.
96. Leroy J.L., Vanholder T., Delanghe J.R., Opsomer G., Van Soom A., Bols P.E., Dewulf J., de Kruif A. (2004). Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology* **62**: 1131-1143.
97. Lobley G.E., Lapierre H. (2003). Post-absorptive metabolism of amino acids. In: Progress in Research on Energy and Protein Metabolism. W. B. Souffrant and C. C. Metges, ed. Publ. 109. European Association for Animal Production, Rome, Italy: 737-756.
98. Lomax M.A., Baird G.D. (1983). Blood flow and nutrient exchange across the liver and gut of the dairy cow. *British Journal of Nutrition* **49**: 481–496.
99. Loor J.J., Dann H.M., Guretzky N.A., Everts R.E., Oliveira R., Green C.A., Litherland N.B., Rodriguez-Zas S.L., Lewin H.A., Drackley J.K. (2006). Plane of nutrition prepartum alters hepatic gene expression and function in dairy cows as assessed by longitudinal transcript and metabolic profiling. *Physiological Genomics* **27**: 29–41.
100. Lopez-Gatius F., Yaniz J., Madriles-Helm D. (2003). Effects of body condition score and score change on the reproductive performance of dairy cows: a meta-analysis. *Theriogenology* **59**, 801–812.
101. Lucy M.C. (2000). Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *Journal of Dairy Science* **83**: 1635-1647.
102. Lucy M.C. (2003). Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reproduction Supplement* **61**: 415-427.
103. Lucy M.C., Beck J., Staples C.R., Head H.H., De La Sota R.L., Thatcher W.W. (1992). Follicular dynamics, plasma metabolites, hormones and insulin-like growth factor I (IGF-I) in lactating cows with positive or negative energy balance during preovulatory period. *Reproduction Nutrition and Development* **32**: 331-341.
104. Lucy M.C., Staples C.R., Michel F.M., Thatcher W.W. (1991). Effect of feeding calcium soaps to early postpartum dairy cows on plasma prostaglandin F_{2α}, luteinizing hormone, and follicular growth. *Journal of Dairy Science* **74**: 483-489.

105. Macciotta N.P., Mele M., Conte G., Serra A., Cassandro M., Dal Zotto R., Borlino A.C., Pagnacco G., Secchiari P. (2008). Association between a polymorphism at the stearoyl CoA desaturase locus and milk production traits in Italian Holsteins. *Journal of Dairy Science* **91**: 3184–3189.
106. Mansbridge R.J., Blake J.S. (1997). Nutritional factors affecting the fatty acid composition of bovine milk. *British Journal of Nutrition* **78**: S37-S47.
107. Martin G.G., Atshaves B.P., McIntosh A.L., Mackie J.T., Kier A.B., Schroeder F. (2006). Liver fatty acid binding protein gene ablation potentiates hepatic cholesterol accumulation in cholesterol-fed female mice. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* **290**, G36–G48.
108. Mattos R., Staples C.R., Thatcher W.W. (2000). Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Reviews of Reproduction* **5**: 38–45.
109. Murondoti A., Jorritsma R., Beynen A.C., Wensing T., Geelen M.J. (2004). Activities of the enzymes of hepatic gluconeogenesis in periparturient dairy cows with induced fatty liver. *Journal of Dairy Research* **71**: 129–134.
110. Neglia G, Gasparini B, Di Palo R, De Rosa C, Zicarelli L, Campanile G. (2003). Comparison of pregnancy rates with two estrus synchronization protocols in Italian Mediterranean Buffalo cows. *Theriogenology* **60**: 125-133.
111. Neglia G., Baruselli P.S., Carvalho N.A.T., Cavalcanti A.K.S., Prandi A., Gasparini B., Maiero S., Zicarelli L., Campanile G. (2004). Effect of negative energetic balance on ovarian steroid hormones and insulin-like growth factor in Murrah buffalo heifers. 15th International Congress on Animal reproduction (ICAR), Porto Seguro, Bahia, Brazil.
112. Otchere E.O., Mc Gilliard A.D., Young J.W. (1974). Quantitation of α -linked glucose polymers passing to the small intestine in cattle. *Journal of Dairy Science* **57**: 1189-1195.
113. Overton T.R., Waldron M.R. (2004). Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. *Journal of Dairy Science* **87** (E Suppl): E105–E119.
114. Owens F.N., Bergen G.W. (1983). Nitrogen Metabolism Of Ruminant Animals: Historical Perspective, Current Understanding And Future Implications. *Journal Of Animal Science* **57** (Suppl. 2).
115. Peters J.P., Elliot J.M. (1983). Effect of vitamin B12 status on performance of the lactating ewe and gluconeogenesis from propionate. *Journal of Dairy Science* **66**; 1917–1925.

116. Prins R.A., van Rheenen D.L., van Klooster A.T. (1983). Characterization of microbial proteolytic enzymes in the rumen. *A. van Leeuwenhoek* **49**: 585–595.
117. Pryce J.E., Coffey M.P., Brotherstone, S.H., Woolliams, J.A. (2002). Genetic Relationships Between Calving Interval and Body Condition Score Conditional on Milk Yield. *Journal of Dairy Science* **85**: 1590-1595.
118. Pryce J.E., Coffey M.P., Simm G. (2001). The relationship between body condition score and reproductive performance. *Journal of Dairy Science* **84**: 1508-15.
119. Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂alpha and GnRH. *Theriogenology*. 44: 915-923.
120. Raggio G., Lobley G.E., Berthiaume R., Pellerin D., Allard G., Dubreuil P., Lapierre H (2007). Effect of Protein Supply on Hepatic Synthesis of Plasma and Constitutive Proteins in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* **90**: 352–359.
121. Ramsay T.G., Caperna T.J. (2009). Ontogeny of adipokine expression in neonatal pig adipose tissue. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology* **152**: 72-78.
122. Reist M., Erdin D., von Euw D., Tschuemperlin K., Leuenberger H., Delavaud C., Chilliard Y., Hammon H.M., Kuenzi N., Blum J.W. (2003). Concentrate feeding strategy in lactating dairy cows: metabolic and endocrine changes with emphasis on leptin. *Journal of Dairy Science* **86**: 1690-1706.
123. Reynolds C.K., Aikman P.C., Lupoli B., Humphries D.J., Beever D.E. (2003). Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *Journal of Dairy Science* **86**: 1201–1217.
124. Reynolds C.K. (1995). Quantitative aspects of liver metabolism in ruminants. In: *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction: Proc. 8th Int. Symp. Ruminant Physiol.* W. v. Engelhardt, S. Leonhard-Marek, G. Breves and D. Giesecke, ed. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Germany: 351-371.
125. Reynolds C.K., Harmon D.L., Cecava M.J. (1994). Absorption and delivery of nutrients for milk protein synthesis by portal-drained viscera. *Journal of Dairy Science* **77**: 2787-2808.
126. Reynolds C.K., Kristensen N.B. (2009). Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: An asynchronous symbiosis. *Journal of Animal Science* **86**: E293-E305.

127. Roche J.R., Lee J.M., Macdonald K.A., Berry D.P. (2007). Relationships among body condition score, body weight, and milk production variables in pasture-based dairy cows. *Journal of Dairy Science* **90**: 3802-3815.
128. Rollin E., Berghaus R.D., Rapnicki P., Godden S.M., Overton M.W. (2010). The effect of injectable butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum serum b-hydroxybutyrate, calcium, and phosphorus concentrations in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **93**: 978-987.
129. Romagnolo D., Michael Akers R., Byatt J.C., Wong E.A., Turner J.D. (1994). IGF-I-Induced IGFBP-3 potentiates the mitogenic actions of IGF-I in mammary epithelial MD-IGF-I cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **102**: 131-139.
130. Sangsritavong S., Combs D.K., Sartori R., Armentano L.E., Wiltbank M.C. (2002). High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **85**: 2831-2842.
131. Sartori J.P., Sartori M.G., Baracat E.C., De Lima G.R., Girão M.J. (2004). Bladder neck mobility and functional evaluation of the pelvic floor in primiparae according to the type of delivery. *Clinical and Experimental obstetrics & gynecology Journal* **31**: 120-122.
132. Sastry N.S.R. (1988). Modern management for optimizing buffalo production. Proceedings II World Buffalo Congress, New Delhi, December, 2: 556-573.
133. Saxena N.K., Taliaferro-Smith L., Knight B.B., Merlin D., Anania F.A., O'Regan R.M., Sharma D. (2008). Bidirectional crosstalk between leptin and insulin-like growth factor-I signaling promotes invasion and migration of breast cancer cells via transactivation of epidermal growth factor receptor. *Cancer Research* **68**: 9712-9722.
134. Schrick F.N., Hockett M.E., Saxton A.M., Lewis M.J., Dowlen H.H., Oliver S.P. (2001). Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *Journal of Dairy Science* **84**: 1407-1412.
135. Sklan D., Kaim M., Moallen U., Folman Y. (1994). Effect of dietary calcium soaps on milk yield, body weight, reproductive hormones, and fertility in first parity and older cows. *Journal of Dairy Science* **77**: 1652-1660.
136. Sklan D., Moallem U., Folman Y. (1991). Effect of feeding calcium soaps of fatty acids on production and reproductive responses in high producing lactating cows. *Journal of Dairy Science* **74**: 510-518.
137. Spicer L.J., Alpizar E., Echternkamp S.E. (1993). Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro.

- Journal of Animal Science* **71**: 1232-1241.
138. Suttie J.M., Foster D.L., Veenvliet B.A., Manley T.R. & Corson I.D. (1991). Influence of food intake but independence of body weight on puberty in female sheep. *Journal of Reproduction and Fertility* **92**: 33-39.
139. Tamminga S. (1979). Protein degradation in the forestomachs of ruminants. *Journal of Animal Science* **49**: 1615–1630.
140. Taylor C.C., Allen M.S. (2005). Corn grain endosperm type and brown midrib 3 corn silage: site of digestion and ruminal digestion kinetics in lactating cows. *Journal of Dairy Science* **88**: 1413–1424.
141. Thissen J.P., Pucilowska J.B., Underwood L.E. (1994). Differential regulation of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein-1 messenger ribonucleic acids by amino acid availability and growth hormone in rat hepatocyte primary culture. *Endocrinology* **134**: 1570-1576.
142. Veenhuizen J.J., Drackley J.K., Richard M.J., Sanderson T.P., Miller L.D., Young J.W. (1991). Metabolic changes in blood and liver during development and early treatment of experimental fatty liver and ketosis in cows. *Journal of Dairy Science* **74**: 4238-4253.
143. Velez J.C., Donkin S.S. (2004) Bovine somatotropin increases hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **87**: 1325–1335.
144. Velez J.C., Donkin S.S. (2005). Feed restriction induces pyruvate carboxylase but not phosphoenolpyruvate carboxykinase in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **88**: 2938–2948.
145. Vernon R.G. (2005). Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *Journal of Dairy Research* **72**: 460–469.
146. Waldmann A, Reksen O, Landsverk K, Kommisrud E, Dahl E, Refsdal AO, Ropstad E. (2001). Progesterone concentrations in milk fat at first insemination--effects on non-return and repeat-breeding. *Animal Reproduction Science* **65**: 33-41.
147. Watford M., Hod Y., Chiao Y B, Utter M.F., Hanson R.W. (1981). The unique role of the kidney in gluconeogenesis in the chicken. The significance of a cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *The Journal of Biological Chemistry* **256**: 10023–10027.
148. Wathes D.C., Abayasekara D.R., Aitken, R.J. (2007a). Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biology of Reproduction* **77**: 190–201.

149. Wathes D.C., Bourne N., Cheng Z., Mann G.E., Taylor V.J., Coffey M.P. (2007b). Multiple correlation analyses of metabolic and endocrine profiles with fertility in primiparous and multiparous cows. *Journal of Dairy Science* **90**: 1310–1325.
150. Wathes D.C., Cheng Z., Bourne N., Taylor V.J., Coffey M.P., Brotherstone S. (2007c). 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 Animal Endocrinology* **33**: 203–225.
151. Wathes D.C., Cheng Z., Chowdhury W., Fenwick M.A., Fitzpatrick R., Morris D.G., Patton J., Murphy J.J. (2009). Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. *Physiological Genomics* **39**: 1–13.
152. Wathes D.C., Fenwick M., Cheng Z., Bourne N., Llewellyn S., Morris D.G., Kenny D., Murphy J., Fitzpatrick H. (2007d). Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology*. **68** (Suppl 1): S232-241.
153. White M.F. (2006). Regulating insulin signaling and beta-cell function through IRS proteins. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **84**: 725–737.
154. Young J.W. (1977). Gluconeogenesis in cattle: significance and methodology. *Journal of Dairy Science* **60**: 1–15.
155. Zafar A.H. (1985). Economics of rural dairy animals in the canal irrigated area of Punjab 1982-83. Livestock Production Research Institute, Okara Pakistan.
156. Zhao F.Q., Keating A.F. (2007). Functional properties and genomics of glucose transporters. *Current Genomics* **8**: 113-128.
157. Zhao F.Q., Okine E.K., Cheeseman C.I., Shirazi-Beechey S.P., Kennelly, J.J. (1998). Glucose transporter gene expression in lactating bovine gastrointestinal tract. *Journal of Animal Science* **76**: 2921–2929.
158. Zicarelli L. (1992). Considerazioni sull'allevamento bufalino. ERSAC editore.
159. Zicarelli L. (1994) Management in different environmental conditions. *Buffalo Journal* (Suppl. **2**): 17-38.
160. Zicarelli L. (1997). Reproductive seasonality in buffalo. In: Proceedings of the Third Course on Biotechnology of Reproduction in Buffaloes (Issue II): 29–52.
161. Zicarelli L. (2001). Nutrition in dairy buffaloes. Università degli studi Federico II, Facoltà di Medicina Veterinaria. Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli Alimenti.

162. Zicarelli L., Di Palo R., Campanile G., Boni R., Langella M. (1994). RBST+FSH-P in superovulatory treatment of Italian Mediterranean buffaloes. IV World Buffalo Congress, São Paulo, Brazil, June, 3: 459-461.