

**UNIVERSITÀ CATTOLICA DEL SACRO CUORE**

**Sede di Piacenza**

**Scuola di Dottorato per il Sistema Agro-alimentare**

**ciclo XXIV**

**S.S.D: AGR/19**

**Studio dei processi infiammatori nel periodo di transizione e  
dopo LPS 'Challenge' in bovine sottoposte a diversi stress  
metabolici**

**Tesi di Dottorato di: Luisa De Matteis  
Matricola: 3710438**

**Anno Accademico 2010/2011**



**UNIVERSITÀ CATTOLICA DEL SACRO CUORE**  
**Sede di Piacenza**

**Scuola di Dottorato per il Sistema Agro-alimentare**

**ciclo XXIV**

**S.S.D: AGR/19**

**Studio dei processi infiammatori nel periodo di transizione e  
dopo LPS 'Challenge' in bovine sottoposte a diversi stress  
metabolici**

**Tesi di Dottorato di: Luisa De Matteis**  
**Matricola: 3710438**

**Coordinatore: Ch.mo Prof. Romeo ASTORRI**

---

**Tutor: Prof. Giuseppe Bertoni**

**Anno Accademico 2010/2011**

**“... quanto più uno è consapevole della complessità della natura,  
tanto più è umile e cauto nel presentare le sue nuove scoperte”.**

**(Galileo Galilei dal “Saggiatore”)**

# INDICE

INTRODUZIONE	7
<b>CAPITOLO 1</b>	
<b>PROCESSO INFIAMMATORIO E MECCANISMI DI RISOLUZIONE</b>	
Descrizione degli eventi che comportano infiammazione	8
Lipossine	10
Resolvine	13
<b>CAPITOLO 2</b>	
<b>FASE DI TRANSIZIONE ED INFIAMMAZIONE NELLA BOVINA DA LATTE</b>	
Fase di transizione	15
Il Processo infiammatorio	17
La Risposta di fase acuta	20
Le citochine	22
TNF- $\alpha$	24
IL-1	25
IL-6	25
Infiammazione e funzionalità epatica	27
Processi metabolici nel periodo di transizione	29
ATTIVITA' DI RICERCA	33

### **CAPITOLO 3**

#### **VARIAZIONI EMATICHE DELLE PRINCIPALI CITOCHINE PRO- INFIAMMATORIE NEL PERIPARTO DI BOVINE DA LATTE**

INTRODUZIONE	34
SCOPO	36
MATERIALI E METODI	36
Analisi ematiche	37
ANALISI STATISTICA	38
RISULTATI	40
DISCUSSIONE	65
CONCLUSIONI	68

### **CAPITOLO 4**

#### **ANDAMENTO DI ALCUNI MARCATORI NEI PROCESSI DI RISOLUZIONE DELL'INFIAMMAZIONE NEL PERIPARTO**

INTRODUZIONE	69
SCOPO	70
MATERIALI E METODI	70
Analisi ematiche	71
Stima dell'indice Processi Infiammatori e delle Conseguenze Epatiche (PICE)	72
ANALISI STATISTICA	73
RISULTATI	75
DISCUSSIONE	104
CONCLUSIONI	108

## CAPITOLO 5

### **STUDIO DEGLI EFFETTI E/O CONSEGUENZE DELLO STATO METABOLICO SUL PROCESSO INFIAMMATOARIO VALUTANDO LE RISPOSTE AL CHALLENGE CON LPS INTRAMAMARIO DURANTE INFUSIONE A LUNGO TERMINE CON INSULINA, GLUCOSIO E CORPI CHETONICI.**

INTRODUZIONE	109
SCOPO	111
MATERIALI E METODI	111
ANALISI STATISTICA	115
RISULTATI	116
DISCUSSIONE	128
CONCLUSIONI	132
<b>CONSIDERAZIONI FINALI</b>	133
<b>APPENDICE</b>	135
<b>ELENCO ABBREVIAZIONI</b>	148
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	150
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	159

## **INTRODUZIONE**

Il processo infiammatorio è un meccanismo di difesa aspecifico innato, che costituisce una risposta protettiva dell'organismo ad un evento patologico (Calder, 2002), quale l'invasione di un patogeno (batteri, virus, funghi) o la presenza di tossine, ma anche a seguito di vari tipi di insulto che non dipendono da cause infettive (trauma, ustioni, malattie autoimmuni, stress etc.). Generalmente tutte le bovine da latte in fase di transizione, con o senza sintomi clinici evidenti, manifestano una risposta di fase acuta più o meno severa appena prima del parto o immediatamente dopo di esso. Le ragioni sono molteplici tra cui certamente figurano stress, bilancio energetico negativo, immunosoppressione, traumi. Indipendentemente dalla genesi, tale condizione influisce negativamente sul metabolismo, sulla salute e sull'attività produttiva e riproduttiva della bovina da latte, contribuendo alla comparsa di malattie metaboliche (es. chetosi) ed infettive (es. mastiti) nella fase di transizione.

La risposta di fase acuta (APR) rappresenta la prima reazione dell'organismo ad una serie di disturbi locali e sistemici nella sua omeostasi, essa consiste di una reazione locale caratterizzata da una serie di risposte come aggregazione delle piastrine, formazione del coagulo ed attivazione delle cellule del sistema immunitario (macrofagi e granulociti) che a loro volta determinano il rilascio delle citochine pro-infiammatorie, non che da una reazione sistemica caratterizzata dalla comparsa di febbre, anoressia, incrementi nella secrezione di ACTH, attivazione del sistema complemento e cambiamenti severi nella concentrazione delle proteine di fase acuta. L'APR è ritenuta una reazione benefica dell'organismo, volta a prevenire un ulteriore danno all'organo, isolare e distruggere l'agente infettivo, rimuovere le molecole dannose, attivare i processi di riparazione affinché l'organo possa riprendere la sua normale funzione, in modo da ripristinare al più presto l'omeostasi. Tuttavia, quando tale risposta di fase acuta è eccessiva causa danni gravi all'organismo.

Da qui nasce l'interesse di ampliare le conoscenze sulle cause che inducono la comparsa di una risposta di fase acuta più o meno severa nella bovina da latte e sul rilascio di alcuni mediatori endogeni anti-infiammatori, in grado di promuovere la risoluzione del processo infiammatorio. Ciò al fine di poter individuare parametri utili ad una più rapida individuazione dei soggetti maggiormente suscettibili ai processi infiammatori e con le più gravi ricadute sulle performance e sul benessere animale.

# CAPITOLO 1

## PROCESSO INFIAMMATORIO E MECCANISMI DI RISOLUZIONE

### 1.1 Descrizione degli eventi che comportano infiammazione

Il processo infiammatorio è un meccanismo di difesa aspecifico innato, che costituisce una risposta protettiva dell'organismo ad un evento patologico (Calder, 2002), quale l'invasione di un patogeno (batteri, virus, funghi), la presenza di endotossine e di vari tipi di insulto (trauma, ustioni, malattie autoimmuni, stress etc.). Lo scopo di tale reazione è la distruzione dell'ospite indesiderato ed il ripristino dell'omeostasi. (Elsasser e coll., 1997).

I segni tradizionali e caratterizzanti un processo infiammatorio sono noti da molto tempo e risalgono alle osservazioni cliniche di Aulo Cornelio Celso (I sec.d.C.), che li ha così riassunti: *rubor* (arrossamento), *calor* (calore), *tumor* (rigonfiamento o edema), *dolor* (dolore) e *functio lesa* (perdita delle lesioni). Gli stati di *rubor* e *calor* sono dovuti all'iperemia tessutale attiva e passiva, cioè allo stato di maggior ripienezza dei vasi a seguito di un maggiore afflusso di sangue ed alla emoconcentrazione (*inspissatio sanguinis*), a cui segue una graduale diminuzione del flusso sanguigno sino alla sua stasi. Il *tumor*, si stabilisce in un secondo momento e deriva in parte dall'iperemia ed in parte dall'accumulo di essudato. Il quarto segno o *dolor*, esprime l'azione sulle terminazioni nervose da parte della tumefazione, mentre la *functio lesa* non è altro che la conseguenza dei suddetti fenomeni che determinano la compromissione delle normali funzioni dell'organo o del tessuto danneggiato. Con l'instaurarsi della reazione microcircolatoria, ha inizio il flusso di proteine plasmatiche (es. albumine, globuline) e di leucociti dal sangue ai tessuti extravascolari, regolato dal rilascio sequenziale di sostanze dalle svariate proprietà oltre a all'azione vasoattiva (es. istamina, eicosanoidi, ossido nitrico e mediatori chemiotattici quali le frazioni C3a e C5a del complemento, le molecole di adesione, le citochine etc.). Le prime cellule a raggiungere i siti bersaglio sono i granulociti, con i monociti, macrofagi e i linfociti. I granulociti, i monociti ed (i macrofagi) sono coinvolti nell'uccisione dell'agente patogeno, nell'eliminazione dei detriti cellulari e tissutali ed infine nella riparazione tissutale. L'attività di queste cellule è indotta da una serie di fattori innescanti (es. microbi, endotossine batteriche, danno tissutale, trauma etc.) che inducono i macrofagi a secernere le citochine pro-infiammatorie (es: IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ); ed altri mediatori, tra cui quelli lipidici (es: prostaglandine E2 e D2, leucotrieni, trombossano, fattore di attivazione delle piastrine, etc.) (Calder; 2006).



La sintesi degli eicosanoidi è correlata alla presenza di precursori (es. acidi grassi omega 6 ed omega 3), presenti nelle membrane cellulari. Infatti, a seguito di sollecitazioni di varia origine (infettiva, traumatica, metabolica, ormonale, etc.) a livello di tali membrane vengono attivati enzimi specifici, quali la fosfolipasi A2 citosolica (PLA2). Questo enzima determina il rilascio nel microambiente (sia intracellulare che extracellulare) degli acidi grassi polinsaturi a lunga catena. Dall'acido linoleico ( $\omega$ -6) derivano l'acido gamma-linoleico, il diomogammalinoleico e l'acido arachidonico (AA). Durante i processi di flogosi, questi vengono trasformati dalle cicloossigenasi (COX) e dalle lipossigenasi (LOX) in vari eicosanoidi con azione pro-infiammatoria (trombossani della serie- 1 e 2, prostaglandine della serie- 1 e 2, i leucotreni della serie- 3 e 4 ed il fattore di attivazione delle piastrine) (Caramia e coll., 2007).

Serhan (2005; Fig.1) e Calder (2006) nei loro studi, hanno dimostrato che gli acidi grassi polinsaturi  $\omega$ -3 riducono la produzione di mediatori pro-infiammatori (es. eicosanoidi, citochine e specie reattive dell'ossigeno), l'espressione delle molecole di adesione (es. molecola di adesione intercellulare 1, molecola di adesione cellulare vascolare, e la E-selectina) e di conseguenza anche le specie reattive dell'ossigeno; mentre dall'altra parte entrambe le classi di polinsaturi  $\omega$ -6 ed  $\omega$ -3 danno origine a famiglie di mediatori anti-infiammatori chiamati *lipossine*, *resolvine*, *protectine* e/o *neuroprotectine* (quando sono generate nei tessuti neurali). Infatti, in seguito ad un evento infiammatorio, le prostaglandine pro-infiammatorie (PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub>), svolgono le seguenti funzioni: induzione della cicloossigenasi 2 (COX-2); produzione dell'IL-6 da parte dei macrofagi; inibizione della 5-lipossigenasi (5-LOX); riduzione della produzione di leucotrieni della serie-4 (LTs-4); ed infine induzione del cambiamento sulla trascrizione di enzimi preposti alla sintesi di altre classi di eicosanoidi con azione anti-infiammatoria (Serhan e coll., 2000; Hong e coll., 2003).

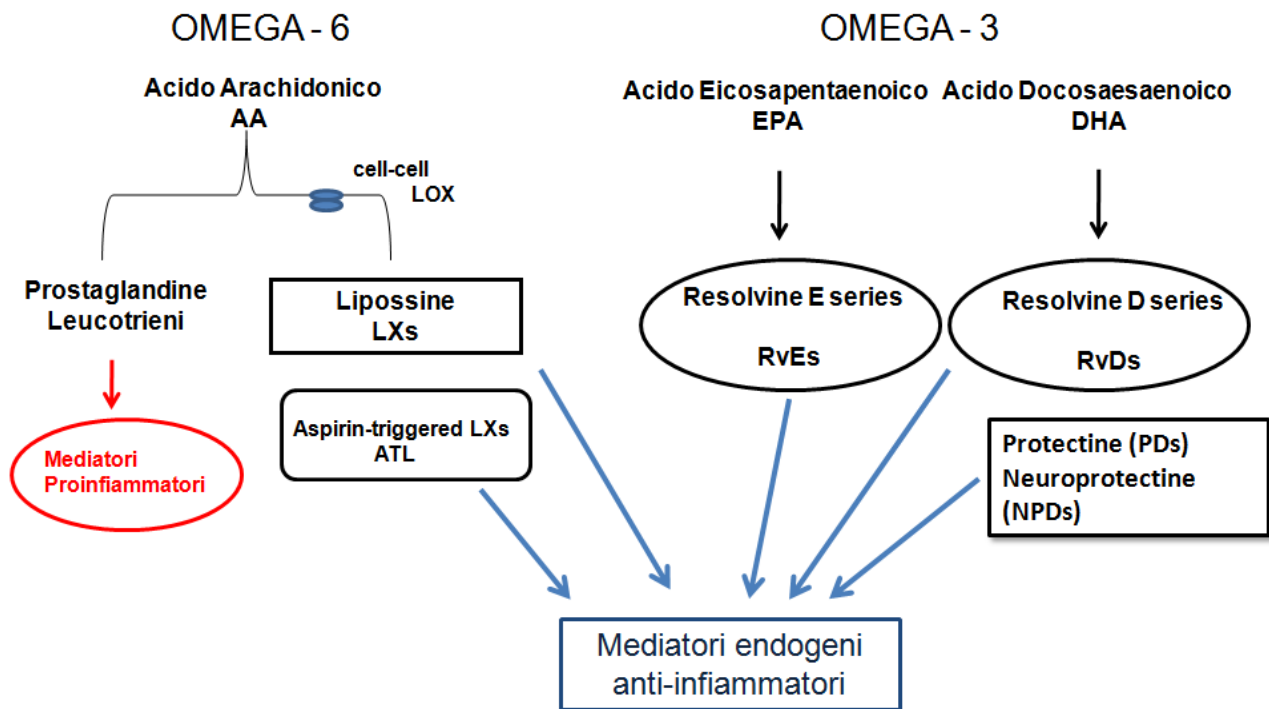


FIGURA 1 Funzione degli acidi grassi polinsaturi essenziali nella produzione di famiglie di mediatori lipidici anti-infiammatori (Serhan e coll., 2005).

## 1.2 LE LIPOSSINE

Le lipossine (LXs) ed i loro epimeri (ATL) indotti dall'aspirina sono state le prime ad essere isolate nel 1984 e sono mediatori lipidici derivati dall'AA che agiscono per ridurre l'infiammazione; promuovono la risoluzione; svolgono azioni protettive anti-infiammatorie ed agiscono come 'segnali stop' nell'infiammazione (Schwab e coll., 2006).

Nell'uomo, la biosintesi delle LXs (Serhan, 1997; Fig. 2) ha luogo attraverso tre tipi di meccanismi che possono avvenire indipendentemente e/o contemporaneamente:

1. In primo luogo, le LXs possono essere generate da un meccanismo che prevede l'aggiunta di ossigeno molecolare nella posizione C15 dell'AA. Questo processo implica il coinvolgimento della 15-lipossigenasi (15-LOX) (Serhan e coll., 1997). La 15-LOX è presente negli eosinofili, macrofagi alveolari, monociti e cellule epiteliali ed è controllata da citochine anti-infiammatorie, principalmente dalle interleuchine 4 e 13 (IL-4 e IL-13). L'ossigenazione dell'AA alla posizione C15 determina la formazione di 15-HpETE, che viene usato come substrato dalla 5-LOX. Il prodotto dell'azione della 5-LOX sul 15-HpETE è un 5S-idroperossi, 15S-idro(perossi)-DiH(p)ETE, che viene rapidamente convertito a 5,6-epossitetraene. Anche la 5-LOX è regolata da citochine come GM-CSF e IL-3, ed è espressa soprattutto nei neutrofili e nei monociti. Una volta che si è formato il

5(6)-epossitetraene, viene rapidamente convertito a 5S, 6R, 15S-tridrossi-7, 9, 13-*trans*-11-*cis*-acido eicosatetraenoico, chiamato lipossina A4 (LXA4) e/o, attraverso l'idrolasi lipossina B4, a 5S,14R,15S-tridrossi-6,10,12-*trans*-8-*cis*-acido eicosatetraenoico, chiamata anche lipossina B4 (LXB4). Quando le LXs sono generate dai neutrofili, dalla conversione di 15-HETE, la formazione dei leucotrieni viene inibita, mentre le LXs vengono rilasciate. Esse, inoltre, bloccano l'azione sia del LTB4 sia del peptidoleucotriene LTD4.

2. Il secondo processo che porta alla formazione delle LXs avviene quando è presente l'interazione tra neutrofili e piastrine. In questo caso, sono coinvolti la 5-LOX, presente nei neutrofili e la 12-LOX, presente in elevata quantità nelle piastrine. Il leucotriene A4 (LTA4), formato dalla 5-LOX, una volta rilasciato dai leucociti nell'ambiente extracellulare viene convertito attraverso la 12-LOX, dalle piastrine PMN-aderenti ad un catione intermedio. In questo caso, la 12-LOX funge da lipossina sintasi; infatti, quest'ultima sottrae l'idrogeno dal carbonio 13 ed inserisce l'ossigeno molecolare in posizione C15 del LTA4 convertendolo in un catione carbonio intermedio che libera sia la LXB4, quando è attaccato dall'acqua alla posizione C14, o la LXA4, quando è attaccato dall'acqua alla posizione C6. Quindi la 12-LOX converte LTA4 a LXA4 e a LXB4.

3. Infine, nel terzo processo biosintetico è coinvolta la cicloossigenasi-2 (COX2). Quest'ultima quando indotta nelle cellule endoteliali o epiteliali attraverso le citochine pro-infiammatorie (come IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$ ), cambia la sua attività catalitica in presenza dell'aspirina, generando 15R-HETE. In particolare, la COX2 acetilata converte l'acido arachidonico endogeno a 15R-HETE, che viene rilasciato e trasformato attraverso processi transcellulari in 15-epi-LXs dai neutrofili. In particolare, i neutrofili attivati, che producono 5-LOX, trasformano 15R-HETE a 5(6)-epossitetraene, che porta il suo gruppo alcolico in posizione C15 nella configurazione R. Questo intermedio conduce alla formazione sia di 15R-epi-lipossina A4 (15R-epi-LXA4) sia di 15R-epi-lipossina B4 (15R-epi-LXB4). La lipossina 15R-epi-LXA4 è tuttavia più potente rispetto alla LXA4 nell'inibire l'adesione dei neutrofili alle cellule endoteliali, inoltre la 15R-epi-LXB4 è un inibitore della proliferazione cellulare.

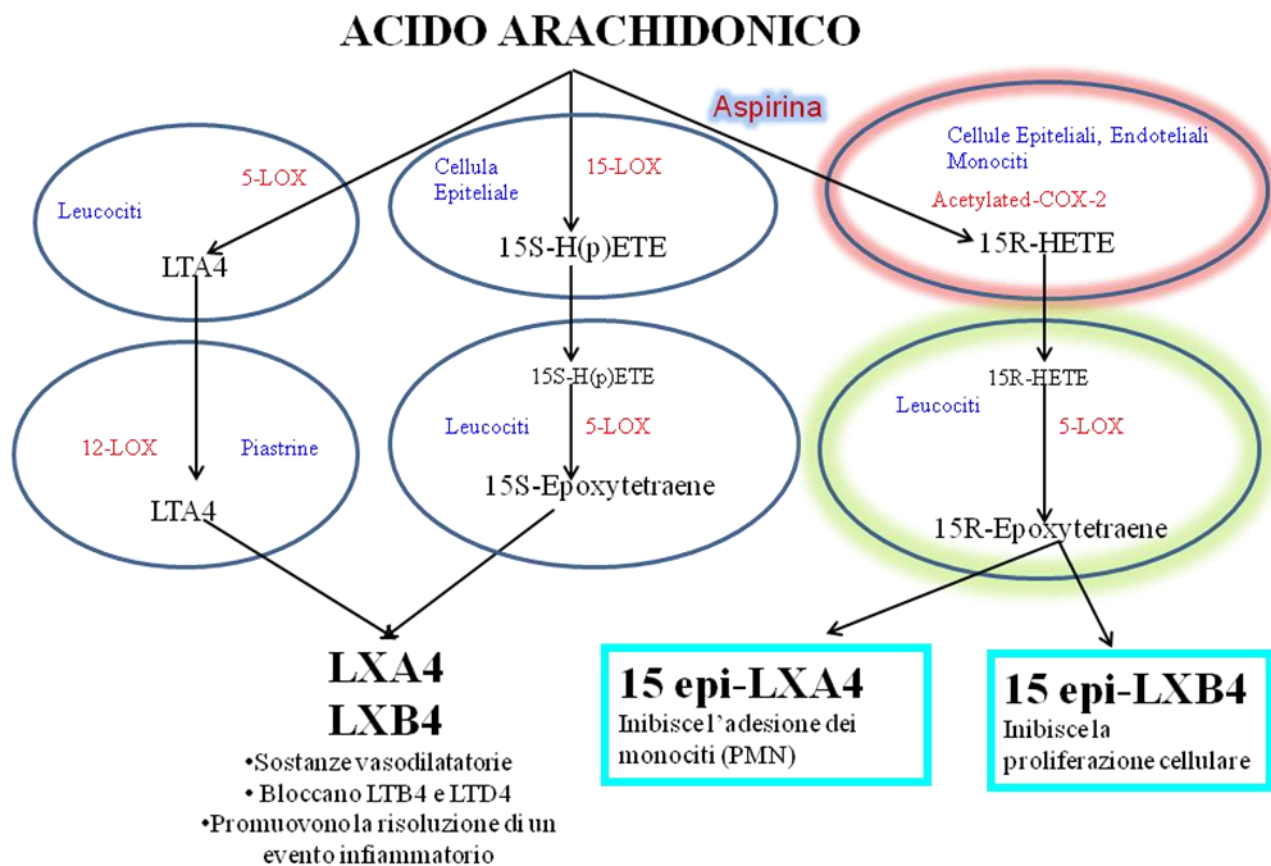


Fig.2 Rappresentazione schematica della sintesi delle lipossine (Serhan, 1997)

Le LXs e i loro rispettivi epimeri, una volta prodotti, sono generate durante la risoluzione di un processo infiammatorio ed esercitano le seguenti attività anti-infiammatorie (Serhan., 2005):

- si legano a specifici recettori dei leucociti, cellule endoteliali ed epiteliali, fibroblasti, regolando la loro funzione;
- inibiscono l'infiammazione mediata dai neutrofili a livello polmonare, renale e della cute;
- stimolano la fagocitosi dei leucociti polimorfonucleati (PMN) ad opera dei macrofagi;
- regolano la produzione di citochine e chemiochine;
- bloccano l'attività del TNF- $\alpha$ ;
- inibiscono la proliferazione delle cellule tumorali;
- favoriscono la risoluzione dell'edema polmonare;
- hanno proprietà anti-angiogenica.

### 1.3 LE RESOLVINE

Oltre alle LXs, recentemente sono state identificate una nuova classe di mediatori lipidici, generati da processi enzimatici a carico degli acidi grassi  $\omega 3$ . Questi nuovi composti denominati rispettivamente *resolvine* e *protectine*, sono in grado di svolgere azioni anti-infiammatoria ed immunoregulatorie, le quali includono riduzione del traffico dei neutrofilo, regolazione delle citochine e specie reattive dell'ossigeno, come pure riduzione della severità delle risposte infiammatorie in vivo (Serhan e coll., 2006; Fig. 3).

Si distinguono due tipi di resolvine: le resolvine della serie-E (RvE1) derivano dall'acido eicosapentaenoico (EPA) e resolvine della serie-D che derivano dall'acido docosaesaenoico (DHA). La generazione di questi composti è incrementata in presenza dell'aspirina, infatti le cellule endoteliali trattate con aspirina convertono l'EPA a 18R-idroperossi-EPE che è ridotto a 18R-HEPE e viene rilasciato dall'endotelio e rapidamente convertito dai leucociti polimorfonucleati ad un composto intermedio 5(6)-epossido che è poi ulteriormente trasformato a 5,12,18R-triidrossi-EPE ossia a resolvina E1 (RvE1). In assenza dell'aspirina, il 18R-HEPE può essere prodotto attraverso un meccanismo P450 ed è stato identificato come RvE2 (Serhan e coll., 2004).

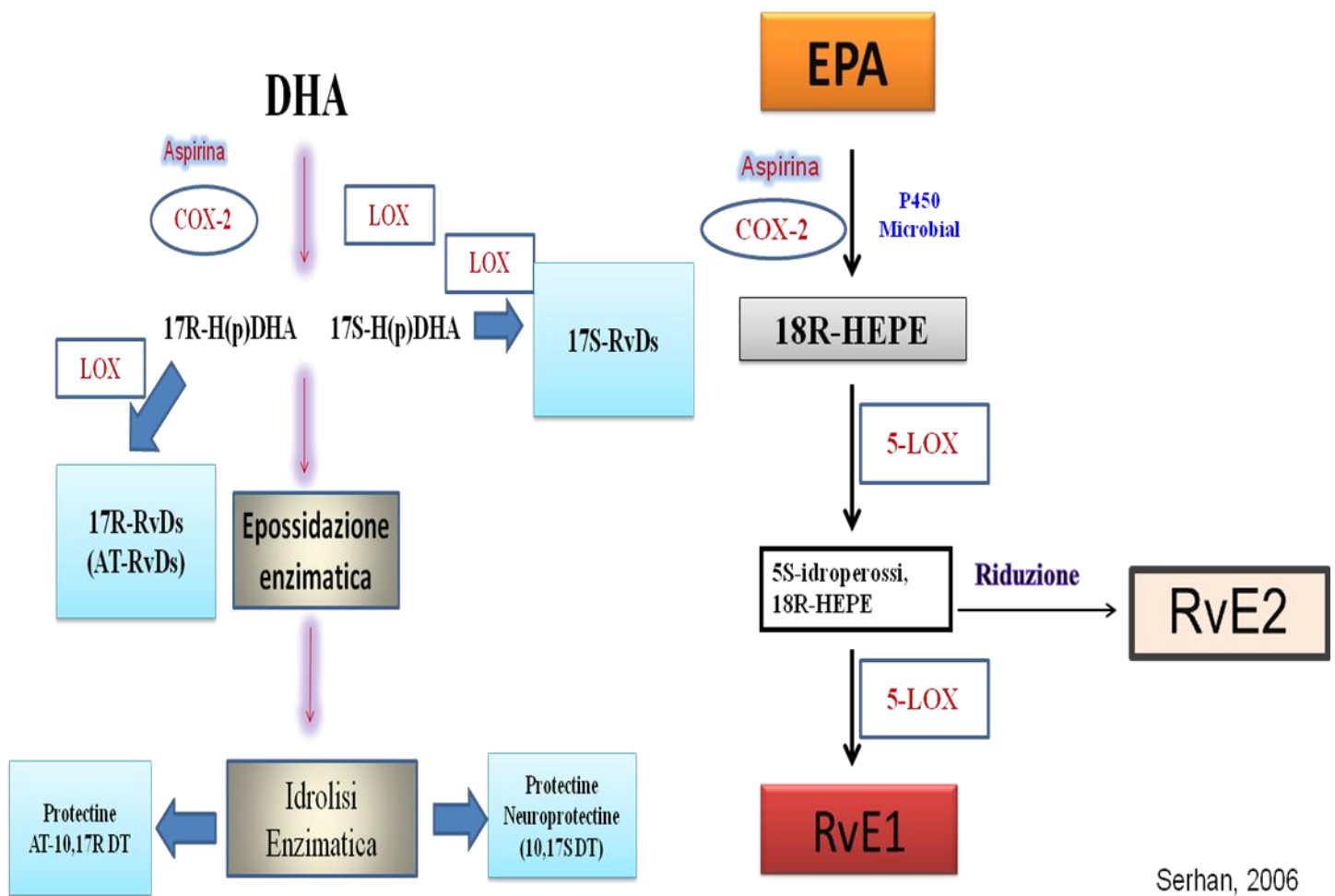
Tuttavia, le cellule endoteliali trattate con aspirina convertono il DHA in 17R-idrossi-DHA per azione della COX2 acetilata la quale porta alla formazione di 17R-resolvine serie D. Quest'ultimo, quando è ossigenato al carbonio 7 e 4 conduce alla formazione degli epimeri delle resolvine, ossia AT-RvDs. Infine dal DHA si originano per azione di un processo mediato dalla LOX, anche le protectine (PD1), denominate anche docosatrieni (DT) in quanto contengono una struttura trienica, e le neuroprotectine (NPD1), prodotte dalle cellule nervose (Serhan e coll., 2008), entrambe coinvolte nel processo di risoluzione dell'infiammazione.

Le resolvine, le protectine e i loro rispettivi epimeri svolgono le seguenti azioni:

- promuovono la risoluzione del processo infiammatorio;
- favoriscono la produzione di citochine anti-infiammatorie (IL-10 e TGF $\beta$ 1);
- proteggono i tessuti dall'infiltrazione di leucociti (PMN) e dalle lesioni determinate dai neutrofilo;
- riducono l'afflusso e il numero dei PMN negli essudati contrastandone l'attivazione;
- inibiscono la secrezione di composti pro-infiammatori compresi IL-12p40, TNF- $\alpha$  e l'interferon- $\gamma$ ;

- inibiscono l'attivazione del fattore nucleare-Kb (NF-kB), coinvolto nella trascrizione di geni codificanti citochine e proteine pro-infiammatorie;
- bloccano in vivo la migrazione dei linfociti T;
- promuovono la risoluzione del processo infiammatorio.

Durante l'attivazione di un processo infiammatorio, questi mediatori lipidici danno luogo ad una serie di eventi chiamati *catabasis*, cioè risoluzione del processo infiammatorio, con riduzione del numero di neutrofili affluiti alla sede di infiammazione e accelerazione del ritorno alla normalità delle strutture coinvolte (Serhan e coll., 2004).



Serhan, 2006

Fig.3 Rappresentazione schematica della sintesi delle resolvine a partire dagli acidi grassi polisaturati  $\omega$ -3 (Serhan, 2006)

## CAPITOLO 2

### FASE DI TRANSIZIONE ED INFIAMMAZIONE NELLA BOVINA DA LATTE

#### 2.1 Fase di transizione

La fase di transizione è il periodo che intercorre tra le tre settimane che precedono e le tre settimane che seguono il parto (Grummer, 1995). Tale fase è determinante per la complessiva redditività dell'allevamento in quanto si caratterizza notoriamente come la fase con la maggior frequenza di patologie con conseguenze più o meno gravi sulla produzione, sulla fertilità e sulla longevità delle bovine. Essa è conosciuta in modo molto limitato sia rispetto alle conoscenze delle vacche durante e dopo il picco della lattazione sia per definire programmi di alimentazione idonei per consentire alle bovine di affrontare al meglio questo periodo. Storicamente, i ricercatori non hanno prestato molta attenzione a questa fase quando conducevano studi nutrizionali o di gestione, preferendo concentrarsi sul periodo dell'asciutta o sul periodo della lattazione dopo le prime due o tre settimane dal parto. La sfida più grande della fase di transizione è rappresentata dalle rapide successioni degli eventi e dai repentini cambiamenti dello stato fisiologico, tanto che la maggior parte degli adattamenti si completa entro un periodo di quattro settimane (da due settimane prima a due settimane dopo il parto). Misurazioni durante questo periodo sono tipicamente soggette di un'elevata variabilità, che riflettono le differenze tra le singole bovine nell'adattarsi con successo alla lattazione. Infatti, coefficienti di variazione dell'ingestione di sostanza secca (DMI = Dry Matter Intake) durante la prima settimana dopo il parto sono nell'ordine del 30-40%, mentre i coefficienti tipici di variazione per il DMI dopo il picco della lattazione, oscillano tra il 6 ed il 10%. L'alta incidenza di problemi di salute durante questo periodo, contribuisce alle variazioni del DMI, della produzione di latte e delle risposte alle cure praticate.

La mancanza di misurazioni appropriate per eseguire l'analisi della covarianza rende le analisi statistiche più difficoltose e richiede un maggior numero di soggetti per ottenere differenze statisticamente significative. Pertanto viene richiesto un gran numero di vacche per valutare l'impatto dell'alimentazione e della gestione sull'incidenza di problemi sanitari e sui risultati riproduttivi. Infine, l'effetto delle cure può essere confuso con l'effetto dovuto ai cambiamenti di attrezzature ed ambienti nei quali le vacche vengono spostate durante il periodo di transizione.

A causa della relativa scarsità di ricerche ci sono numerose lacune nella conoscenza fondamentale della biologia della bovina durante il periodo di transizione. Infatti, ancora oggi non si è trovata risposta alle seguenti questioni: Perché programmi alimentari e di gestione ampiamente differenti producono risultati talora similmente buoni e talora similmente scadenti nel periodo di transizione? Quali sono i meccanismi nascosti che portano all'insorgenza di malattie metaboliche ed infettive come la dislocazione dell'abomaso, chetosi, ritenzione degli invogli fetali, collasso puerperale e mastiti? Che cosa controlla il DMI durante il periodo di transizione? Come fanno il limitato DMI e l'ipertrofia gastrointestinale durante questo periodo a far fronte all'impatto delle sostanze nutritive (es. produzione di AGV e proteina microbica)? Quale è la reazione del sistema immunitario ai cambiamenti metabolici che hanno luogo nel periodo di transizione? Quali sono i meccanismi implicati nella immunosoppressione associati al periodo del periparto? Quanta importanza ricopre la componente genetica nei differenti risultati nel periodo di transizione? Può l'attuale aumento di consanguineità nelle mandrie di Frisone portare ad un aumento della suscettibilità alle malattie del periodo del periparto? Infine l'aumento delle conoscenze dei processi biologici che hanno luogo in tale fase potrebbe consentire di definire programmi di alimentazione e di gestione più efficaci per superare il periodo di transizione con successo?

Poiché questo non è un elenco esaustivo ed i relativi livelli di conoscenza circa queste aree di ricerca variano, queste domande hanno il significato di mettere in evidenza le potenziali interazioni tra tutti i campi relativi alla biologia della vacca da latte sui risultati e sulle implicazioni del periodo di transizione.



## 2.2 Il processo infiammatorio

L'infiammazione è stata descritta da Aulo Cornelio Celso (I sec. d.C.) nel seguente modo: “rubor et tumor cum calore et dolore”. I suoi scopi principali sono: isolare e distruggere l'agente infettivo, rimuovere le molecole dannose e i detriti ed attivare i processi di riparazione che sono necessari affinché l'organo riprenda la sua normale funzione.

La fase di transizione è caratterizzata da condizioni infiammatorie, indotte dal rilascio di citochine pro-infiammatorie (PICs = Pro-inflammatory Cytokines) (Bertoni e coll., 2008).

Esistono differenti tipi di cause (es trauma, endotossine, malattie infettive e metaboliche, ustioni, alcune sostanze tossiche ecc.) e di stress (es. ossidazione, intenso esercizio fisico, caldo ecc.) che possono indurre una risposta infiammatoria nella bovina da latte in fase di transizione. In particolare, nel periodo di transizione, ogni tipo di disordine, sebbene apparentemente modesto o originato da agenti non così dannosi (es. comuni parassiti o infezioni, modeste lesioni o danni, piccoli errori alimentari ecc.) possono contribuire alla comparsa di processi infiammatori. In quanto, ogni stimolo attivante l'infiammazione causa una diversa espressione di alcuni geni coinvolti, soprattutto attraverso l'attivazione del NF- $\kappa$ B, un fattore di trascrizione associato con l'infiammazione (Lindström & Bennett, 2005) che promuove il rilascio di PICs e di diverse altre proteine relative all'infiammazione (es. monocyte chemoattractant Protein-1, una forma inducibile di ciclo-ossigenasi (COX), una forma inducibile di ossido nitrico sintasi, NOS-2, con una elevata produzione di ossido nitrico, molecola di adesione ICAM-1; Elewaut e coll., 1999). Così, le PICs sono responsabili della loro ulteriore sintesi e, quindi, dell'amplificazione dell'infiammazione stessa.

Eventi che, nella bovina da latte in fase di transizione, potrebbero indurre il rilascio di PICs, quindi l'infiammazione, possono essere i seguenti (Trevisi e coll., 2011):

- differenziazione e proliferazione della ghiandola mammaria. E' stato infatti osservato che nelle ultime due settimane di gestazione, in concomitanza con lo sviluppo della ghiandola mammaria si verifica un piccolo aumento della temperatura corporea (circa +0.3-0.5 °C) e talvolta anche un lieve incremento dei livelli plasmatici di aptoglobina, una proteina di fase acuta positiva. Tali eventi sistemici potrebbero rappresentare uno dei primi segni della comparsa di infiammazione. Infatti è noto che lo sviluppo della ghiandola mammaria è un processo che presenta caratteristiche in comune con l'infiammazione anche se la possibile relazione tra questi due eventi infiammatori non è stata ancora investigata;

- interazioni utero-placenta. Simpson e coll., (1998) hanno identificato una produzione basale di citochine sia pro- che anti-infiammatorie al parto, in particolare, la placenta, durante la sua intera vita, è capace di produrre citochine per migliorare la sua funzione. Sia l'infiammazione che il parto sono associati all'attività del NF-kB e quindi all'espressione di geni pro-infiammatori nelle cellule della placenta;

- sforzo fisico durante il parto come anche la comparsa di possibili traumi in seguito ad un parto difficile o distocico. Infatti, alcuni ricercatori hanno osservato che un esercizio fisico faticoso può indurre un incrementato rilascio di citochine pro-infiammatorie ed anti-infiammatorie (Pedersen e coll., 1998). Inoltre può causare una compromissione dell'integrità della mucosa intestinale, incrementando la sua permeabilità. L'estenuante esercizio fisico al momento del parto può infatti determinare diverse conseguenze, come elevati livelli di glucocorticoidi, ridotto flusso sanguigno, ipertermia, ipossia, stress ossidativo e nitrosativo come pure assorbimento di lipopolisaccaridi, che promuovono il rilascio di PICs. Nella bovina da latte, tale prolungata attività fisica può manifestarsi in caso di difficoltà al parto o parto distocico. Questo challenge fisico, accompagnato da altri disturbi tipici al momento del parto (es. trauma, stress fisiologico, disordine digestivo ecc.) può indurre al rilascio di PICs e quindi all'infiammazione;

- immunosoppressione, come una possibile causa di più frequenti infezioni. Infatti esiste una stretta correlazione tra la comparsa di infezioni e uno stato di immunosoppressione. Diversi studi hanno osservato una minore attitudine dei linfociti e dei neutrofili nel rispondere ai challenge infettivi in bovine da latte nel periparto, ciò potrebbe fornire una spiegazione dell'alta incidenza di malattie infettive (es. metriti e mastiti) durante la fase iniziale di lattazione (Lacetera e coll., 2005; Mallard e coll., 1998). Le principali cause che contribuiscono all'immunosoppressione nel periodo di transizione sono: incrementata concentrazione di cortisolo circolante per diverse ore intorno al parto; disordini metabolici (es. NEB, ipocalcemia ecc.); frequente inadeguata assunzione di alimento nonostante un'incrementata richiesta di energia durante la gravidanza e per l'avvio della lattazione; ridotta assunzione di nutrienti immunomodulanti (vitamine A ed E, selenio, rame e zinco); disordini digestivi dovuti ai cambiamenti dietetici; stress ossidativo con il rischio di danno per le membrane di cellule immunitarie; stress ambientale derivato da un cattivo management nelle fasi di asciutta e lattazione nella bovina da latte. Alcune di queste cause possono accadere al momento del parto o immediatamente dopo, per cui ci possono essere ulteriori cause di immunosoppressione, considerando che segni di una non regolare risposta immunitaria innata inizia 2-3 settimane

prima del parto. In questo scenario, prove convincenti suggeriscono che uno dei maggiori fattori scatenanti l'immunosoppressione nel periparto può essere il NEB (Trevisi e coll., 2011; Lacetera e coll., 2005). Inoltre, alcuni studi sono stati compiuti per stabilire le possibili relazioni di causa-effetto tra il NEB e il danneggiamento della risposta immunitaria nelle bovine da latte in transizione. In particolare, Wathes e coll., (2009) hanno riportato che diversi geni coinvolti nella risposta infiammatoria sono sovra-espressi in bovine sottoposte a condizioni di NEB, mentre Moyes e coll., (2010) hanno affermato che la maggior parte dei geni coinvolti nella risposta immunitaria acquisita sono sotto-espressi nelle bovine in NEB. Infine alcuni studi indicano che anche le bovine in chetosi sono immunosopresse, e tale immunosoppressione sembrerebbe essere dovuta ad un incremento nella concentrazione di alcuni metaboliti energetici, quali i corpi chetonici (es.  $\beta$ -idrossi-butirrato o BOHB) e gli acidi grassi non esterificati (NEFA; Suriyasathaporn e coll., 1999; Lacetera e coll., 2004). Recentemente, Ospina e coll. (2010), nei loro studi, indicano che le concentrazioni plasmatiche di NEFA superiori di 0.3 o 0.6 mmol/l prima e dopo il parto, sono rispettivamente associate ad un incrementato rischio di malattie metaboliche ed infettive (es. chetosi clinica, dislocazione dell'abomaso, ritenzione placentale e metriti). Infine Duffield e coll., (2009) affermano che l'iperchetonemia, intesa come aumento dei livelli plasmatici di BOHB superiori a 1,4 mmol/l, nelle prime due settimane postpartum non solo incrementa il rischio di comparsa di malattie metaboliche, ma induce anche una sostanziale perdita di produzione lattea nelle prime settimane di lattazione, ridotta fertilità ed un incrementato rischio di dislocazione dell'abomaso.

### 2.3 La risposta di fase acuta

Il processo infiammatorio induce una deviazione nella sintesi di proteine da parte del fegato, che è l'organo in cui vengono sintetizzate proteine fondamentali: alcune in modo ordinario, altre a seguito di eventi infiammatori che lo sollecitano, originando la risposta di fase acuta (APR). In particolare, se ciò accade al momento del parto, pur continuando a funzionare, il fegato per produrre aptoglobina, siero amiloide  $\alpha$  e proteina C reattiva, riduce la produzione delle usuali proteine, quali le lipoproteine, le albumine, la paraoxonasi (PON), gli enzimi preposti alla escrezione della bilirubina ecc., accrescendo il rischio di steatosi e di chetosi (Bertoni e coll., 1990; Goff & Horst, 1997).

La APR (Heinrich e coll., 1990; Fig.4) rappresenta la prima reazione dell'organismo ad una serie di disturbi della sua omeostasi, che possono essere di varia origine (infettiva, immunologica, traumatica, parassitica o altro). Essa consiste di:

- *reazione locale* che avviene a livello del tessuto danneggiato e si caratterizza per l'attivazione delle cellule del sistema immunitario (leucociti, fibroblasti e cellule endoteliali), che inducono il rilascio di PICs e di altri mediatori dell'infiammazione;
- *reazione sistemica* che è indotta dalle citochine ed è caratterizzata da cambiamenti: a) endocrini (stimolazione del rilascio di ACTH da parte dell'ipotalamo, rilascio di cortisolo da parte della corteccia surrenale, aumento di altri ormoni come le catecolamine); b) ematici (riduzione della concentrazione plasmatica di ferro e zinco, aumento della concentrazione plasmatica di rame); c) metabolici (incremento del catabolismo delle proteine muscolari e nella sintesi delle proteine di fase acuta positiva a livello epatico); d) neurologici (es. sonnolenza causata dalla depressione del sistema nervoso centrale).

I principali scopi dell'APR sono quelli di prevenire un ulteriore danno al tessuto e/o organo; isolare, distruggere e contrastare l'agente infettivo o abiotico che ha indotto la risposta; rimuovere le molecole dannose; ripristinare l'omeostasi; attivare i processi di riparazione affinché l'organo possa riprendere la sua normale funzionalità.

Generalmente, nelle bovine in transizione, l'APR può manifestarsi in assenza di infezioni conclamate ancora prima del parto, così da incrementare il rischio di possibili traumi e relativo danno tissutale al momento del parto.

Al riguardo, alcuni studi hanno considerato che l'APR fosse parte di un insieme ancestrale di risposte a stimoli immunitari, di stress ed infiammatori allo scopo di neutralizzare gli stimoli che causano una perturbazione dell'omeostasi (Trevisi e coll., 2011). In questo scenario, i meccanismi

effettori sono assai simili per entrambi gli stimoli infettivi e non-infettivi. Infatti, l'IL-1 induce l'attivazione dell'asse ipotalamo, pituitario adrenocorticale (HPA) come pure la stimolazione della noradrenalina cerebrale; gli effetti dell'interleuchina-1 (IL-1) sono molto simili a quelli osservati sia in seguito alla somministrazione di lipopolisaccaride (LPS) che causa il rilascio di PICs, oppure in seguito alla comparsa di eventi stressanti non infettivi ed acuti come lo shock elettrico. Quindi, una risposta immunitaria innata può manifestarsi in differenti forme e la sua potenza dipende dall'esposizione dell'ospite a stimoli infettivi e non-infettivi. Anche l'infiammazione acuta (es. danno cellulare) innesca le risposte immunitarie innate, che sono molto simili a quelle osservate dopo uno stress infettivo.

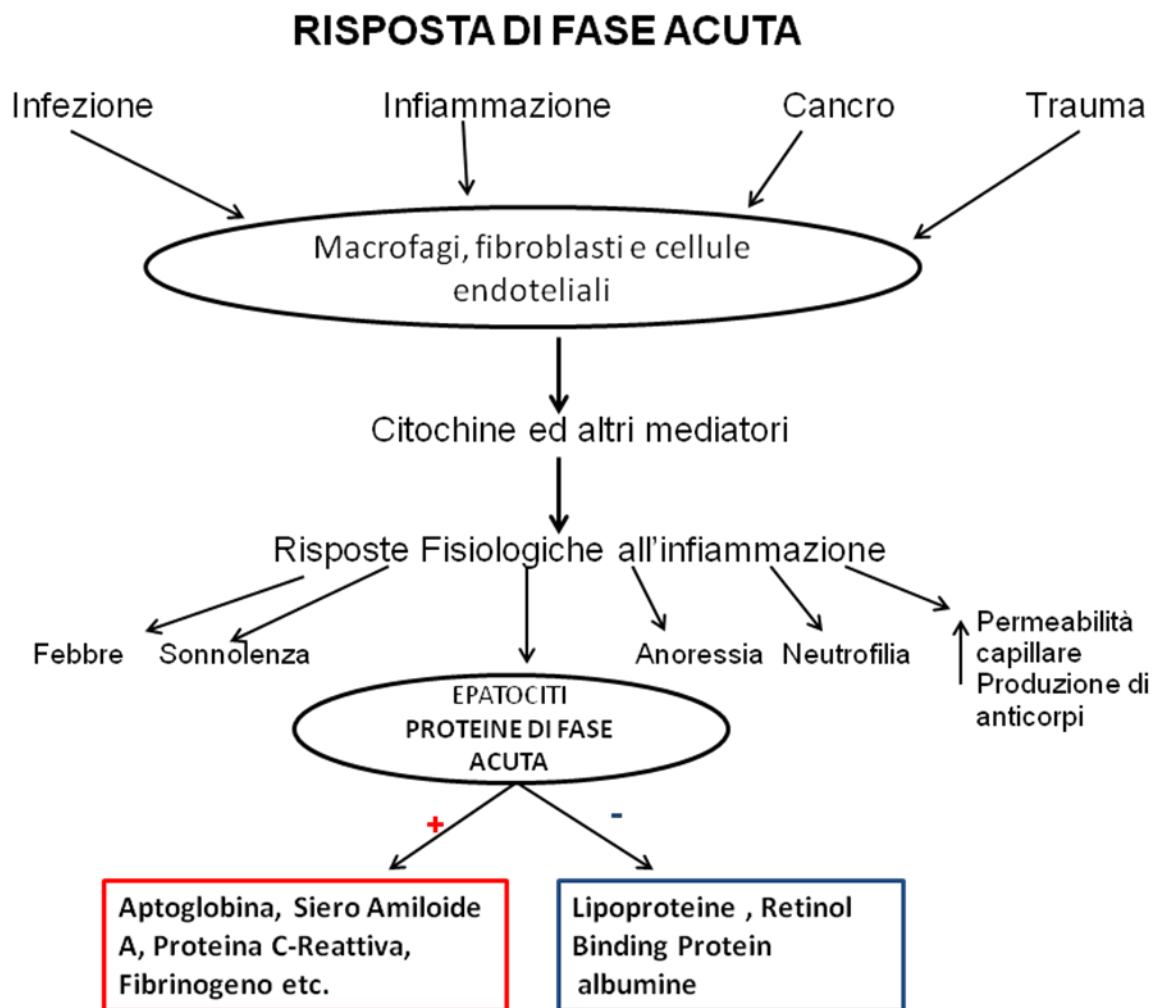


Fig. 4. Risposta di fase acuta e sintesi delle proteine di fase acuta indotta dalle PICs (Heinrich e coll., 1990).

## 2.4 Le citochine

In passato la denominazione delle citochine è stata effettuata in funzione dell'origine della cellula secernente, ad esempio linfocine quando sono prodotte dai linfociti, monochine se prodotte dai monociti, o in base alla loro attività: chemochine, interleuchine, interferoni. Oggi molte di esse sono ancora conosciute come interleuchine, a cui sono stati attribuiti numeri progressivi (ad es: IL-1, IL-2 etc.). La loro produzione è finemente regolata e spesso una o più citochine sono responsabili della stimolazione (o della inibizione) di un'altra citochina. Ad esempio, il TNF- $\alpha$  e l'IL-1 stimolano la produzione di altre citochine quali IL-8 e IL-6, mentre per contro, sono inibite da altre citochine come l'IL-4, l'IL-10 e l'IL-13 (Turbull e Rivier, 1999).

Esse costituiscono un importante anello di connessione tra immunità innata ed immunità acquisita, la loro produzione ed il loro rilascio sono finemente regolate. Un passaggio cruciale per la loro trascrizione è l'attivazione del fattore NF-kB, il quale è composto da due sub-unità, rispettivamente di p50 e p65 kDA. Tale fattore di trascrizione, oltre a regolare le PICs, modula la trascrizione di altre importanti proteine quali le molecole di adesione, i fattori di crescita emopoietici, le proteine di fase acuta ed enzimi implicati nella risposta infiammatoria quali la ciclossigenasi inducibile (COX-2) e la nitrico sintetasi (NOs).

L'NF-kB (Fig.5) è contenuto nel citosol reso inattivo attraverso il legame ad una proteina inibitoria I $\kappa$ B (Inhibitory-subunit kB). Esso è attivato in molte cellule attraverso una serie di stimoli quali PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns), MAMPs (Microbe-associated molecular patterns) e DAMPs (Damage-associated molecular patterns). Avvenuta la degradazione dell'I $\kappa$ B, l'NF-kB può quindi essere rilasciato nel citoplasma e muoversi verso il nucleo dove promuove la trascrizione degli AP (Acute Phase)-geni, determinando la produzione delle citochine. Queste una volta rilasciate in circolo, possono agire localmente in maniera "autocrina" (quando la cellula bersaglio di una determinata citochina è rappresentata dalla stessa cellula che l'ha prodotta), "paracrina" (quando la cellula bersaglio è localizzata in prossimità della cellula responsabile della produzione) e, anche, seppur più raramente, "endocrina" (se la cellula bersaglio è localizzata a distanza, rispetto alla cellula secernente e la citochina raggiunge il sito bersaglio mediante il torrente circolatorio).

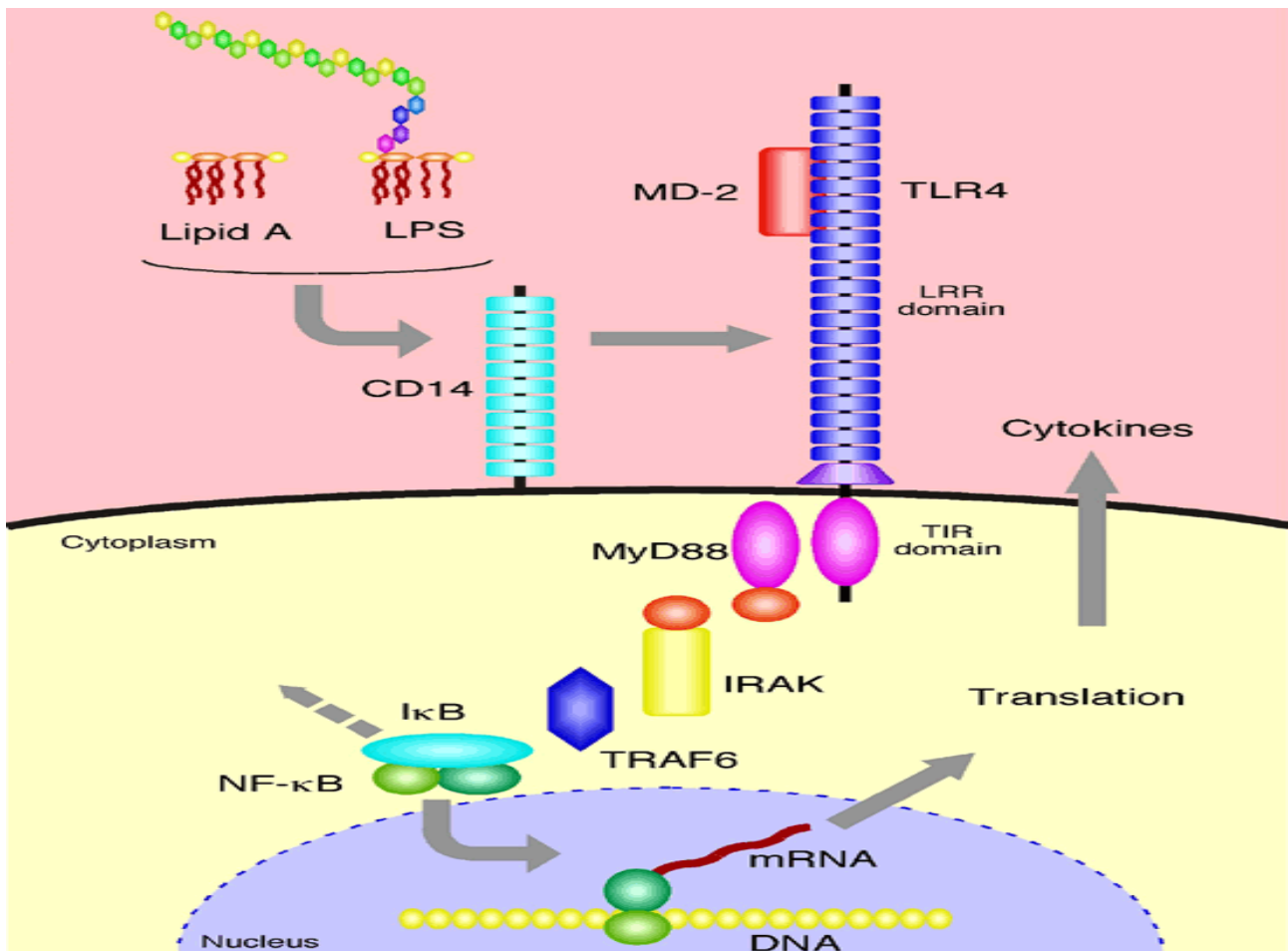


Fig. 5 –Rappresentazione schematica del meccanismo di azione del NF-κB e della sintesi delle citochine

Tra le citochine, molto rilevante è lo studio delle PICs, in quanto i loro effetti sistemici come innalzamento della temperatura corporea (febbre) ed anoressia sembrano correlati all'insorgenza di varie malattie metaboliche (come chetosi e lipidosi epatica) ed infettive (es. mastiti) nella bovina da latte. I potenziali effetti delle PICs nelle bovine in transizione possono cambiare secondo la loro quantità ed il tempo del loro rilascio. Esse svolgono le seguenti funzioni: regolano l'entità e la natura delle risposte immuni; la crescita e la differenziazione linfocitaria (Arai e coll., 1990); inducono la sintesi di eicosanoidi (prostaglandine e trombossani) attraverso l'attivazione dell'enzima ciclossigenasi causando una risposta locale infiammatoria; innescano una sequenza di eventi che coinvolgono diversi organi e tessuti (es. ipotalamo, fegato e apparato riproduttore) (Trevisi e coll., 2010a). A livello epatico, il principale effetto delle PICs, è la stimolazione della risposta di fase acuta, che è caratterizzata dall'induzione della sintesi di proteine positive di fase acuta (APPs positive), quali l'aptoglobina e la ceruloplasmina, e da una riduzione in quelle di fase

acuta negative (APPs negative), quali l'albumina, la "Retinol Binding Protein" (RBP) e le lipoproteine (Trevisi e Bertoni, 2008; Petersen e coll., 2004).

Tra le PICs particolare attenzione è stata rivolta al TNF- $\alpha$ , all'IL-1 ed all'IL-6.

#### **2.4.1 TNF- $\alpha$ .**

Il fattore di necrosi tumorale (TNF) è un importante mediatore dell'infiammazione e delle risposte cellulari immunitarie. Si distinguono due diverse forme (alfa e beta), omologhe per il 50%. IL TNF-beta, è una proteina di 171 aminoacidi N-glicolisati alla posizione 62, induce la sintesi di fattore stimolante la colonia granulocita-macrofago (GM-CSF), fattore stimolante la colonia granulocita (G-CSF), IL-1, collagenasi, e prostaglandine E2 nei fibroblasti, la produzione di specie reattive dell'ossigeno nei neutrofili ed infine incrementa la fagocitosi. Tuttavia, la forma TNF $\alpha$  è quella maggiormente studiata in quanto è una molecola dotata di azione pro-infiammatoria ed è sintetizzata sottoforma di proteina 26-kd, che a seguito di vari processi enzimatici ad opera di metalloproteinasi, viene ridotta nella forma biologicamente attiva, quella con 17kDa (Johnson, 1997). Esso è principalmente secreto da fagociti mononucleati attivati dall'LPS, da linfociti T attivati dall'antigene, da cellule NK attivate da macrofagi e da linfociti B quando stimolati a proliferare, come pure da mastociti, leucociti polimorfonucleati, cheratinociti e da altri tipi di cellulari (endoteliali, nervose ecc.). Il TNF- $\alpha$  è un pirogeno endogeno che agisce a livello delle regioni regolatorie ipotalamiche inducendo ipertermia, inoltre stimola i fagociti mononucleati e le cellule endoteliali a secernere altre citochine come IL-1 e IL-6. Infatti, studi *in vitro* ed *in vivo* dimostrano che è un potente attivatore di altre citochine, incluse IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-10. I suoi effetti metabolici includono la stimolazione del rilascio di acidi grassi dal tessuto adiposo; l'induzione della sintesi di alcune proteine plasmatiche da parte degli epatociti; il catabolismo proteico e del muscolo scheletrico. Infine, il TNF- $\alpha$  regola le molecole di adesione quali E-selectine e l'ICAM-1 (Intercellular adhesion molecules), aumenta la permeabilità capillare ed ha un effetto tossico diretto a livello cellulare.



### 2.4.2 IL-1

IL-1 è un fattore pirogeno prodotto principalmente da macrofagi, neutrofilo, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, cellule gliali, astrociti, linfociti B e T, fibroblasti e cheratinociti. L'IL-1 è in grado di mediare la risposta infiammatoria dell'ospite stimolando gli astrociti (cellule del Sistema Nervoso) a rilasciare altre citochine (TNF- $\alpha$ , IL-6 etc.) e incrementando l'attivazione delle cellule T in risposta all'antigene. Si distinguono due forme proteiche dell'IL-1: IL-1 $\alpha$  ed IL-1 $\beta$ . Queste ultime sono il prodotto di due geni diversi; presentano una sequenza omologa per il 25%; sono entrambe sintetizzate a partire da precursori di 31 kDA, ma risultano tra loro antagoniste; si legano ad uno stesso recettore e la loro azione biologica è sostanzialmente identica. Gli effetti biologici dell'IL-1 dipendono dalla quantità di citochina prodotta e rilasciata.

Oltre ad essere un potente pirogeno, agendo sull'asse HPA (HPA = Hypothalamic Pituitary Adrenal-Axis) (Buckingham e coll., 1996) è al tempo stesso un potente agente anoressico (Ingvarlesen e Andersen, 2000). Regola l'attività immunitaria in genere mediante l'attivazione della iNOS (Inducible Nitric Oxide Synthase) (Turnbull e River, 1999). Stimola inoltre la produzione di collagenasi e la degradazione dei proteoglicani (Butde e coll., 1992). L'IL-1 è implicata nella risposta di fase acuta a livello epatico causando l'avvio della sintesi delle cosiddette proteine positive di fase acuta (Bertoni, 1990; Richards e coll., 1995).

### 2.4.3 IL-6

IL-6 è sintetizzata da fagociti mononucleati, cellule endoteliali, fibroblasti ed altri tipi cellulari in risposta al rilascio di IL-1 ed, in minor misura, del TNF- $\alpha$ . Essa viene anche prodotta da alcune cellule T attivate, svolge un ruolo centrale nei meccanismi di difesa che includono la risposta immunitaria, APR e l'emopoiesi. Essa sembra responsabile dell'aumento di temperatura corporea (Akira e coll., 1990) e svolge un chiaro ruolo primario nell'attivazione della risposta di fase acuta a livello epatico. Infatti, la somministrazione di IL-6 nei topi induce una risposta epatica simile a quella osservata durante un processo infiammatorio, incluso l'aumento della trascrizione di geni codificanti le proteine di fase acuta (Geiger e coll., 1988; Standnyk e coll., 1990). Elevati livelli di IL-6 sono stati osservati in numerose condizioni patologiche come le infezioni batteriche e virali, le malattie autoimmuni, trauma e alcune neoplasie.

Le PICs possono essere distinte in due maggiori gruppi, in base al tipo di APPs positive: citochine di tipo interleukina-1 (che includono IL-1 e TNF); citochine di tipo interleukina-6 (che includono IL-6, LIF, IL-11, OSM, CNTF, CT-1). In particolare, IL-1 e/o TNF- $\alpha$  una volta rilasciate

principalmente dai macrofagi sono trasportate al fegato, dove inducono la sintesi di APPs positive, chiamate APPs di tipo 1 che comprendono: la sierioamiloide (SAA), la proteina C-reattiva (CRP; uomo), il complemento C3 e l'aptoglobina (nel ratto). Invece, le citochine IL-6 inducono la sintesi delle APPs di tipo 2 che includono: il fibrinogeno, l'aptoglobina (nell'uomo e nel bovino),  $\alpha$ 1-antichimotripsina,  $\alpha$ 1-antitripsina e  $\alpha$ 2-macroglobulina (ratto) (Moshage, 1997, Peterson e coll., 2004). Tali proteine sono coinvolte nei meccanismi di difesa, in gran parte rilasciate nel plasma per attenuare gli effetti negativi della risposta infiammatoria. Alcune proteine possono contrastare lo sviluppo di patogeni sottraendo loro ferro e zinco, accumulandoli nel fegato, altre inglobandoli nella fibrina o attivando alcune forme leucocitarie con il complemento, ma possono anche proteggere i tessuti dagli effetti indesiderati della reazione immunitaria, che porta alla formazione di perossidi, proteasi e fattori di coagulazione. In questo generale aumento dell'attività epatica, che ha come scopo la difesa dell'organismo, il fegato utilizza le proprie risorse sottraendole, almeno in parte, alle usuali azioni sintetiche, per cui è giustificata la riduzione della sintesi di alcune proteine usuali quali albumine, lipoproteine, *carriers* delle vitamine liposolubili (come la "Retinol Binding Protein" o RBP, vettore della vitamina A), e la ferritina (Bertoni e coll., 2000; Trevisi e coll., 2005). Tuttavia, come segnalato da altri autori, alcune delle APPs negative potrebbero ridursi nel sangue per altre ragioni quali: perdita con le urine, aumento della permeabilità degli endoteli, a seguito dell'effetto di sostanze vasoattive (istamina), come ad esempio accade per le albumine. Tuttavia come osservato da Morimoto e coll. (1995), durante l'APR si riduce l'mRNA che codifica la sintesi delle albumine, le più importanti tra le APPs negative. Pertanto, considerando che altri ricercatori (Schreiber e coll., 1986) hanno dimostrato l'esistenza di una relazione diretta tra sintesi dell'mRNA e produzione assoluta di albumine si può dedurre che l'infiammazione causa anche una riduzione diretta nella sintesi delle albumine, oltre che una loro perdita per la fuoriuscita dal circolo ematico.

## 2.5 Infiammazione e funzionalità epatica

Alcuni degli effetti infiammatori, quali anoressia, condizioni cataboliche, febbre, mobilitazione del tessuto adiposo, e disturbi dell'attività sintetica epatica, sono particolarmente pericolosi nel periodo di transizione, in quanto incrementano il rischio di malattie metaboliche (es. chetosi e lipidosi epatica), ma anche malattie infettive (es. mastiti) (Goff e Horst, 1997).

Recenti studi condotti da Trevisi e coll. (2001, 2010b) nella bovina da latte, hanno voluto evidenziare l'esistenza di una relazione tra l'infiammazione e le condizioni di salute generali delle bovine da latte e la connessione tra infiammazione, funzionalità epatica e fertilità, aspetti questi molto importanti per una corretta gestione della bovina da latte in fase di transizione, di cui però si dispone di ridotta conoscenza e non sempre molto chiari. In particolare, tali autori hanno mostrato la presenza di una risposta infiammatoria subito dopo il parto sulla base dei cambiamenti nei livelli plasmatici di APPs positive (aptoglobina, ceruloplasmina, etc.) e di APPs negative (es. albumina, RBP, lipoproteine). Gli stessi autori, per valutare le conseguenze dell'APR durante il periodo di transizione, hanno proposto due indici composti basati sul livello ematico di alcune APPs negative: Indice dell'Attività Epatica (LAI, Trevisi e coll., 2001), ed Indice della Funzionalità Epatica (LFI; Bertoni e coll., 2006).

LAI include la media dei livelli ematici a 7°, 14° e 28° DIM (DIM= Distanza Interparto Media) di alcune proteine sintetizzate a livello epatico: albumine, lipoproteine (misurate indirettamente come il colesterolo totale), e la Retinol-binding Protein (RBP, misurato come retinolo e il suo livello plasmatico è strettamente collegato alla sintesi di RBP da parte del fegato). Ragion per cui, il LAI permette di distinguere le bovine sulla base della loro condizione infiammatoria. In particolare Bertoni e coll. (2008) hanno separato le bovine partorienti di 5 allevamenti in accordo con i valori di LAI nel primo mese di lattazione ed hanno osservato che le bovine aventi valori bassi di tale indice mostravano:

- alta frequenza di problemi clinici (42% vs 5% per i gruppi LO-LAI e UP-LAI rispettivamente) e molto spesso più di una patologia per bovina;
- calo di produzione di latte e ridotta fertilità;
- elevati picchi di aptoglobina dopo il parto, confermando una più severa infiammazione, osservata anche in bovine senza evidenti sintomi clinici;
- elevato deficit energetico, nonostante la più bassa produzione di latte, confermato da maggiori perdite di BCS e da elevati livelli di BOHB (beta-idrossibutirrato);

- bassa utilizzazione dell'efficienza energetica, causata probabilmente da incrementati costi di mantenimento necessari per supportare l'attività del sistema immunitario (Trevisi e coll., 2007; Trevisi e coll., 2010b).

L'indice LFI ha lo stesso obiettivo del precedente, ma include differenti parametri ematici quali: albumine, lipoproteine (indirettamente misurata come colesterolo totale) e la bilirubina (come misura indiretta degli enzimi, sintetizzati dal fegato che determinano la sua clearance). LFI è un indice dei rilevanti cambiamenti tra DIM 3 (V3) e 28 (V28), standardizzati in accordo con l'ottimale modello di cambiamenti di 3 parametri, ottenuti da bovine sane nella stessa fase di lattazione.

Rispetto al LAI, LFI permette di valutare le stesse conseguenze di un challenge infiammatorio, che accade al momento del parto o intorno ad esso, ma consente di classificare retrospettivamente le bovine appartenenti anche a differenti allevamenti. In ogni modo è interessante sapere che i due indici sono ben correlati (Bertoni e coll., 2008, Trevisi e coll., 2010b). Considerando che la determinazione del LFI ci consente anche di effettuare una comparazione tra i differenti allevamenti e la cui determinazione risulta essere più semplice e chiara, per tale motivo esso risulta essere maggiormente affidabile nel misurare il successo e/o il fallimento di adattamento delle bovine in fase di transizione.

Da tali studi è emerso che monitorando il LAI o più opportunamente LFI, è possibile identificare soggetti che necessitano di una maggiore attenzione e di terapie appropriate. Infatti, questi indici, se calcolati in tutti i soggetti in transizione presenti in un allevamento, misurano l'entità delle conseguenze infiammatorie e sono in grado anche di mostrare la loro presenza nelle bovine in cui non sono presenti evidenti segni clinici.

In altre prove sperimentali (Trevisi e coll., 2010a; 2010b), le bovine che avevano valori bassi di LFI mostravano, ancora prima del parto e senza sintomi clinici evidenti, elevati livelli di IL-6, ceruloplasmina, bilirubina, NEFA (Acidi Grassi Non Esterificati), ROM (Metaboliti Reattivi dell'Ossigeno) e più bassi livelli di RBP e di lisozima. Tali risultati evidenziano che gli animali che hanno sofferto in precedenza per le infiammazioni sono più sensibili ai nuovi challenge infiammatori. Tuttavia è difficile stabilire se ciò dipenda da una più alta suscettibilità da parte dei soggetti di tipo innato o se si tratti di una caratteristica acquisita.

In generale, prima del parto si possono osservare due differenti condizioni:

- soggetti che mostrano fenomeni infiammatori senza segni clinici, i quali potrebbero essere rilevati dall'aumento di APPs positive (es. aptoglobina), PICs (es. IL-6), lipomobilizzazione (es: incremento di NEFA) e stress ossidativo (es: aumento di ROM);

- soggetti che presentano segni residui di precedenti eventi infiammatori, che potrebbero essere rilevati principalmente da livelli più o meno bassi di APPs negative (es. lipoproteine, albumine e RBP), ma anche lisozima.

In caso di infiammazioni subcliniche, l'approccio sarà un tentativo di identificare la possibile causa di disordini di salute (es. mastiti) mediante ulteriori e più dettagliate indagini, seguite da terapie appropriate. Nel secondo caso, i soggetti potrebbero essere seguiti con più attenzione al momento del parto perché essi sono probabilmente più suscettibili ad eventuale challenge infiammatorio.

In conclusione, dai risultati qui riportati è emerso che in fase di transizione ogni bovina può incorrere in fenomeni infiammatori di differente gravità e molto spesso non accompagnati da evidenti sintomi clinici. Le conseguenze di ciò sono un peggioramento del NEB per un basso DMI e per un maggiore spreco di energia e nutrienti; infine, la APR causa una deviazione delle sintesi epatiche e quindi una riduzione di diversi enzimi che sono responsabili per lo svolgimento delle regolari funzioni fisiologiche dal parte del fegato. Il fenomeno infiammatorio è innescato dalle PICs come pure dagli eicosanoidi e per prevenire la comparsa dello stesso è necessario effettuare: un maggiore controllo delle malattie metaboliche ed infettive; una riduzione di distocie che potrebbero indurre un maggiore rischio di danno tissutale e stress fisico; una riduzione di fattori di stress tra i quali i disordini digestivi che permettono l'assorbimento di endotossine; ed infine l'adozione di norme specifiche durante i periodi di asciutta e di transizione al fine di evitare o quanto meno ridurre la comparsa di fenomeni infiammatori al momento del parto.

## **2.6 Processi metabolici nel periodo di transizione**

Le bovine in fase di transizione subiscono tremendi cambiamenti adattativi, in quanto, in questa fase, le esigenze nutrizionali per la crescita fetale prima e per la sintesi del latte (lattogenesi) poi, incrementano notevolmente i fabbisogni nutrizionali. In particolare, i fabbisogni energetici subiscono un brusco aumento subito dopo il parto, a causa della lentezza con cui aumenta il bisogno di assunzione di alimenti. Questo fatto comporta l'impiego delle riserve corporee come fonte energetica e le bovine in avvio di lattazione sono tutte in bilancio energetico negativo (NEB), che, quando diviene eccessivo e prolungato, conduce ad una esagerata mobilitazione delle riserve corporee, riduce la produzione latte; ed induce problemi riproduttivi (es. comparsa di cicli irregolari che allungano l'intervallo al primo servizio e riducono i tempi di concepimento, influenzando negativamente sulla comparsa dell'estro e sulla qualità dell'oocita). Il NEB ha anche una ricaduta

sulle variazioni endocrine (es. ridotta concentrazione di insulina nel sangue ed aumentata concentrazione di glucagone) che comportano gravi dismetabolie come chetosi.

Inoltre, durante il NEB, avviene la mobilitazione di acidi grassi che causano una aumentata captazione degli acidi grassi non esterificati (NEFA) da parte del fegato ed un aumentato rischio del loro accumulo sottoforma di trigliceridi (TG) (Suriyasathaporn e coll., 2000; Fig.6). Se questa infiltrazione di grassi a livello epatico diventa severa, subentra la sindrome del fegato grasso, o lipidosi epatica, che può portare ad un prolungamento dei tempi di guarigione di altre malattie, aumentare i problemi di salute che sono in grado di condurre alla morte (Herdt e coll., 1983). Inoltre, recenti studi hanno dimostrato che l'accumulo di TG negli epatociti diminuisce la capacità per la sintesi dell'urea e l'ammoniaca deprime la capacità degli epatociti a sintetizzare glucosio dal propionato (Overton e coll., 1999) perciò l'accumulo di TG può indirettamente inibire la sintesi del glucosio nelle vacche. In particolare, elevati livelli di mobilitazione di grassi conducono alla crescita del processo di beta-ossidazione a carico dei NEFA arrivati al fegato con conseguente formazione di NADH e acetil-CoA a livello mitocondriale. L'acetil-CoA è ulteriormente ossidato mediante condensazione con ossalacetato, che è il principale substrato per la gluconeogenesi. Quando la concentrazione ematica di glucosio è bassa viene attivato il processo di gluconeogenesi, processo metabolico mediante il quale un composto non glucidico (esempio piruvato, lattato, glicerolo ecc.) è convertito in glucosio. In questa situazione vi è una insufficiente disponibilità di substrato per la sintesi di acetil-CoA a citrato; di conseguenza l'acetil-CoA si accumula. L'eccesso di acetil-CoA viene rimosso attraverso la sintesi del corpo chetonico acetoacetil-CoA, quindi ad acetoacetato (AcAc). Questo può essere trasportato in diversi organi, ma l'AcAc è normalmente ridotto a livello mitocondriale mediante la sua trasformazione a BOHB, di cui una parte viene spontaneamente e irreversibilmente decarbossilata ad acetone.

Le comuni raccomandazioni per la gestione delle vacche nella fase di transizione suggeriscono di garantire, laddove fosse possibile, un ambiente esente da stress, in quanto questo induce un aumentato rilascio di NEFA dal tessuto adiposo, ma gli effetti sulla risposta epatica non sono ben definiti. Alcuni autori hanno osservato che la lipidosi epatica era più grave dopo un intervento chirurgico volto alla correzione di una dislocazione dell'abomaso che in vacche tenute a digiuno nella stessa fase di lattazione (Herdt e coll., 1983). Quindi, in aggiunta alla privazione alimentare, altri fattori contribuiscono ad incrementare la formazione di TG nel fegato. Un probabile gruppo di composti candidati a tale fenomeno sono le citochine. Infatti alcune citochine come il TNF- $\alpha$  sono noti per incrementare l'esterificazione e diminuire l'ossidazione dei FA nel fegato dei ratti (Johnson e coll., 1997). La risposta metabolica a molti mediatori fisiologici dello stress non è ancora stata ben

caratterizzata nella vacca in transizione. Questo campo potrebbe costituire un'area di studi molto proficua nello sforzo di ottimizzare l'approccio al periodo di transizione.

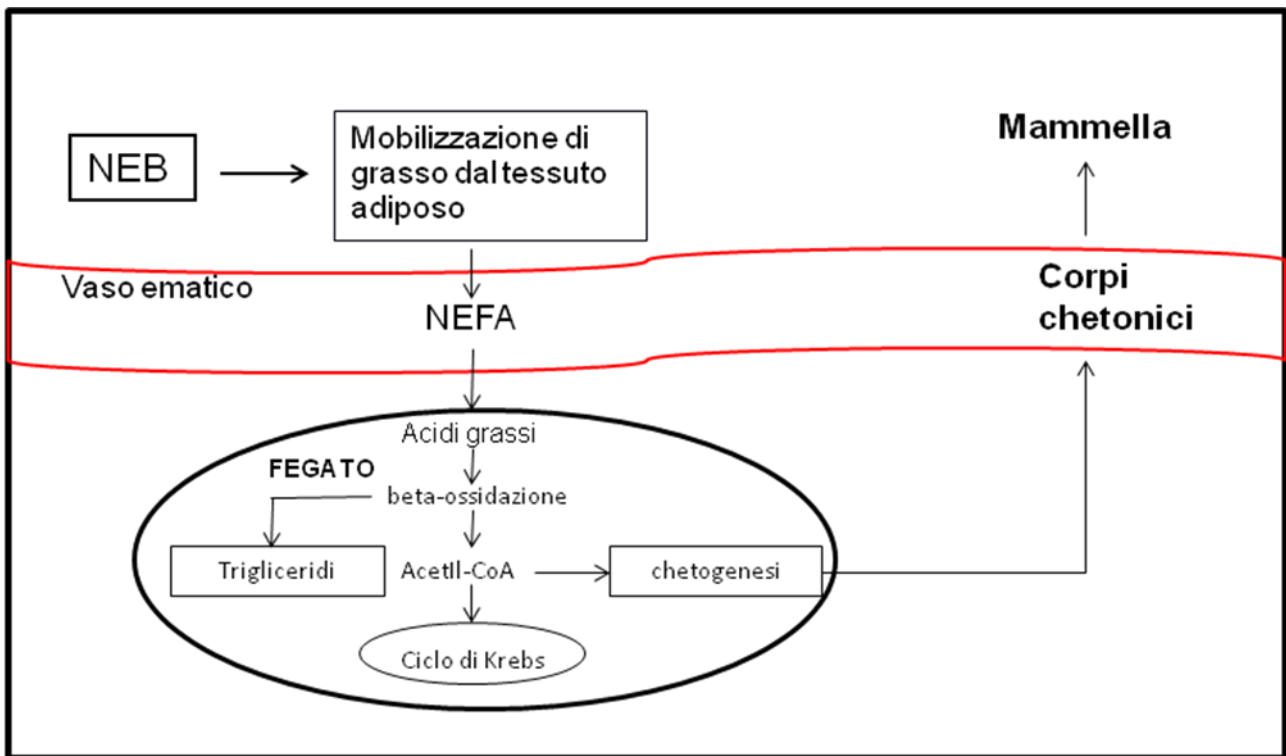


Fig.6. Processo metabolico di chetogenesi nel sangue e nella mammella (Suriyasathaporn e coll., 2000)

La fase di transizione comparata ad altri periodi del ciclo della lattazione, è relativamente poco conosciuta circa i processi metabolici caratterizzanti tale fase, quali la regolazione ed il coordinamento del metabolismo lipidico fra il tessuto adiposo, il fegato, l'intestino e la ghiandola mammaria che sono componenti chiave dell'adattamento alla lattazione.

Tra i principali cambiamenti metabolici che si manifestano durante questa fase abbiamo una:

- incrementata lipolisi, ossia idrolizzazione dei trigliceridi in glicerolo ed acidi grassi nel tessuto adiposo;
- incrementata gluconeogenesi (processo metabolico che permette di ottenere glucosio da precursori non saccaridici) e glicogenolisi (processo metabolico che scinde il glicogeno fino ad ottenere glucosio) a livello epatico;
- ridotta lipogenesi (sintesi degli acidi grassi a partire dall'acetil-CoA) e glicogenesi (è la trasformazione del glucosio in glicogeno) nel tessuto adiposo e nel fegato rispettivamente.

Tali cambiamenti metabolici sono fisiologici, ma se divengono esagerati possono impedire alla bovina di raggiungere la sua potenziale produzione di latte e, specie se associati con altri fattori di stress, possono contribuire alla manifestazione di vari problemi di salute, quali steatosi epatica, le metriti e la dislocazione dell'abomaso. Infatti, è noto che la maggior parte delle malattie infettive e dei disordini metabolici della bovina da latte si verificano al parto o all'avvio della lattazione, in quanto le modificate condizioni fisiologiche possono aggravare la situazione con conseguenze negative sulle performance produttive e riproduttive della bovina da latte. Ciò è confermato dai dati relativi all'incidenza di malattie nelle vacche in transizione che variano ampiamente tra gli allevamenti. Tale variabilità è forse un indice della maggiore o minore presenza di fattori che si associano al fatto infiammatorio.

Altre ricerche hanno dimostrato l'esistenza di una elevata correlazione fra le capacità d'ingestione della bovina dopo il parto e l'incidenza di problemi metabolici. Per esempio, alcuni autori hanno osservato che il DMI delle vacche con problemi di salute è del 18% inferiore nel pre-parto e del 20% inferiore nel post-parto rispetto alle vacche sane (Trevisi e coll., 2011).

Altri ricercatori hanno osservato che, le vacche con qualsiasi problema di salute attorno al parto presentavano una diminuzione del DMI durante i primi 20 giorni dopo il parto (13,9 vs 17,8 kg/gg) (Wallace e coll., 1996).

Il rilascio di PICs potrebbe essere tra le possibili cause che comportano una riduzione del DMI e che contemporaneamente determina una risposta di fase acuta (APR). In merito a ciò, Trevisi e coll. (2001) hanno dimostrato una significativa e negativa relazione tra il calo del DMI nella fase terminale della gestazione e le proteine positive di fase acuta nel sangue, quali aptoglobina e ceruloplasmina. Di particolare interesse è il fatto che questa riduzione del DMI accadeva a differenti giorni dal parto: 7-10 giorni, 4-5 giorni o mai ed il legame con gli indici infiammatori prima del parto era sempre marcato. Inoltre, gli animali con problemi clinici e subclinici al parto o subito dopo di esso, che mostravano una precoce e consistente riduzione del DMI prima del parto, presentavano un più basso DMI nel primo mese di lattazione.



# Attività di ricerca

## OBIETTIVI

Le citochine pro-infiammatorie svolgono un ruolo importante nelle risposte fisiologiche e patologiche che accadono nel corso di un infezione o di un processo infiammatorio. Inoltre, esse oltre ad intervenire nelle risposte immunitarie ed infiammatorie, sono in grado anche di influenzare i processi metabolici. Sulla base di tali aspetti, lo scopo principale del dottorato è stato:

- ampliare le conoscenze in merito alle relazioni tra infiammazione e condizioni di salute e tra PICs, inizio del processo infiammatorio, APR, funzione epatica e stato metabolico in bovine da latte in fase di transizione;
- focalizzare l'attenzione principalmente sul rilascio delle PICs durante un evento fisiologico quale il parto, un evento infettivo come la mastite ed in condizione di stress metabolico in bovine da latte in fase di lattazione;
- stimare la produzione in bovine da latte in fase di transizione di mediatori lipidici endogeni derivati dagli acidi grassi polinsaturi  $\omega$ -6 (es. le lipossine) che svolgono un'azione anti-infiammatoria; promuovono la risoluzione di un processo infiammatorio e bloccano l'ingresso dei leucociti polimorfonucleati (PMN) nei siti di flogosi.

## **CAPITOLO 3**

# **VARIAZIONI EMATICHE DELLE PRINCIPALI CITOCHINE PRO-INFIAMMATORIE NEL PERIPARTO DI BOVINE DA LATTE**

### **INTRODUZIONE**

Nella bovina da latte, la fase di transizione, da tre settimane prima a tre settimane dopo il parto, è un periodo caratterizzato da forti stress legati alla gravidanza, al parto ed alla lattazione (Drackley, 1999).

Generalmente, durante questa fase, la bovina è soggetta a fenomeni infiammatori legati alla comparsa di malattie che inducono i macrofagi e i neutrofili a secernere le citochine. Quest'ultime sono un gruppo di proteine che agiscono localmente in maniera autocrina, paracrina ed anche sistemica legandosi a recettori ad alta affinità presenti sulla membrana delle cellule bersaglio. La loro produzione è finemente regolata e spesso uno o più citochine sono responsabili della stimolazione (o della inibizione) di un'altra citochina (Turbull e River, 1999). Esse costituiscono un importante anello di connessione tra immunità innata ed immunità acquisita, regolano l'entità e la natura delle risposte immunitarie ed infine influenzano la crescita e la differenziazione linfocitaria.

Tra le citochine particolare attenzione è stata rivolta a quelle pro-infiammatorie in quanto inducono la sintesi di eicosanoidi (prostaglandine e trombossani) mediante l'attivazione delle cicloossigenasi e delle lipossigenasi e quindi causano una risposta locale infiammatoria; innescano una sequenza di eventi che coinvolgono diversi organi e tessuti, quali l'ipotalamo, il fegato, e l'apparato riproduttore; aumentano la temperatura corporea; causano anoressia; incrementano il catabolismo; inducono diversi cambiamenti endocrini e metabolici; ed infine, svolgono un ruolo importante nella regolazione della APR (Arai e coll., 1990; Trevisi e coll., 2010a). A livello epatico, le citochine pro-infiammatorie (PICs) promuovono nel fegato la sintesi di proteine positive di fase acuta (positive APPs) che possono competere con la produzione di proteine epatiche usuali, che sono più o meno ridotte. Infatti, gli eventi infiammatori possono influire sulla funzionalità epatica riducendo la sintesi di alcune proteine e/o la loro concentrazione ematica, con conseguente aumento del rischio di lipidosi epatica (Trevisi e Bertoni, 2008).

Le cause che possono indurre il rilascio di PICs, durante il periparto, sono: trauma e stress da parto, edema della ghiandola mammaria ed involuzione dell'utero. Queste condizioni sono caratterizzate da un incremento delle APPs positive (aptoglobina, ceruloplasmina) e da una riduzione delle APPs

negative (lipoprotein, Retinol Binding Protein, ecc.) e sono associate ad un peggioramento delle performance produttive e riproduttive nella bovina da latte (es. perdita di peso corporeo, ridotta produzione latte, anoressia e bassa fertilità) (Bertoni e coll., 2008; Trevisi e Bertoni, 2008).

### 3.1 Scopi della prova

La presente ricerca è stata finalizzata a due principali obiettivi:

- valutare il livello plasmatico delle citochine pro-infiammatorie (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) rilasciate in circolo all'inizio del travaglio e durante il parto;
- stabilire il grado di suscettibilità dei soggetti ai processi infiammatori in base al livello plasmatico delle citochine pro-infiammatorie nella fase di transizione.

### 3.2 Materiali e Metodi

La prova è stata effettuata presso la stalla sperimentale di bovine da latte di razza Frisona Italiana, dell'Istituto di Zootecnica dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza, in una struttura a stabulazione fissa con tappeti in gomma morbida e dotata di controllo ambientale automatizzato (temperatura 18-22 °C e umidità relativa 60-70%) ed illuminazione artificiale (15 ore di luce e 9 di buio). Gli animali sono stati alimentati individualmente con due pasti giornalieri di foraggi (insilato di mais, medica disidratata e fieno di graminacee) somministrati ad un intervallo di 12 ore (8.00-20.00). In aggiunta, le bovine hanno ricevuto più pasti di concentrato distribuito con auto-alimentatore computerizzato: le bovine in asciutta ne ricevevano due pasti uguali ad intervalli di 12 ore (10.30 e 22.30); dopo il parto, la quantità di concentrato è stata gradualmente aumentata ed il numero dei pasti aumentati ad 8 nelle 24 ore. In particolare alle bovine in lattazione il concentrato è stato distribuito ad intervalli di 3 ore, a partire da 30 minuti prima del pasto di foraggi.

Questa prova ha previsto l'impiego di 13 bovine pluripare (la media e la deviazione standard del numero dei parti è pari a 4 e 1,24 rispettivamente), una bovina è stata riformata a 48 ore dopo il parto in seguito ad una grave mastite da E. coli. Le restanti 12 bovine sono state monitorate giornalmente da 28 giorni prima della data presunta del parto, sino al 28° giorno di lattazione per i seguenti aspetti: stato di salute; produzione di latte (considerata come la somma delle due mungiture precedenti al prelievo ematico); ingestione di alimenti (calcolata come somma degli alimenti somministrati nel corso della giornata, corretta per gli eventuali residui rilevati dopo 24 ore); temperatura rettale (quotidianamente); peso vivo mediante pesata e stato di ingrassamento (BCS= Body Condition Score) ogni 14 giorni ed il giorno seguente il parto. Due volte a settimana, durante i primi 3 mesi di lattazione, sono stati prelevati campioni rappresentativi di latte dalla mungitura del mattino (lunedì e giovedì) ed una volta per settimana è stato raccolto un campione di latte dalla mungitura pomeridiana (domenica). Infine, sono stati prelevati campioni di sangue dalla vena

giugulare, prima del pasto del mattino, due volte a settimana dalla messa in asciutta alla 14<sup>a</sup> settimana di lattazione. Ulteriori prelievi di sangue sono stati raccolti giornalmente tra circa 10 giorni prima e 10 giorni dopo il parto ed in prossimità del travaglio (inizio delle contrazioni regolari e rottura delle prime acque) secondo il seguente schema:

- 1) inizio travaglio (qualora sorpreso nella sua fase iniziale);
- 2) subito dopo il parto;
- 3) 4 ore dopo inizio travaglio;
- 4) 12 ore dopo inizio travaglio.

### **3.2.1 Analisi ematiche**

I campioni di sangue sono stati prelevati mediante tecnica Vacutainer, usando provette contenenti litio eparina come anticoagulante e collocate immediatamente a bagno in acqua e ghiaccio fino all'arrivo in laboratorio. Entro un'ora dal prelievo, una piccola aliquota di sangue intero è stata usata per determinare l'ematocrito, mediante apposito microematocitometro alla velocità di 12.000 RCF per 10 minuti (centrifuga modello 4203 ALC International Srl, Milano). La restante quota di sangue intero è stata centrifugata a 3500 RCF per 16 minuti alla temperatura di circa 4 °C (centrifuga modello 48 R Rotina Hettich, Germania) ed il plasma ottenuto è stato diviso in 5 aliquote, congelato a -20 °C fino al momento delle analisi. Le determinazioni analitiche, eseguite presso l'Istituto di Zootecnica, Università Cattolica di Piacenza, sono state per la maggior parte effettuate utilizzando un analizzatore automatizzato [ILAB 600, Instrumentation Laboratory (IL), Lexington, MA], a temperatura costante di 37°C ed utilizzando kit commerciali. In particolare sono stati valutati vari indicatori, di seguito elencati in relazione alla funzione metabolica nella quale sono coinvolti:

- metabolismo energetico: glucosio (kit IL; mmol/l); NEFA (kit Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany, enzimatico-colorimetrico; mmol/l) e BOHB (kit Randox Laboratories Ltd., Crumlin, Co. Antrim, UK; mmol/l);
- metabolismo proteico (kit IL): urea (mmol/l) e creatinina (mmol/l);
- funzionalità epatica e dell'eventuale danno delle cellule epatiche (kit IL): bilirubina (µmol/l);
- stato infiammatorio (kit IL): proteine positive di fase acuta: aptoglobina (g/l) e ceruloplasmina (µmol/l), proteine negative di fase acuta: albumine (g/l) e dei loro indici colesterolo (mmol/l), vitamina A (o retinolo; µg/100ml), vitamina E (o alfa-tocoferolo; µg/100ml) e beta-carotene (µg/100ml), paraoxonasi (PON; U/ml), zinco (kit WAKO; µmol/l);
- parametri dello stress ossidativo: ROMt (kit Diacron srl, Grosseto, Italia; mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/100 ml);

- le citochine pro-infiammatorie: IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$  mediante ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Per IL-1 $\beta$ , IL-6 è stato usato il kit ELISA Screening Set (Pierce, Thermo Scientific), mentre per il TNF- $\alpha$  è stato utilizzato il DuoSet ELISA Development kit (DY2279, R&D Systems, Inc.).

### 3.3 Analisi statistica

Le 12 bovine pluripare sono state suddivise in due gruppi (UP-IL6, 6 bovine e LO-IL6, 6 bovine) in base ai livelli plasmatici di IL-6 osservati nelle ultime 4 settimane di gestazione (valori superiori o inferiori a 650 pg/ml), in quanto Trevisi e coll. (2011), nei loro studi, hanno osservato che i livelli plasmatici di IL-6 erano più elevati nelle bovine con valori bassi di LFI rispetto a quelle con valori alti di tale indice.

Per l'elaborazione statistica dei risultati è stata applicata l'analisi della varianza per osservazioni ripetute con procedura MIXED del SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC, release 9.2).

Prima dell'analisi si è proceduto alla verifica della normalità della distribuzione di ciascun parametro, mediante calcolo di Skewness e Curtosi e, quando necessario, alla normalizzazione dei dati mediante trasformazione logaritmica. Il modello statistico ha incluso i fattori di classificazione fissi (distanza dal parto e il gruppo IL-6), il fattore casuale individuale (bovina entro gruppo) e l'interazione gruppo x distanza parto.

In particolare il modello statistico utilizzato è risultato il seguente:

$$Y_{iklm} = \mu + G_i + T_k + (G*T)_{ik} + B_l(i) + e_{iklm}$$

dove:

$Y_{iklm}$  = osservazione m-esima della 1-esima bovina  $B_l$  entro l'i-esimo gruppo  $G_i$  alla K-esima distanza parto  $T_k$ ;

$\mu$  = media totale;

$G_i$  = effetto dell'i-esimo gruppo ( $i = \text{UP- e, LO-IL6}$ );

$T_k$  = effetto della K-esima distanza dal parto, con un aumento di livelli variabile in funzione di parametri: 17 per i parametri ematici (-28, -21, -14, -7, -2, -1, -0.1, 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28); 14 per la temperatura rettale e il DMI (-28, -21, -14, -7, -2, -1, 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28); 8 per la produzione di latte (0, 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28) e 7 per il BCS (-28, -14, -7, 1, 7, 14, 28);

$(G*T)_{ik}$  = effetto dell'interazione tra l'i-esimo gruppo e la k-esima distanza dal trattamento;

$B_l(i)$  = effetto dell' i-esima bovina, entro l'i-esimo gruppo;

$e_{iklm}$  = effetto casual o errore.

L'analisi è stata effettuata utilizzando tre tipi di struttura di covarianza (Autoregressive Order, Compound Symmetry e Spatial Power) scelti per ogni tipo di parametro in base al loro criterio di informazione di Akaike (Littell e coll., 1998). Le differenze sono state considerate significative per  $P < 0.05$ , mentre le tendenze sono state dichiarate per  $P < 0.10$ .

### 3.4 Risultati

Per la realizzazione di questa prova sperimentale sono state impiegate 13 bovine, in quanto, come riportato in precedenza, una bovina è stata riformata pochi giorni dopo il parto in seguito ad una grave mastite da E. coli.

Nella Tab. 3.1 sono riportati i principali parametri valutati in tale bovina:

- l'ingestione ha mostrato una riduzione progressiva dell'ingestione sino al parto e la cessazione dell'ingestione è avvenuta immediatamente dopo di esso;
- il rialzo termico si è verificato a 12 ore dopo il parto, a cui ha fatto seguito un trattamento con antibiotico (amoxicillina), antinfiammatorio (ketoprofene) ed anti-istaminico (clorfenamina maleato) ed infine un ulteriore trattamento antinfiammatorio (acetilsalicilico) il giorno dopo il parto.
- le concentrazioni plasmatiche di IL-6 sono alte già 2 giorni prima del parto, con un marcato ulteriore aumento 4 ore prima del parto stesso;
- TNF- $\alpha$  ed IL-1 $\beta$  hanno mostrato livelli plasmatici bassi in asciutta, con un loro aumento appena prima o appena dopo, rispettivamente, dal parto;
- Il PCV ha presentato un aumento marcato in concomitanza del parto, a cui è seguito un ulteriore aumento nei primi due giorni dopo il parto;
- la glicemia è aumentata marcatamente al momento del parto, raggiungendo il picco più alto a 4 ore da esso dopo di che si è ridotta ed al 2° giorno di lattazione ha mostrato un ulteriore marcato aumento;
- l'urea ha mostrato un progressivo aumento da -28 giorni prima del parto fino a 2 giorni dopo, ma l'incremento più consistente si è verificato a 4 ore prima del parto;
- le proteine negative di fase acuta ed i loro indici si riducono in modo marcato due giorni prima del parto (albumine, colesterolo, retinolo, e tocoferolo) e tale calo prosegue sino alla riforma dell'animale ad eccezione del retinolo che mostra un aumento marcato a 48 ore dal parto;
- tra le proteine positive di fase acuta: l'aptoglobina mostra un aumento dei livelli plasmatici già due giorni prima del parto, ma comunque piuttosto bassi (0.2-0.3 g/l), mentre un marcato aumento si osserva solo 12 ore dopo il parto. La ceruloplasmina invece aumenta al momento del parto e a poche ore dopo di esso, dopo di che mostra un calo;
- lo zinco si riduce invece drasticamente 4 ore prima del parto;



- la bilirubina aumenta già nei giorni che precedono il parto, ma soprattutto dopo poche ore dallo stesso, raggiungendo il picco a 12 ore dopo il parto, mentre il secondo giorno dopo il parto cala bruscamente;
- i ROMt non hanno mostrato alcun innalzamento, al contrario di quanto atteso.

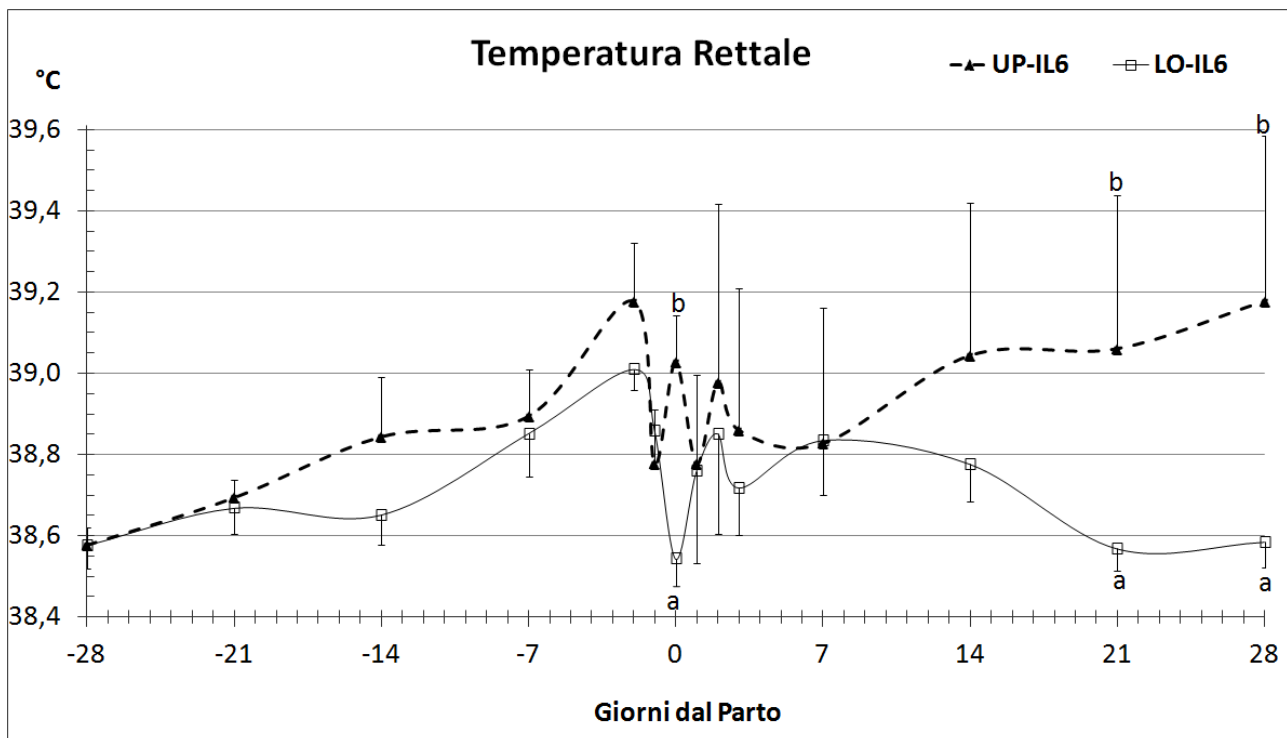
Tab. 3.1 Variazione dei principali parametri produttivi ed ematici nella bovina riformata dopo il parto, in seguito ad una grave mastite da E.coli

Z29b	giorni dal parto						ore dal parto				giorni dal parto	
	-28	-21	-14	-7	-2	-1	-4	0	4	12	1	2
T.Rettale	38,75	38,70	39,20	38,90	38,75	38,65	-	39,40	-	40,50	38,50	38,90
BCS	2,68	2,64	2,61	2,59	2,56	2,55	-	-	-	-	-	-
Ingestione	11,08	10,36	11,04	8,43	8,05	7,52	-	0,00	-	-	0,00	0,00
Produzione Latte	-	-	-	-	-	-	-	9,30	-	-	12,20	3,40
TNF- $\alpha$	308,90	244,20	154,20	122,30	187,00	179,40	885,80	889,20	655,80	515,20	630,90	596,90
IL-6	1582,00	1913,00	2300,80	2297,10	2029,00	2048,60	9924,40	10783,60	9870,20	9465,30	8734,70	7388,60
IL-1 $\beta$	-	100,60	72,10	57,30	46,00	45,10	66,30	73,70	176,60	396,20	248,40	67,90
PCV	0,30	0,30	0,31	0,31	0,32	0,33	0,34	0,34	0,36	0,38	0,40	0,40
Glucosio	4,10	3,93	3,99	3,92	4,10	4,03	3,67	4,97	5,89	3,85	3,46	4,86
Urea	4,96	4,78	4,27	4,19	5,23	5,42	6,49	7,07	7,37	8,61	13,06	15,73
Colesterolo	3,32	2,96	2,82	2,64	2,15	2,15	1,87	2,05	2,09	2,13	1,95	1,50
Albumina	36,32	36,70	35,52	35,18	33,02	33,60	32,41	34,67	35,97	35,22	33,34	27,64
Aptoglobina	0,07	0,07	0,13	0,03	0,22	0,28	0,29	0,49	0,66	1,00	1,09	2,45
Ceruloplasmina	2,59	2,64	2,70	2,53	2,41	2,58	2,53	2,75	2,86	2,76	2,67	2,53
Zinco	15,76	13,84	13,41	12,41	11,64	11,28	1,13	0,99	1,29	1,04	1,64	2,81
Bilirubina	1,42	1,61	1,96	3,64	5,40	8,89	15,35	19,45	19,49	34,86	45,55	9,40
ROMt	6,14	8,28	8,28	8,76	8,03	8,39	8,25	9,22	9,70	9,32	9,50	8,21
Retinolo	53,76	50,20	45,81	43,36	27,56	26,01	20,29	17,03	17,06	10,66	10,46	21,02
Tocoferolo	4,39	3,80	3,80	3,69	2,73	2,63	2,32	2,35	2,45	2,11	1,78	1,23

Le rimanenti 12 bovine sono state suddivise in due gruppi (UP-IL, 6 bovine e LO-IL, 6 bovine) in base ai livelli plasmatici di IL-6 osservati durante gli ultimi 30-40 giorni di gestazione.

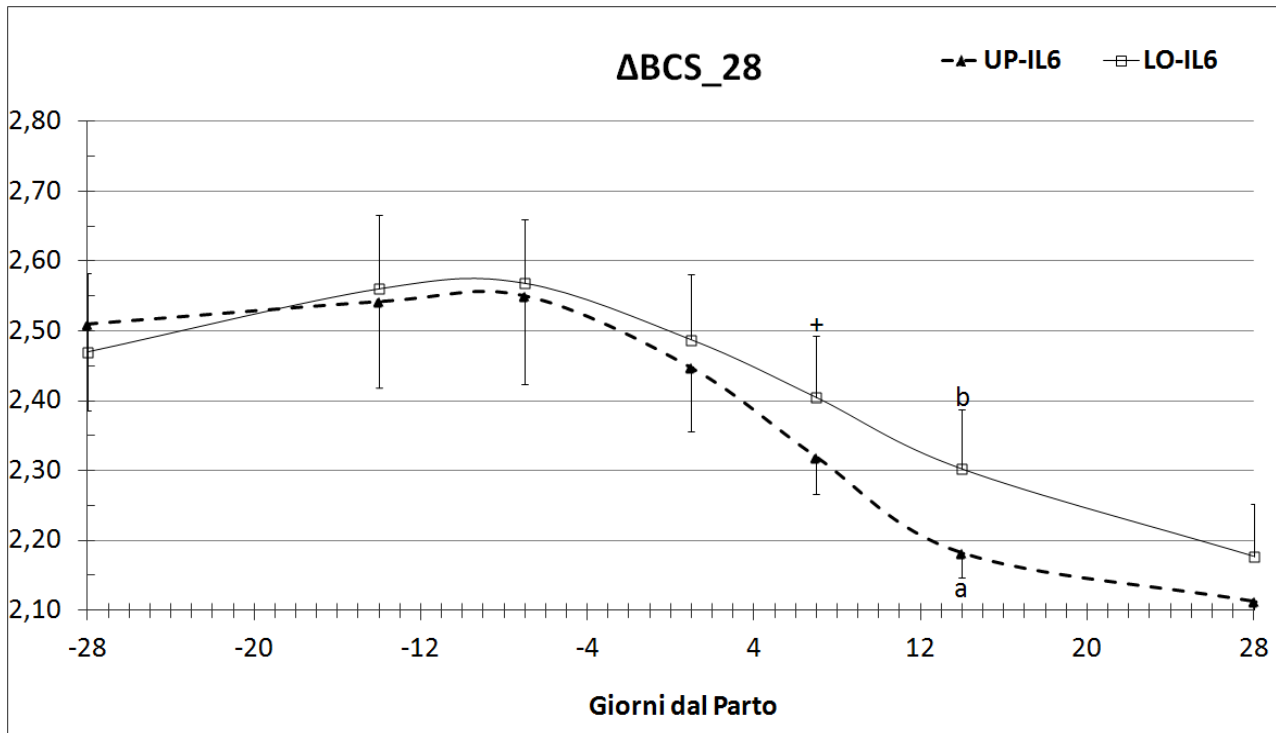
### **Temperatura Rettale e Body Condition Score**

In fase di asciutta, in entrambi i gruppi (UP-IL6 e LO-IL6) la temperatura rettale (Fig.3.1) è stata simile ed in lieve aumento sino al parto. Dal parto e durante il 1° mese di lattazione, nel gruppo UP-IL6 la temperatura è risultata più elevata a 0 e da 21 a 28 giorni dopo il parto ( $P<0.05$ ).



**Fig. 3.1 – Andamento (Media ed Errore Standard Medio) della temperatura rettale nell'ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione in bovine con bassi (LO-IL6) o alti (UP-IL6) livelli di IL-6 durante gli ultimi 30-40 giorni di gravidanza. Le lettere a e b indicano differenze significative tra le medie dei due gruppi.**

In asciutta, il BCS (Fig.3.2) è risultato analogo tra i due gruppi, successivamente al parto, il BCS ha mostrato un maggiore calo nel gruppo UP-IL6 ( $P<0.05$ ). Nel complesso UP-IL6 ha mostrato una riduzione di 0,39 punti tra -7 giorni dal parto e 28° giorno di lattazione rispetto a 0,44 punti di LO-IL-6.

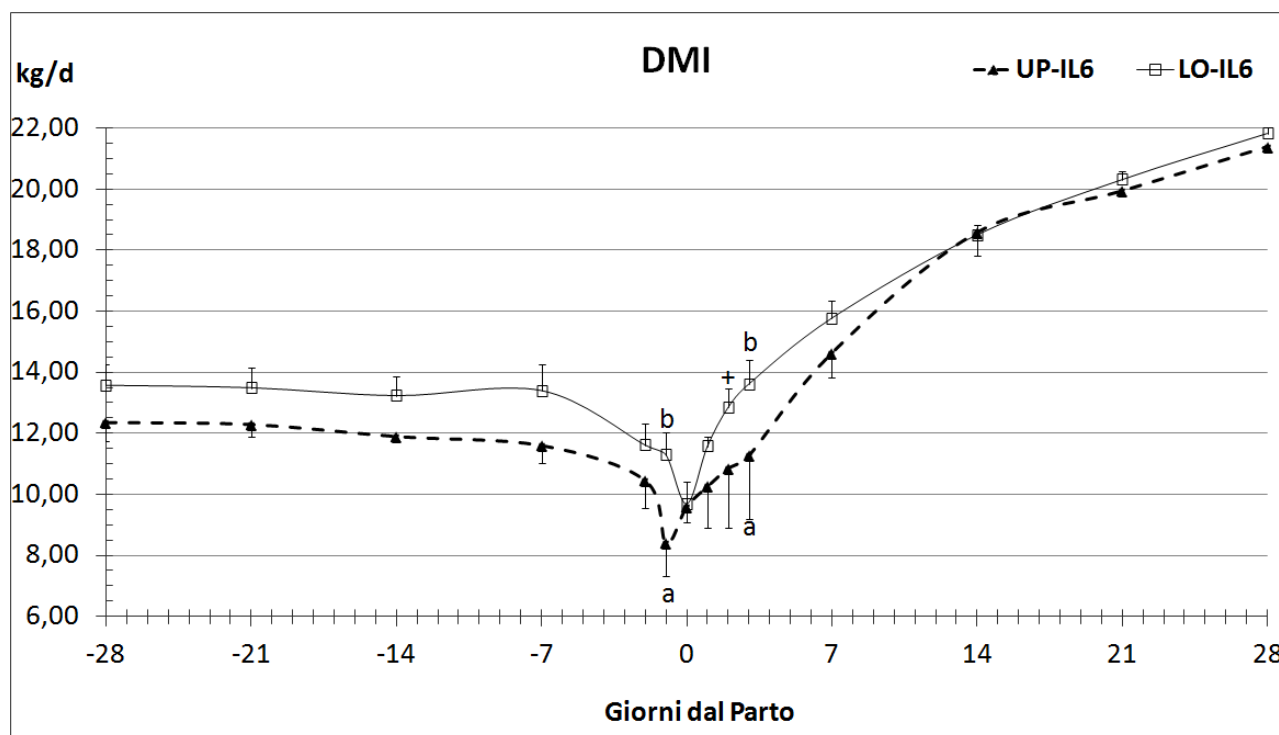


**Fig. 3.2 - Andamento (Media ed Errore Standard Medio) del  $\Delta$ BCS<sub>28</sub> nell'ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione in bovine con bassi (LO-IL6) o alti (UP-IL6) livelli di IL-6 durante gli ultimi 30-40 giorni di gravidanza. Le lettere a e b indicano differenze significative tra le medie dei due gruppi.**

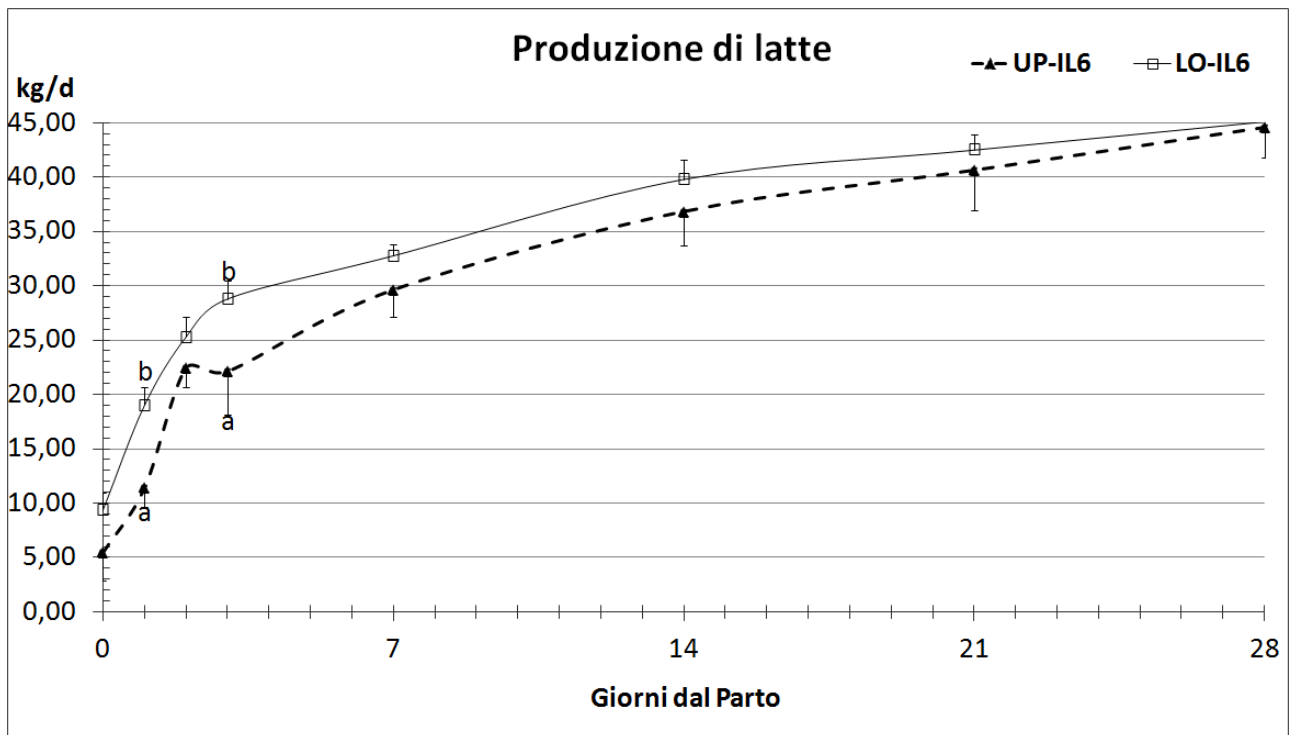
### Ingestione di sostanza secca e produzione di latte

Il gruppo UP-IL6 ha mostrato bassi livelli di ingestione di sostanza secca (Fig.3.3) e di produzione latte (Fig.3.4) rispetto al gruppo LO-IL6. La differenza di ingestione risulta essere più evidente in asciutta e significativa tra i due gruppi a -1 (P<0.01) ed a 3 (P<0.05) giorni dal parto.

La produzione latte è più elevata nel gruppo LO-IL6 ad 1 e a 3 giorni di lattazione (P<0.05), rispetto al gruppo UP-IL6.



**Fig. 3.3 – Andamento (Media ed Errore Standard Medio) dell'ingestione di sostanza secca (kg/d) nell'ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione in bovine con bassi (LO-IL) o alti (UP-IL) livelli di IL-6 durante gli ultimi 30-40 giorni di gravidanza. Le lettere a e b indicano differenze significative tra le medie dei due gruppi .**



**Fig. 3.4 - Andamento (Media ed Errore Standard Medio) della produzione di latte (kg/d) nell'ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione in bovine con bassi (LO-IL6) o alti (UP-IL6) livelli di IL-6 durante gli ultimi 30-40 giorni di gravidanza. Le lettere a e b indicano differenze significative tra le medie dei due gruppi.**

## **PARAMETRI DELLA RISPOSTA INFIAMMATORIA**

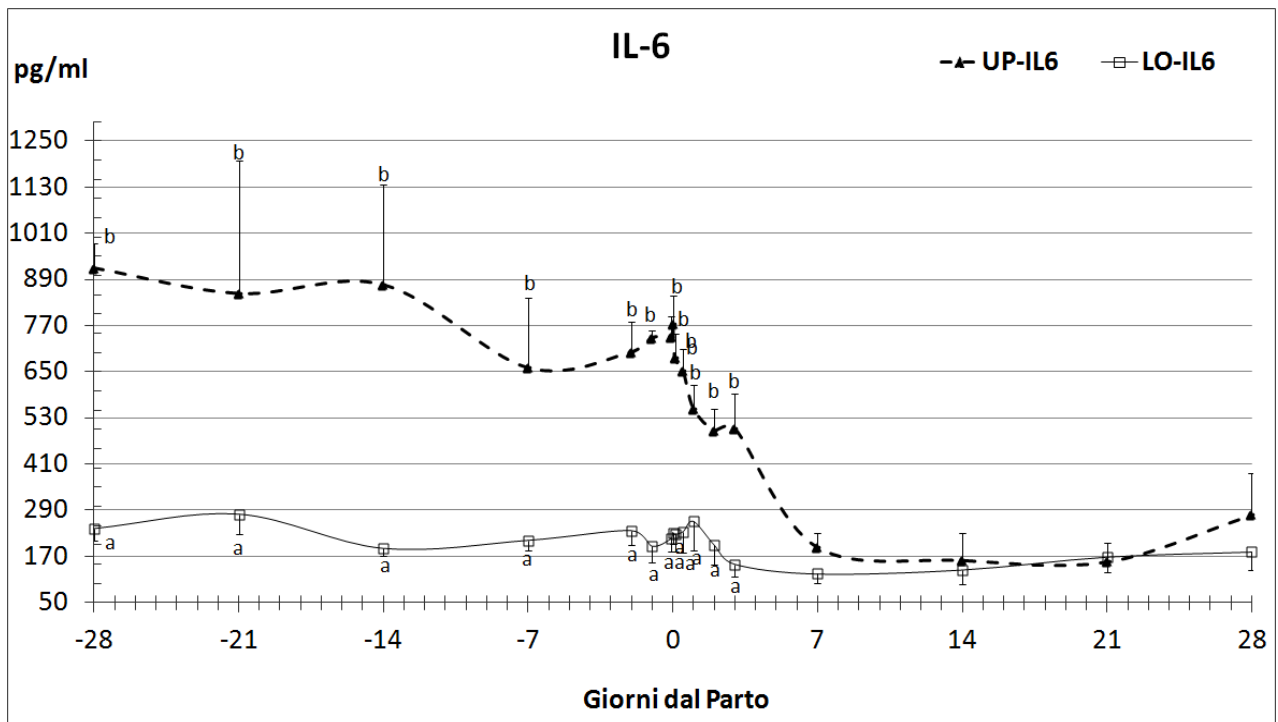
### **Citochine Pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ).**

Nelle figure 3.5, 3.6 e 3.7 sono riportate le variazioni plasmatiche del TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , rispettivamente.

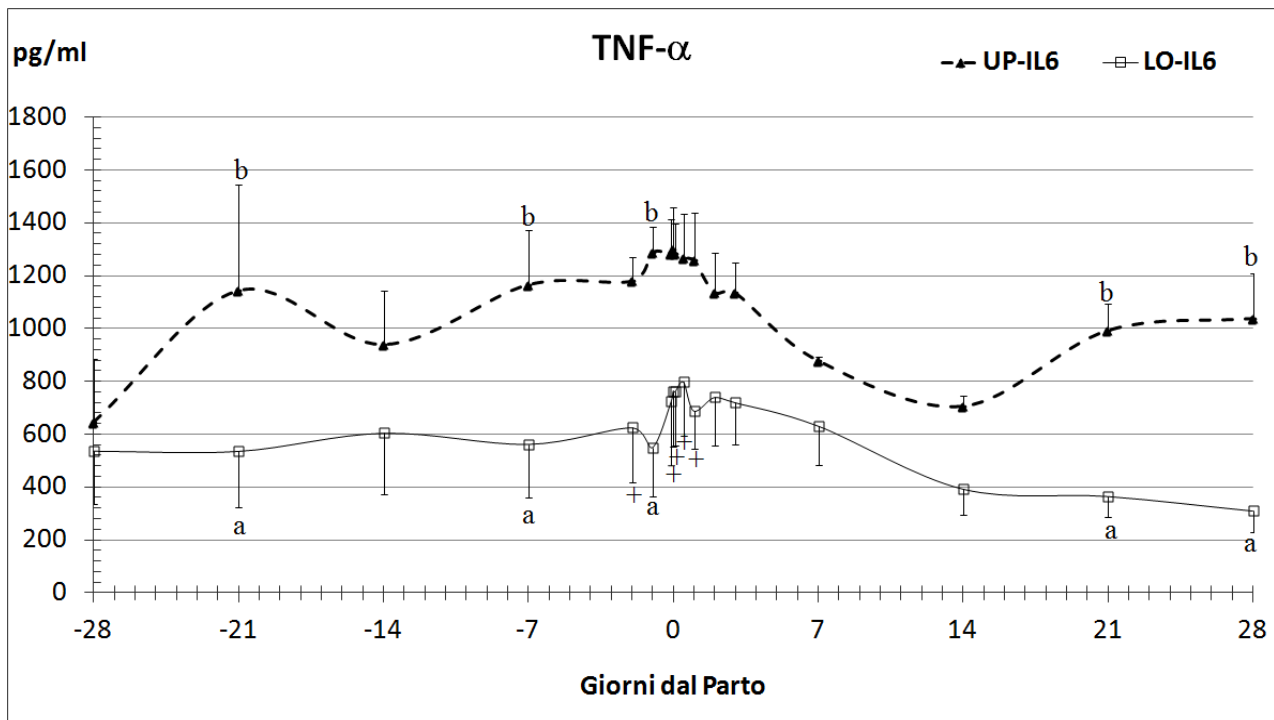
In fase di asciutta, il gruppo UP-IL6 ha mostrato livelli significativamente alti di IL-6 ( $P < 0.001$ ) come atteso, ma anche di TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ) e di IL-1 $\beta$  ( $P < 0.05$ ) rispetto al gruppo LO-IL6.

Al momento del parto (tra 1 ora prima e 24 dopo), è stato possibile osservare un picco delle tre citochine pro-infiammatorie, nel gruppo UP-IL6. Tali aumenti, osservati tra -7 giorni pre-parto ed uno o più prelievi ematici eseguiti entro le 24 ore post-parto, sono risultati essere statisticamente significativi solo per IL-1 $\beta$  ( $P < 0.05$ ), mentre il TNF- $\alpha$  e IL-6 hanno presentato questo breve rialzo ma non significativo. Invece, nel gruppo LO-IL6 i livelli plasmatici delle citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) non hanno mostrato alcuna variazione di rilievo.

Durante il primo mese di lattazione, i livelli plasmatici di IL-6 e TNF- $\alpha$  sono in generale diminuiti in entrambi i gruppi, almeno sino al 14° giorno dopo il parto. Tuttavia, il gruppo UP-IL6 ha mostrato un nuovo aumento dei livelli di TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ; rispetto a LO-IL-6) dal 21° giorno di lattazione.

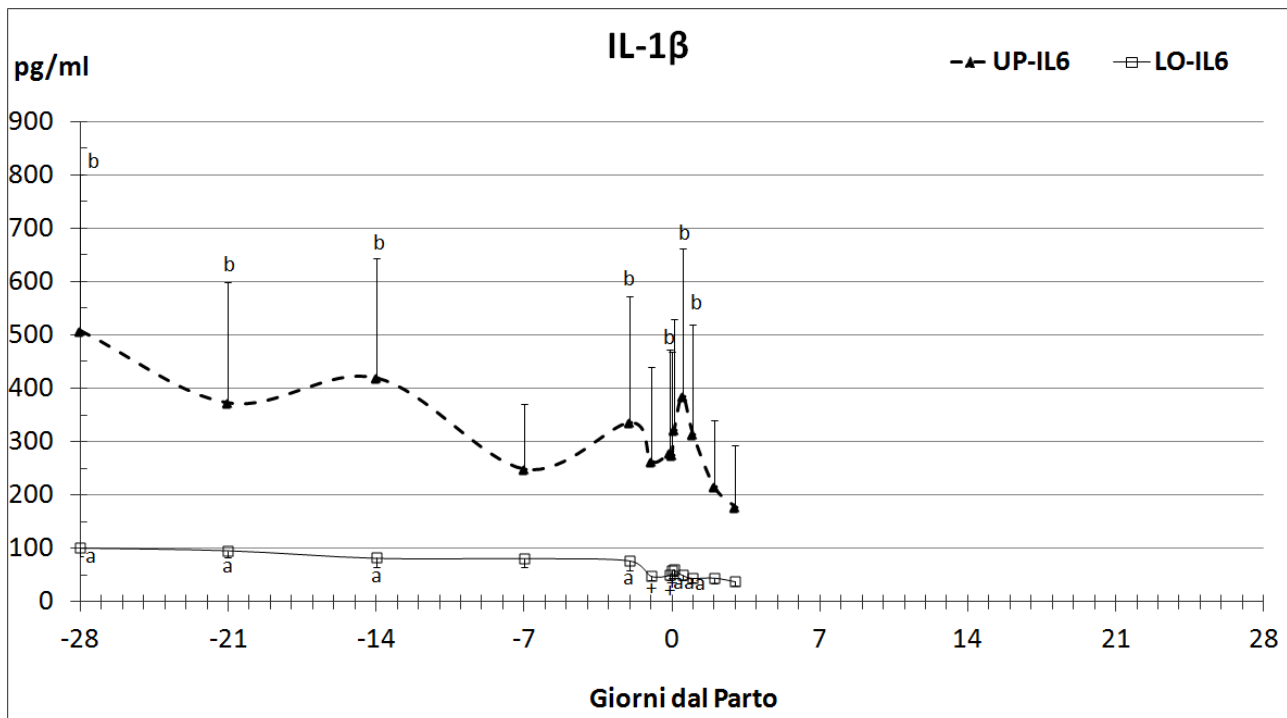


**Fig. 3.5 – Variazioni (Media ed Errore Standard Medio) plasmatiche dell'IL-6 nell'ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione in bovine con bassi (LO-IL6) o alti (UP-IL6) livelli di IL-6 durante gli ultimi 30-40 giorni di gravidanza. Le lettere a e b indicano differenze significative tra le medie dei due gruppi.**



**Fig. 3.6 –** Variazioni (Media ed Errore Standard Medio) plasmatiche del TNF- $\alpha$  nell'ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione in bovine con bassi (LO-IL6) o alti (UP-IL6) livelli di IL-6 durante gli ultimi 30-40 giorni di gravidanza. Le lettere a e b indicano differenze significative tra le medie dei due gruppi.





**Fig. 3.7–** Variazioni (Media ed Errore Standard Medio) plasmatiche dell'IL-1 $\beta$  nell'ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione in bovine con bassi (LO-IL6) o alti (UP-IL6) livelli di IL-6 durante gli ultimi 30-40 giorni di gravidanza. Le lettere a e b indicano differenze significative tra le medie dei due gruppi.

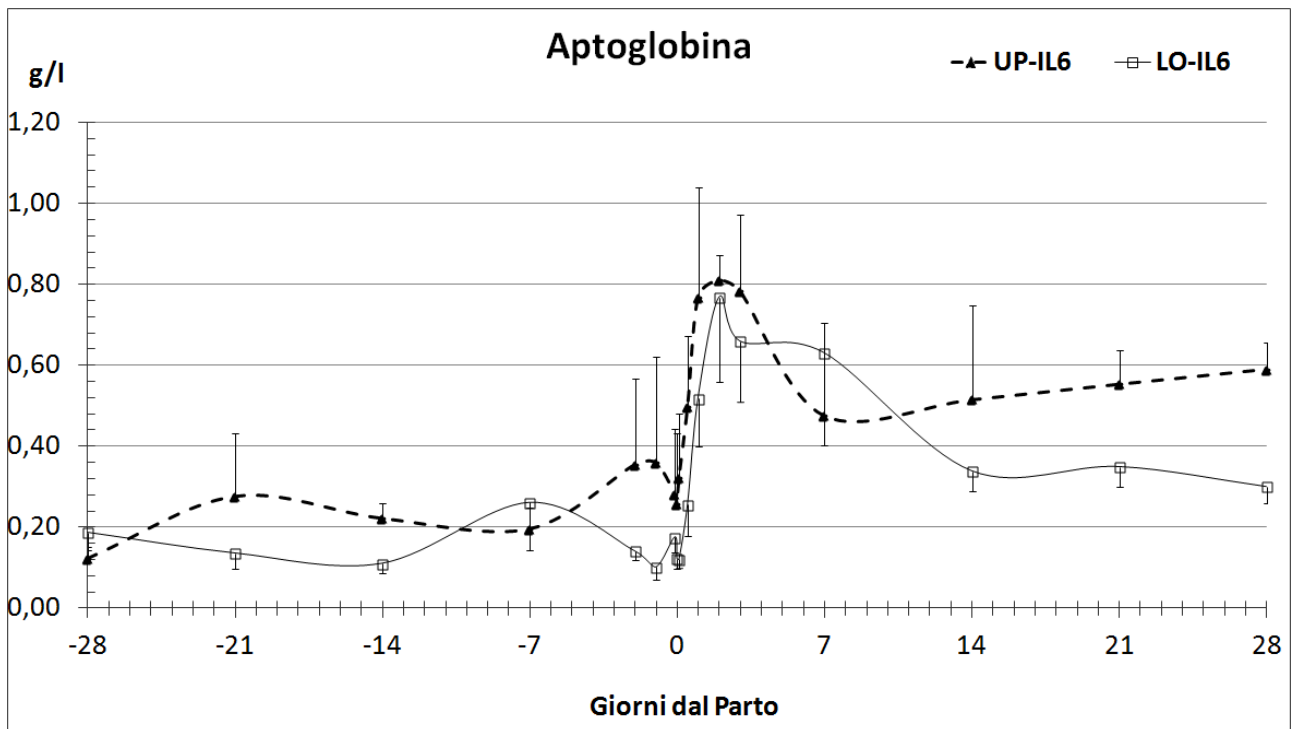
### Proteine positive di fase acuta (aptoglobina, ceruloplasmina)

Nelle figure 3.8 e 3.9 sono riportate le variazioni plasmatiche dell'aptoglobina e ceruloplasmina.

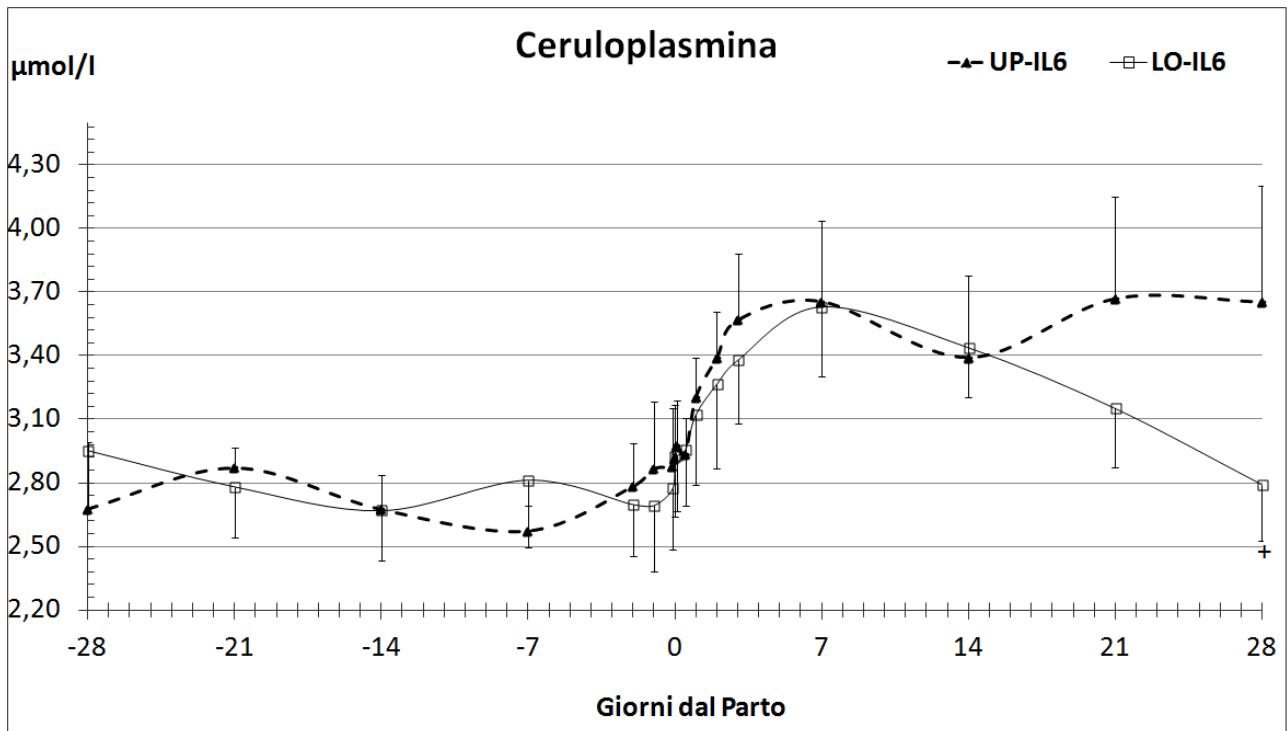
Le proteine positive di fase acuta hanno mostrato le tipiche variazioni osservate nel periparto con un aumento al parto, seguito da un calo più o meno rapido. Nel gruppo UP-IL6 rispetto al gruppo LO-IL6 tale aumento è risultato essere anticipato (2-3 giorni pre-parto, NS) e più prolungato.

La differenza tra UP-IL6 e LO-IL6 è tendenzialmente significativa nell'intero periodo ( $P < 0.10$ ).

La ceruloplasmina ha mostrato un trend analogo tra i due gruppi, con aumento dopo il parto, ma a 21 e 28 giorni di lattazione solo LO-IL6 si riduce ( $P < 0.10$  a 28 DIM) rispetto ad UP-IL6.



**Fig. 3.8 – Variazioni (Media ed Errore Standard Medio) plasmatiche dell'aptoglobina nell'ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione in bovine con bassi (LO-IL6) o alti (UP-IL6) livelli di IL-6 durante gli ultimi 30-40 giorni di gravidanza.**

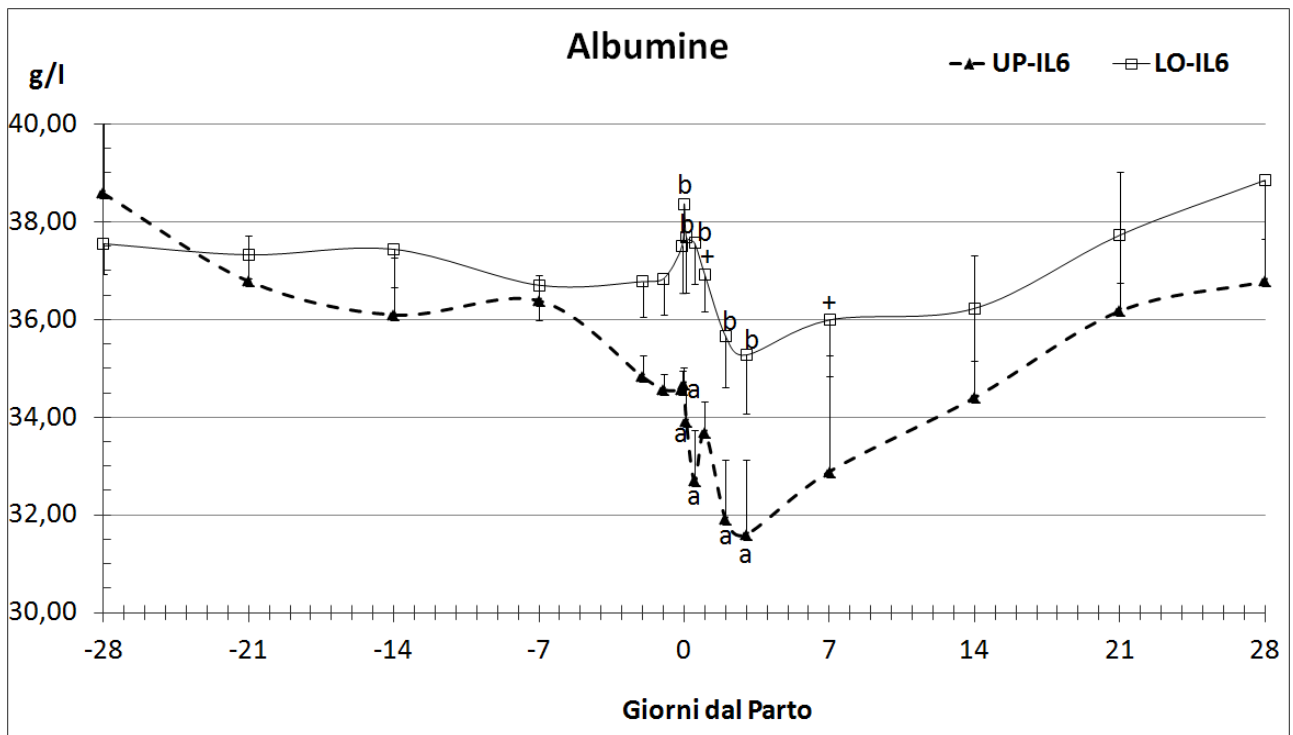


**Fig. 3.9 – Variazioni (Media ed Errore Standard Medio) plasmatiche ceruloplasmina nell’ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione in bovine con bassi (LO-IL6) o alti (UP-IL6) livelli di IL-6 durante gli ultimi 30-40 giorni di gravidanza.**

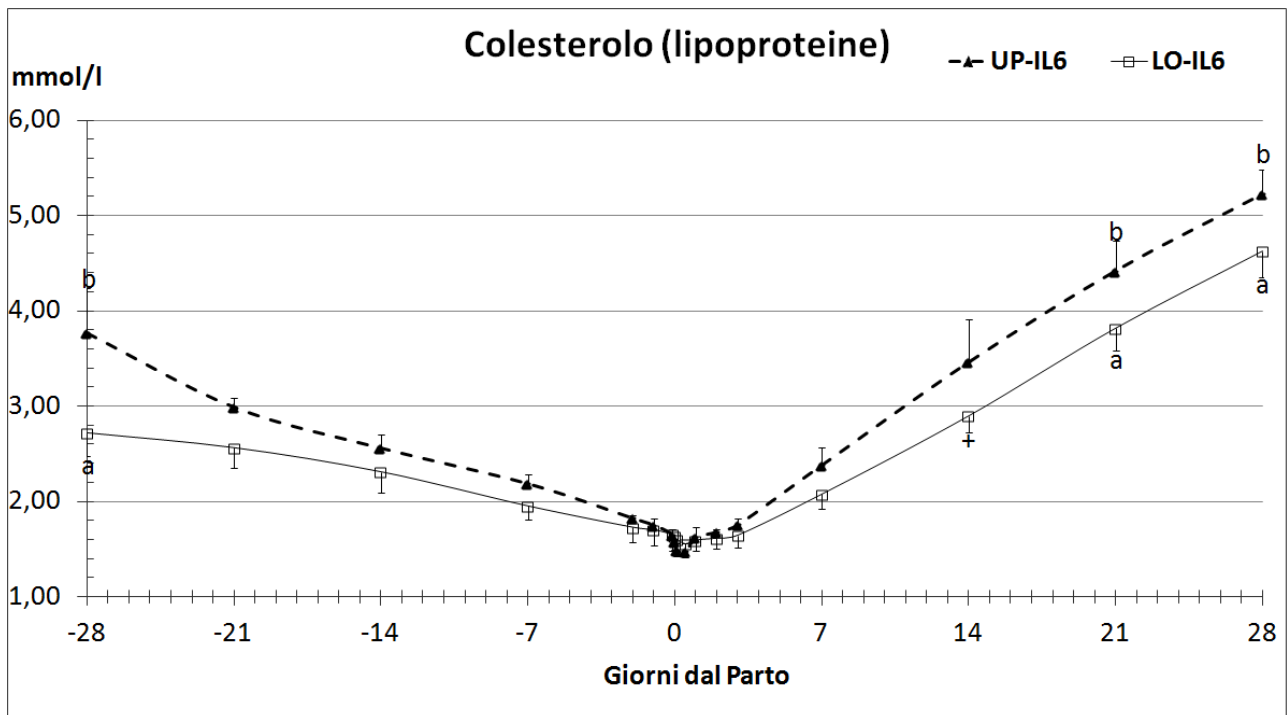
### Proteine negative di fase acuta (albumine e lipoproteine)

Nelle Fig.3.10 e Fig. 3.11 sono rappresentate le variazioni plasmatiche di albumine e colesterolo (indice delle lipoproteine) dei gruppi UP-IL6 e LO-IL6, rispettivamente.

Anche le albumine ed il colesterolo hanno mostrato in entrambi i gruppi l’andamento tipico delle bovine nel periparto, con un progressivo calo dalla fase di asciutta sino al momento del parto ed un recupero più o meno rapido subito dopo di esso. Nel gruppo UP-IL6 è stato riscontrato un calo più marcato di colesterolo ed albumine prima del parto ed un innalzamento dopo di questo che però si differenzia: il colesterolo è più rapido e le albumine sono più lente in UP-IL6. Per tali ragioni, le albumine mostrano differenze statisticamente significative tra i due gruppi – valori inferiori in UP-IL6 - dal momento del parto al 3° giorno dopo il parto ( $P < 0.01$ ). Il colesterolo, invece, presenta livelli spesso statisticamente più elevati in UP-IL6 vs LO-IL6. Questa differenza è presente fin da 28 giorni prima del parto ( $P < 0.001$ ) e riappare tra 21 e 28 giorni di lattazione ( $P < 0.05$ ).

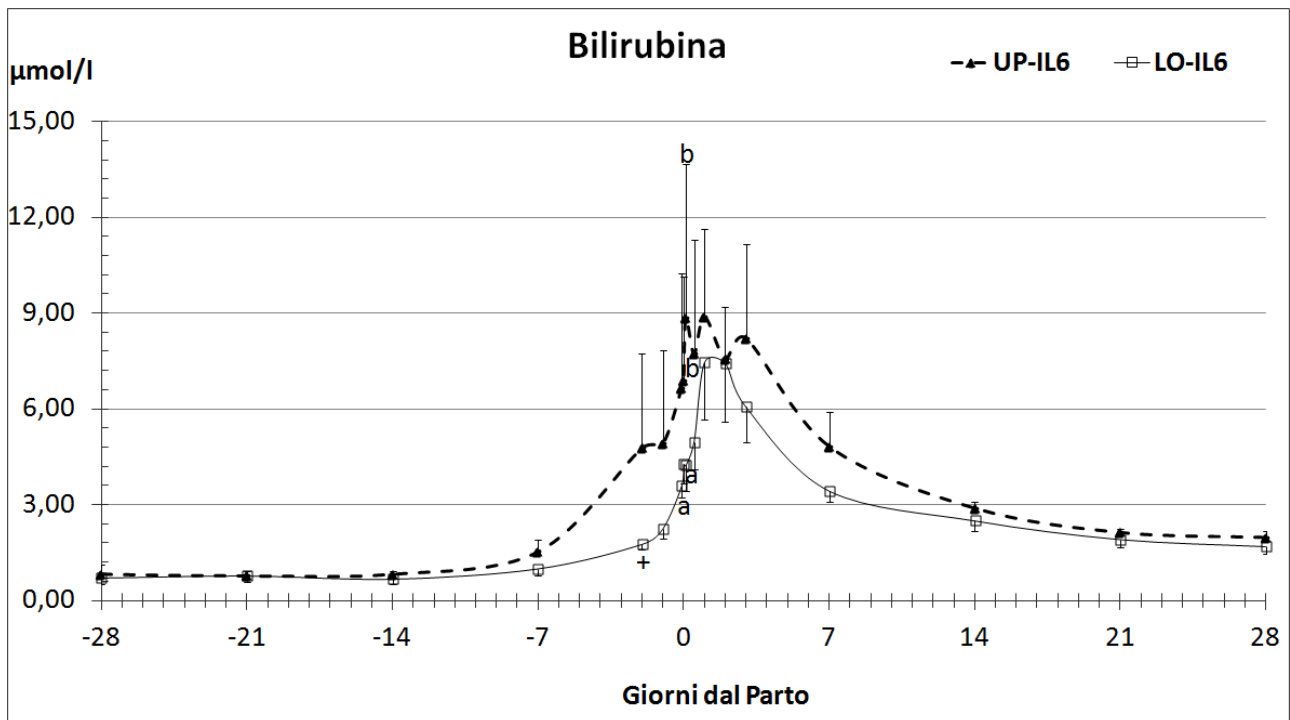


**Fig. 3.10 – Variazioni (Media ed Errore Standard Medio) plasmatiche di albumine nell'ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione in bovine con bassi (LO-IL6) o alti (UP-IL6) livelli di IL-6 durante gli ultimi 30-40 giorni di gravidanza. Le lettere a e b indicano differenze significative tra le medie dei due gruppi.**



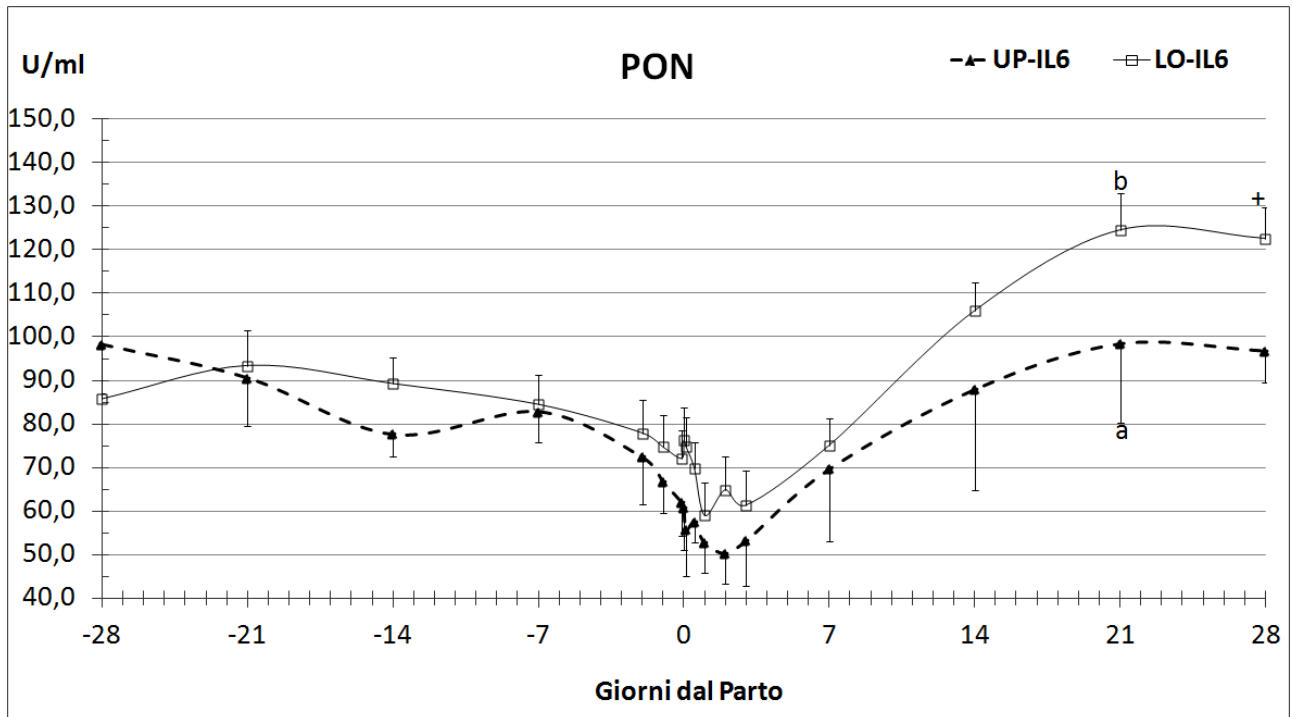
**Fig. 3.10 – Variazioni (Media ed Errore Standard Medio) plasmatiche di colesterolo (indice delle lipoproteine) nell'ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione in bovine con bassi (LO-IL6) o alti (UP-IL6) livelli di IL-6 durante gli ultimi 30-40 giorni di gravidanza. Le lettere a e b indicano differenze significative tra le medie dei due gruppi.**

La bilirubina (Fig.3.12), che non è una proteina ma il suo livello dipende dagli enzimi epatici di clearance, ha mostrato un aumento già prima del parto, con un picco al 1° e/o al 2° DIM in tutte le bovine. In UP-IL6 vs LO-IL-6 l'aumento è iniziato prima del parto (3 giorni), ed è stato più marcato a 4 ore dopo il parto ( $P < 0.01$ ) ed il successivo calo è stato più lento.



**Fig. 3.12 – Variazioni (Media ed Errore Standard Medio) plasmatiche della bilirubina nell'ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione in bovine con bassi (LO-IL6) o alti (UP-IL6) livelli di IL-6 durante gli ultimi 30-40 giorni di gravidanza. Le lettere a e b indicano differenze significative tra le medie dei due gruppi.**

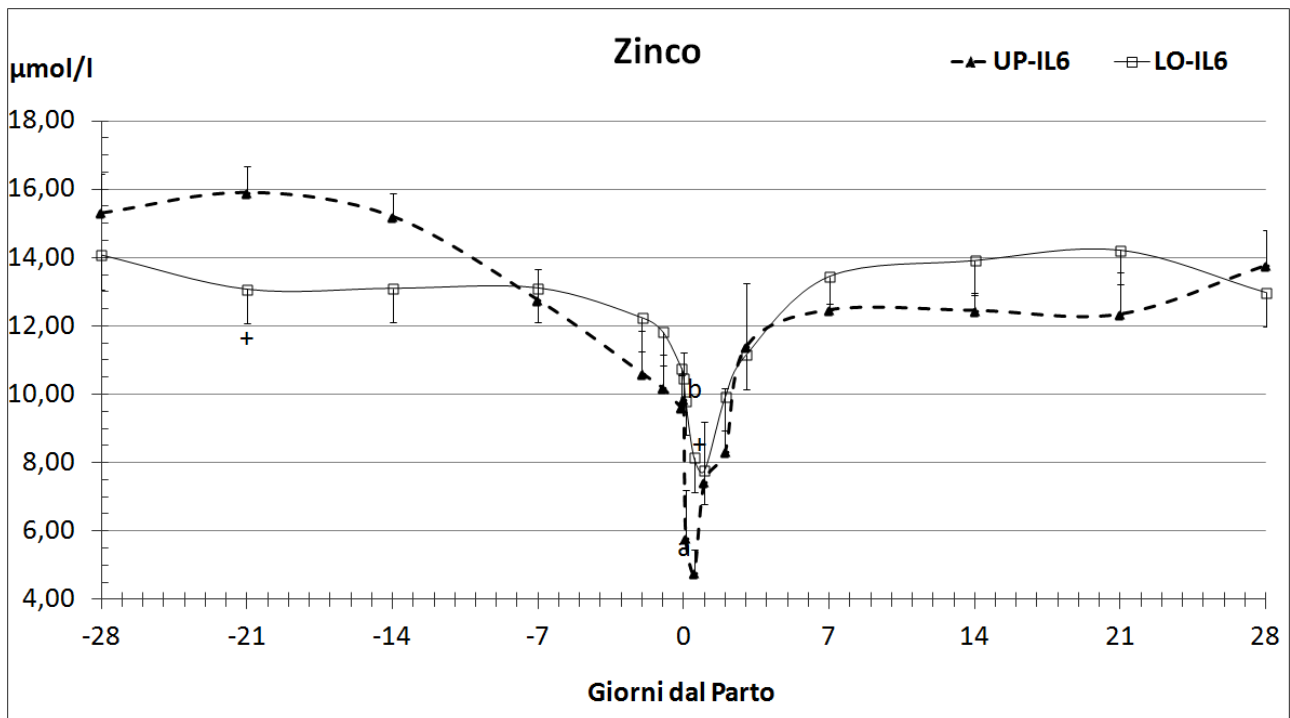
La PON (Fig. 3.13) ha mostrato un calo progressivo nell'ultimo mese di gestazione in entrambi i gruppi, anche se più accentuato in UP-IL6. Dopo il parto, le concentrazioni plasmatiche di PON sono aumentate in entrambi i gruppi, ma in modo più marcato in LO-IL6 giungendo a differenze significative al 21° giorno di lattazione ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 3.13 – Variazioni (Media ed Errore Standard Medio) plasmatiche di PON nell’ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione in bovine con bassi (LO-IL6) o alti (UP-IL6) livelli di IL-6 durante gli ultimi 30-40 giorni di gravidanza. Le lettere a e b indicano differenze significative tra le medie dei due gruppi.**

Anche lo zinco (Fig.3.14), la vitamine A (Fig.3.15) ed E (Fig.3.16) mostrano il tipico andamento delle bovine al parto, caratterizzato da un calo al parto ed un rapido recupero, spesso iniziato durante la prima settimana di lattazione.

In asciutta, il gruppo UP-IL6 ha mostrato livelli di zinco (NS) inizialmente più alti di LO-IL6. Immediatamente prima e dopo il parto si è avuto il calo in tutti i soggetti, ma più marcato in UP-IL6 vs LO-IL6 ( $P < 0.05$ ) a poche ore dopo il parto.

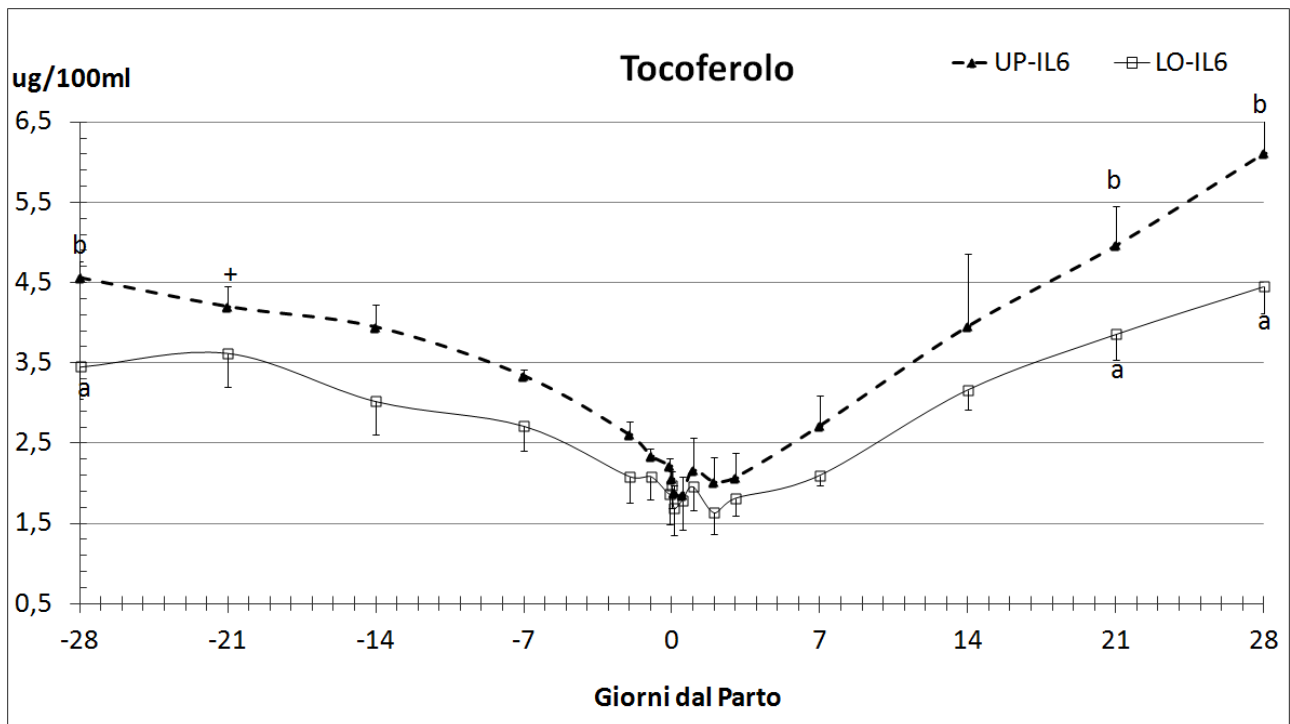


**Fig. 3.14 – Variazioni (Media ed Errore Standard Medio) plasmatiche di zinco nell'ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione in bovine con bassi (LO-IL6) o alti (UP-IL6) livelli di IL-6 durante gli ultimi 30-40 giorni di gravidanza. Le lettere a e b indicano differenze significative tra le medie dei due gruppi.**

Il retinolo ha presentato livelli più elevati in UP-IL6 prima del parto, un calo più marcato al parto, mentre in lattazione le differenze con LO-IL6 sono andate diminuendo. Ad ogni modo non sono mai state osservate differenze statisticamente significative.

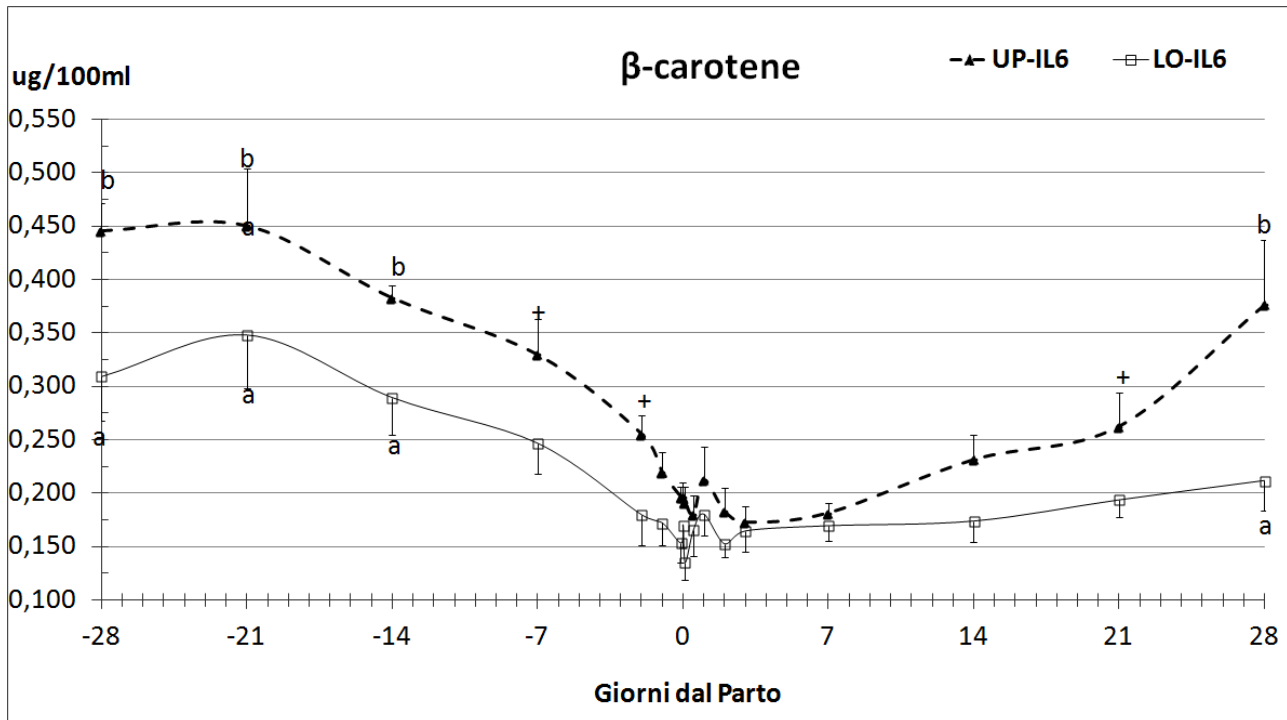
Il tocoferolo (Fig.3.15) è pure risultato più elevato in UP-IL6 vs LO-IL6 in asciutta. Dopo il calo osservato a poche ore dopo il parto. Le differenze statistiche tra i due gruppi sono state osservate a 21 ( $P < 0.05$ ) ed a 28 ( $P < 0.01$ ) giorni di lattazione.





**Fig. 3.15 – Variazioni (Media ed Errore Standard Medio) plasmatiche di tocoferolo nell'ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione in bovine con bassi (LO-IL6) o alti (UP-IL6) livelli di IL-6 durante gli ultimi 30-40 giorni di gravidanza. Le lettere a e b indicano differenze significative tra le medie dei due gruppi.**

In fase di asciutta, i livelli plasmatici del  $\beta$ -carotene (Fig.3.16) sono risultati più alti nel gruppo UP-IL6 (spesso  $P < 0.05$ ) rispetto al gruppo LO-IL6. In prossimità del parto c'è stato un calo in entrambi i gruppi (NS), ma successivamente si è avuto un aumento nei livelli plasmatici più marcato nel gruppo UP-IL6 al 28° giorno di lattazione ( $P < 0.001$ ) rispetto al gruppo LO-IL6.



**Fig. 3.16 – Variazioni (Media ed Errore Standard Medio) plasmatiche di  $\beta$ -carotene nell'ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione in bovine con bassi (LO-IL6) o alti (UP-IL6) livelli di IL-6 durante gli ultimi 30-40 giorni di gravidanza. Le lettere a e b indicano differenze significative tra le medie dei due gruppi.**

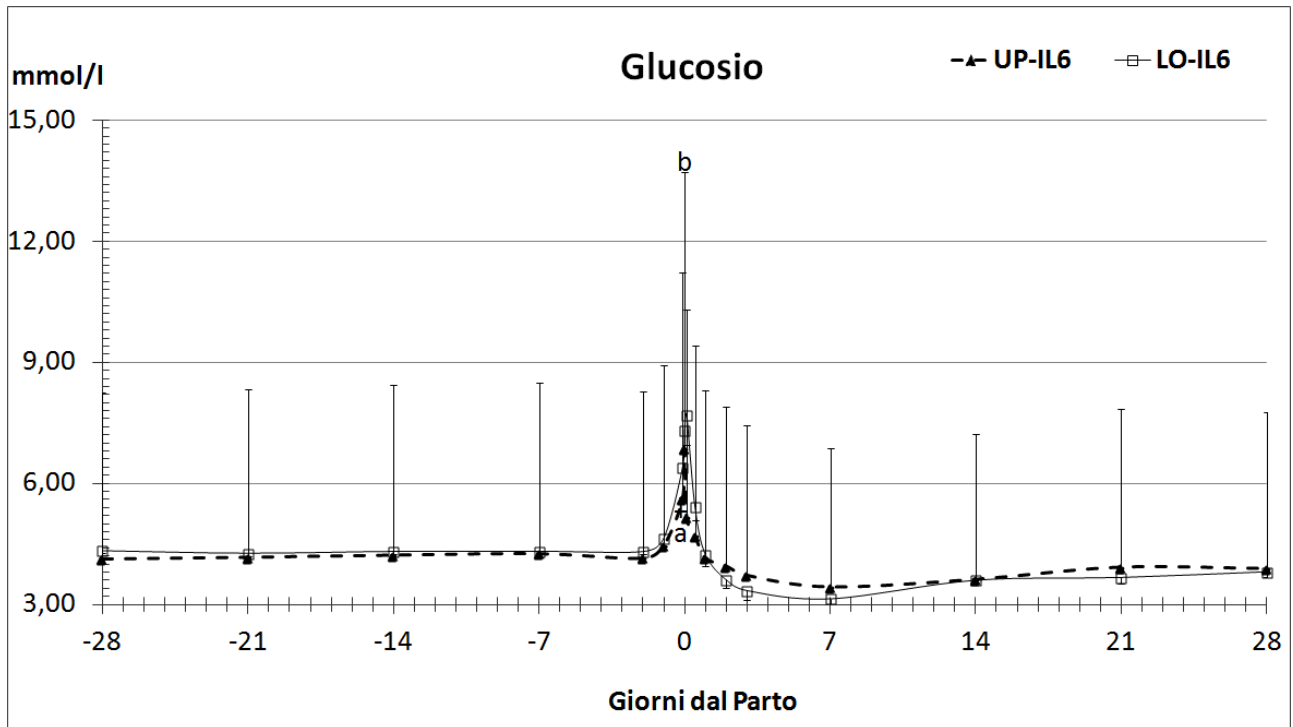
### **Parametri del metabolismo energetico e proteico.**

In fase di asciutta, le variazioni plasmatiche del glucosio (Fig.3.17) sono state pressochè nulle in entrambi i gruppi. Tuttavia, il livello di glucosio è risultato essere leggermente inferiore nel gruppo UP-IL6. Il glucosio ha mostrato il classico temporaneo picco al parto, seguito da una riduzione repentina. Tale calo è risultato più marcato nel gruppo UP-IL6 a poche ore dopo il parto ( $P < 0.001$ ). I NEFA hanno mostrato un progressivo aumento immediatamente prima del parto, il picco è stato osservato al 1° giorno dopo il parto, successivamente le variazioni plasmatiche sono state analoghe tra i gruppi.

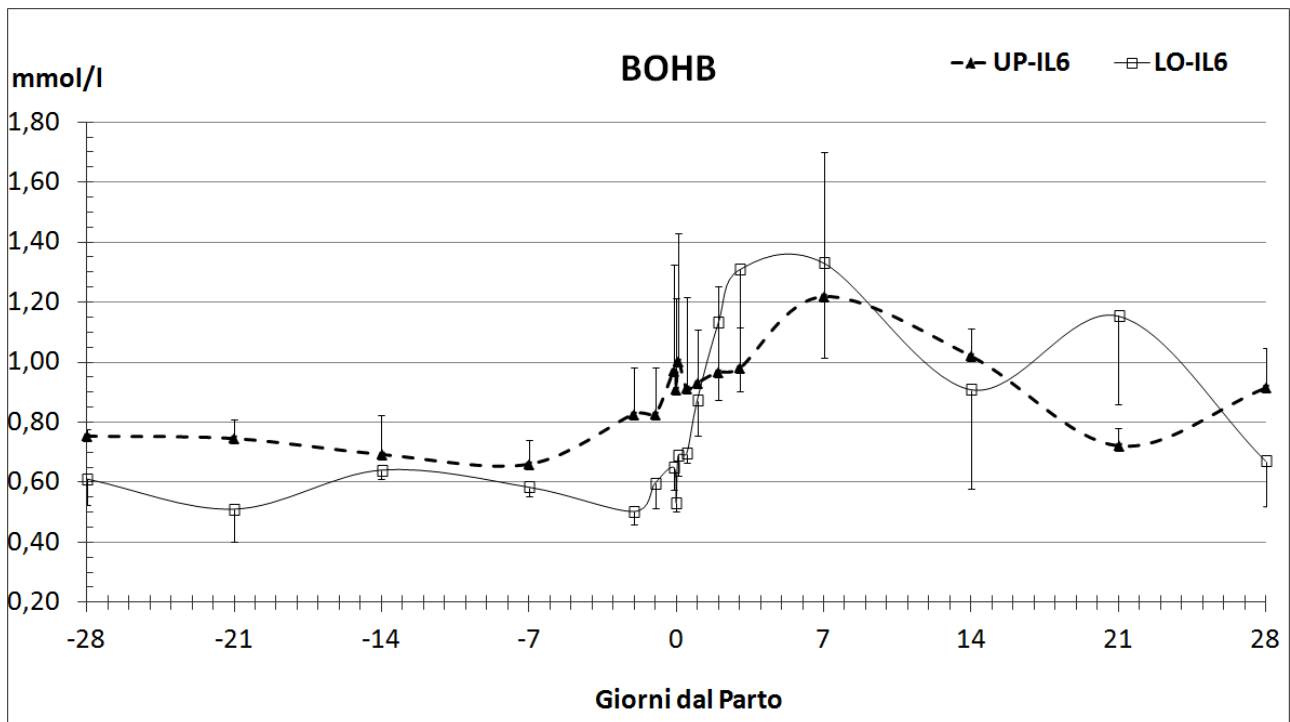
Il  $\beta$ -idrossibutirrato (BOHB) (Fig.3.18) è aumentato progressivamente nei giorni prima del parto in UP-IL6, mentre in LO-IL6 l'aumento è stato osservato solo dopo il parto stesso. Il picco raggiunto nei primi giorni di lattazione è stato numericamente più elevato in LO-IL6

L'urea (Fig. 3.19) è risultata pressochè costante sino a 7 giorni prima del parto in entrambi i gruppi. Quindi, in UP-IL6, ma non in LO-IL6, vi è stato un rialzo di urea immediatamente prima del parto. Successivamente al parto, invece, entrambi i gruppi hanno mostrato un marcato rialzo a cui ha fatto seguito un calo, più consistente e prolungato in UP-IL6, senza tuttavia mai mostrare differenze statistiche rispetto a LO-IL6.

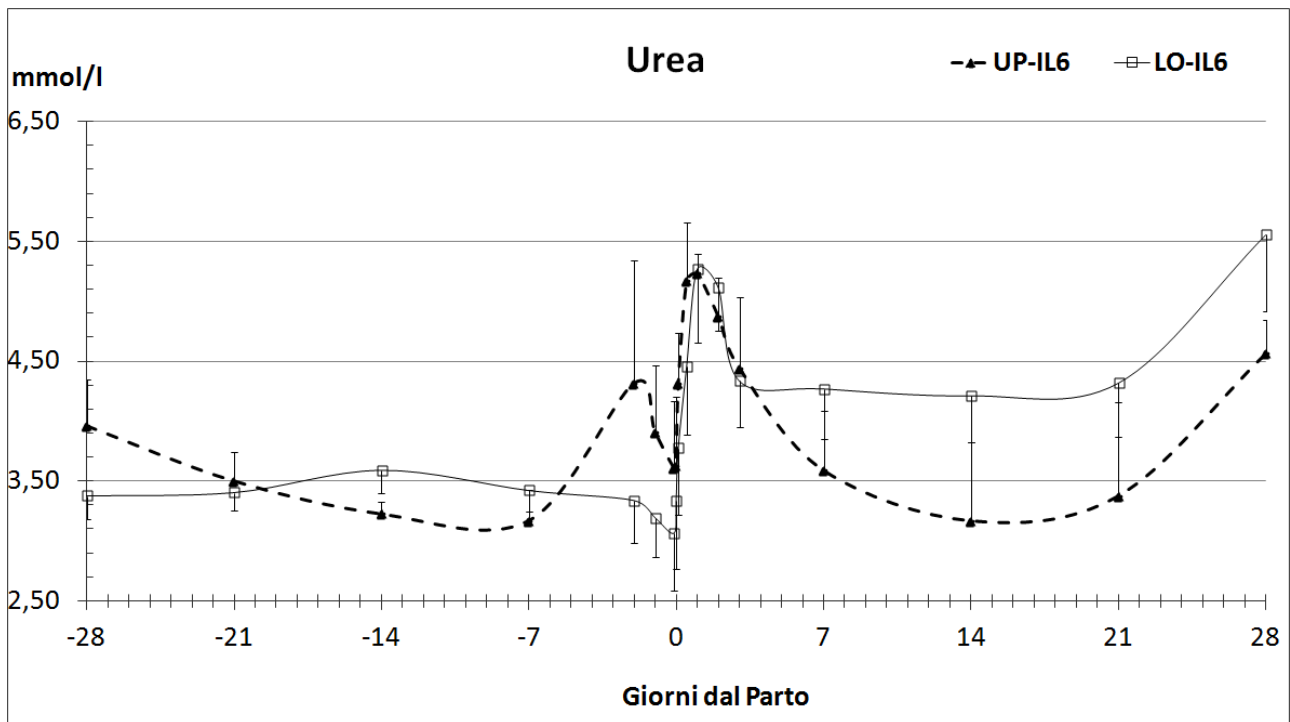
I livelli plasmatici di creatinina (Fig.3.20) sono stati sempre più bassi nel gruppo UP-IL6 vs LO-IL6 durante l'intero periodo di osservazione ( $P < 0.05$ ). Al momento del parto si è avuto un picco tendenzialmente più alto nel gruppo LO-IL6 ( $P < 0.10$ ) rispetto al gruppo UP-IL-6. Successivamente le concentrazioni sono andate progressivamente diminuendo fino al 28° giorno di lattazione in entrambi i gruppi.



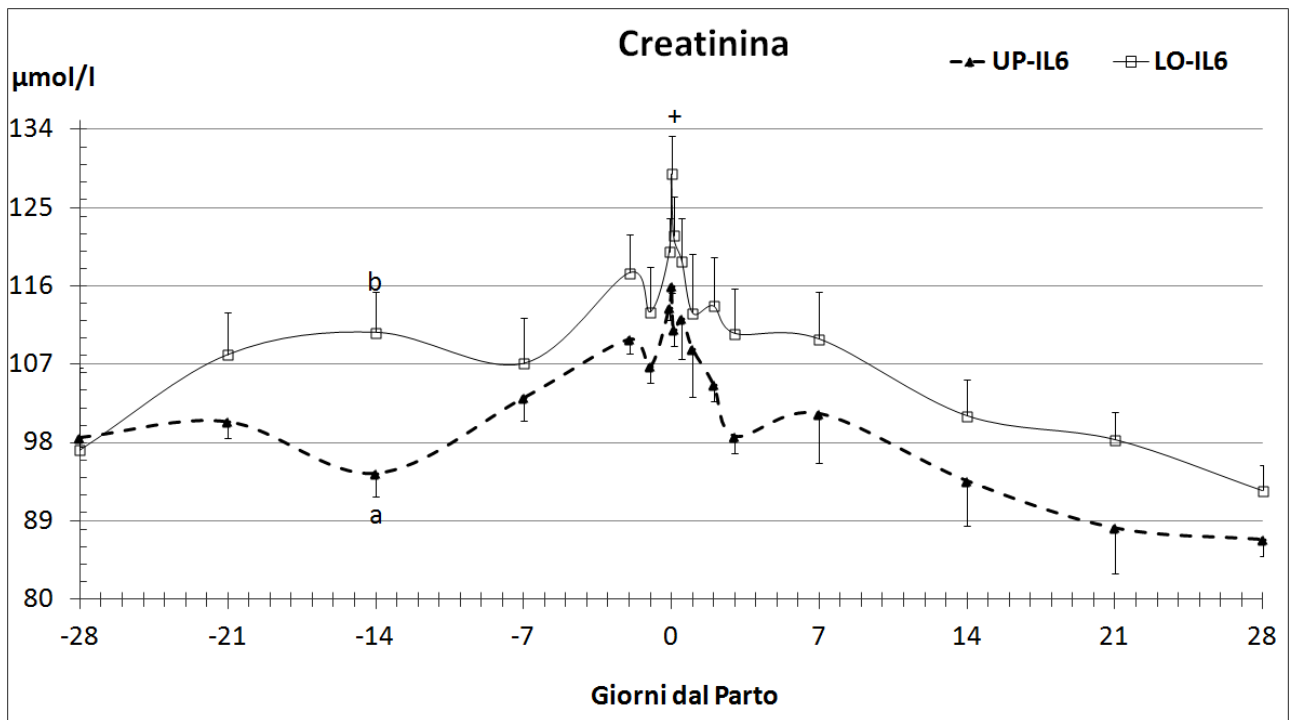
**Fig. 3.17 –** Variazioni (Media ed Errore Standard Medio) plasmatiche di glucosio nell'ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione in bovine con bassi (LO-IL6) o alti (UP-IL6) livelli di IL-6 durante gli ultimi 30-40 giorni di gravidanza. Le lettere a e b indicano differenze significative tra le medie dei due gruppi.



**Fig. 3.18 –** Variazioni (Media ed Errore Standard Medio) plasmatiche di BOHB nell'ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione in bovine con bassi (LO-IL6) o alti (UP-IL6) livelli di IL-6 durante gli ultimi 30-40 giorni di gravidanza.



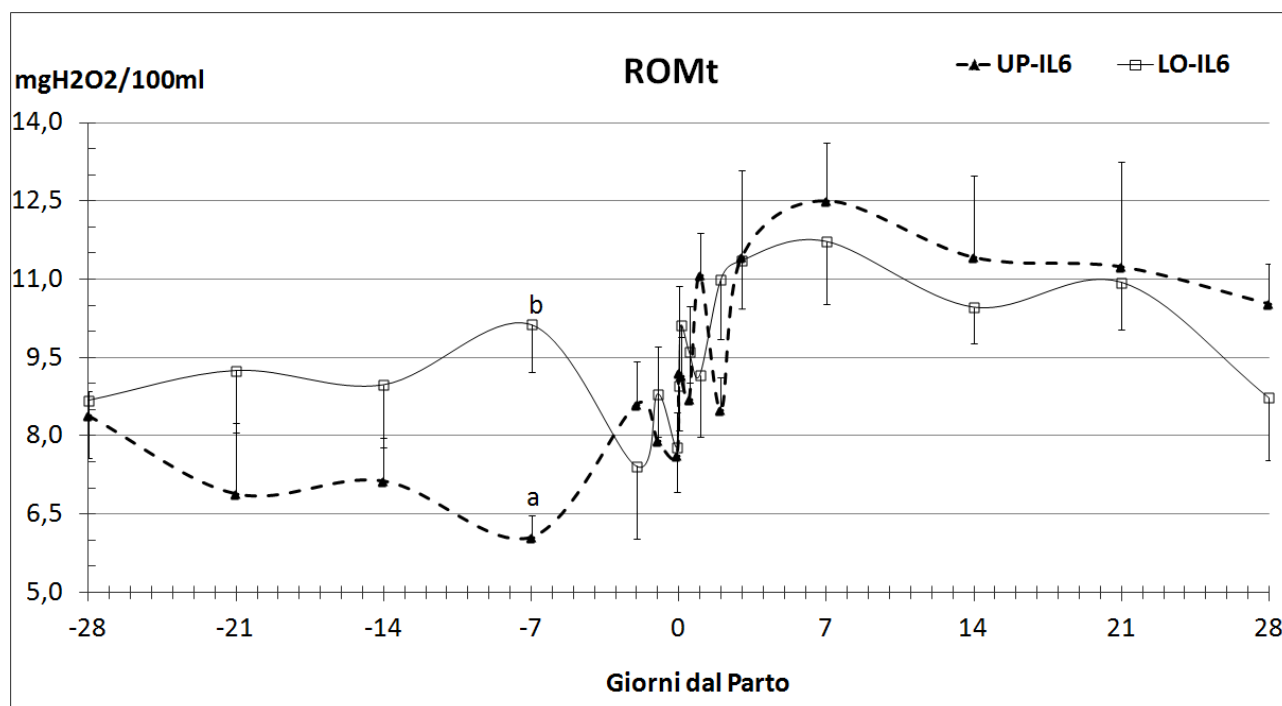
**Fig. 3.19 – Variazioni (Media ed Errore Standard Medio) plasmatiche di urea nell'ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione in bovine con bassi (LO-IL6) o alti (UP-IL6) livelli di IL-6 durante gli ultimi 30-40 giorni di gravidanza.**



**Fig. 3.20 – Variazioni (Media ed Errore Standard Medio) plasmatiche di creatinina nell'ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione in bovine con bassi (LO-IL6) o alti (UP-IL6) livelli di IL-6 durante gli ultimi 30-40 giorni di gravidanza. Le lettere a e b indicano differenze significative tra le medie dei due gruppi.**

### Parametri dello stress ossidativo.

I ROM (Fig.3.21) hanno mostrato concentrazioni plasmatiche più alte prima del parto nel gruppo LO-IL6 ( $P < 0.05$  vs UP-IL6 al 7° giorno pre-parto). Mentre dopo il parto, i ROM sono aumentati in entrambi i gruppi, ma sono stati più alti nel gruppo UP-IL6 (NS). Da sottolineare che i livelli plasmatici dei ROMt sono stati numericamente più alti in UP-IL6 per tutto il mese di lattazione, mentre in fase di asciutta sono stati più bassi ( $P < 0.05$ ) rispetto al gruppo LO-IL6.



**Fig. 3.21 – Variazioni (Media ed Errore Standard Medio) plasmatiche di ROM nell'ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione in bovine con bassi (LO-IL6) o alti (UP-IL6) livelli di IL-6 durante gli ultimi 30-40 giorni di gravidanza. Le lettere a e b indicano differenze significative tra le medie dei due gruppi.**



### **3.5 Discussione**

La fase di transizione è un periodo di importanti sollecitazioni fisiologiche per la bovina da latte, infatti durante questa fase, possono manifestarsi, oltre al ben noto deficit energetico (Drackley, 1999), fenomeni infiammatori specialmente nell'intorno del parto (Trevisi e coll., 2009), spesso senza la presenza di sintomi clinici evidenti (Bertoni e coll., 2008). La risposta infiammatoria è notoriamente determinata da un rilascio di citochine pro-infiammatorie (Trevisi e coll., 2008); si è quindi voluto verificare se, nelle bovine da latte, tale rilascio avvenga già prima o sia successivo al parto e se il livello delle citochine sia utile per stabilire la severità dell'evento infiammatorio.

#### **Variazioni delle Citochine pro-infiammatorie in Asciutta.**

La variazione delle citochine nel periparto è stata poco indagata. Da questo studio è emerso che i livelli plasmatici medi delle tre principali citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) possono essere molto diversi già prima del parto. Inoltre pur non essendo state riscontrate marcate oscillazioni nell'ultimo mese di gravidanza è evidente un ulteriore aumento significativo dell'IL-1 $\beta$  un giorno o due prima del parto nel gruppo UP-IL6 (Fig.3.7).

Questi dati concordano con un recente studio condotto su topi (Orsi e coll., 2006), dove non sono state osservate variazioni di rilievo delle citochine pro-infiammatorie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ed IL-6 durante la gravidanza, ma vi è stato un loro aumento significativo il giorno precedente il parto. In un precedente lavoro condotto su bovine, dove Trevisi e coll. (2009) hanno somministrato l'INF- $\alpha$  nel periparto, hanno osservato in tutti i soggetti, anche quelli di controllo, alti livelli di IL-6 e TNF- $\alpha$  spesso già prima del parto, confermando quindi che le citochine possono essere molto alte nella fase terminale di gravidanza. Gli stessi autori hanno rilevato che i livelli di IL-6 erano correlati con alti livelli di ceruloplasmina e bassi di lisozima nel siero. Nella donna è stato osservato che il fenomeno infiammatorio, con la conseguente produzione di citochine, è comune sia tra soggetti con parto normale che nei pretermini (Lindstöm e coll., 2005). Hauguel-de Mouzon e coll. (2006) hanno individuato la placenta come organo di produzione di tali citochine pro-infiammatorie, ma lo stesso parto di per sé – in quanto causa di aumento di NF-kB nelle cellule (Lindström e coll., 2005) - può determinare un maggiore rilascio di citochine pro-infiammatorie. Inoltre, in un altro studio, condotto sulle donne in stato di gravidanza, è stato dimostrato che i livelli medi di TNF- $\alpha$  ed IL-6 erano incrementati in modo statisticamente significativo in funzione dello stress stimato durante la gravidanza ed il parto secondo un apposito punteggio con l'approssimarsi al parto (Coussons-Read e coll., 2005).

Pertanto da questi risultati emerge che nella fase terminale di gestazione dei mammiferi si può verificare un aumento delle citochine pro-infiammatorie, fenomeno possibile anche nelle bovine. Nel nostro caso, ancora più importante dell'innalzamento osservato nel periparto, è la diversità di livello di tali mediatori molto tempo prima del parto, che potrebbe giustificare un differente status infiammatorio preparto più o meno stabile a cui potrebbe anche corrispondere una diversa risposta a nuovi stimoli infiammatori (ad esempio quelli associati al parto). Infatti, del tutto sorprendente è la constatazione che la ripartizione delle bovine fra LO- ed UP-IL6 (e la IL-1 $\beta$  ed il TNF- $\alpha$  confermano la ripartizione), non ha riscontro in livelli diversi di APPs positive e negative. La presenza di correlazioni positive tra IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  con le proteine positive di fase acuta (aptoglobina e ceruloplasmina) prima del parto e tra IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  con la PON (una APP negativa) conferma che, indipendentemente dal livello delle citochine nel plasma, la presenza di fattori che causano risposte infiammatorie, anche modeste, provoca ulteriori piccoli innalzamenti sia delle citochine che delle APPs positive e cali di alcune APPs negative. Le ragioni per cui queste variazioni ematiche si verificano solo in prossimità del parto, non è facile da spiegare, anche perché non paiono esistere ricerche analoghe in letteratura.

#### **Variazioni delle citochine ad inizio lattazione.**

Appena prima o in concomitanza del parto, tutte le citochine pro-infiammatorie hanno mostrato un innalzamento in UP-IL6 a cui è seguita una riduzione, specialmente dell'IL-6. Il TNF- $\alpha$ , al contrario, è nuovamente aumentato nel primo mese di lattazione. Questo picco delle citochine osservato al parto potrebbe essere spiegato da fattori stressogeni (es. psicofisico, traumatico, affaticamento) che potrebbero aver indotto il rilascio di tali mediatori pro-infiammatori in seguito all'attivazione delle cellule del sistema immunitario (es. Neutrofili e Natural Killer; Petersen e Pedersen, 2002). Infatti in alcuni studi effettuati nell'uomo è stato visto che l'esercizio fisico induce il rilascio di citochine pro-infiammatorie, quali IL-1 $\beta$  e IL-6, analogo a quello osservato in relazione alle malattie di origine batterica (Pedersen e coll., 1998). Dato che il parto è un evento che richiede uno sforzo, talora molto sostenuto, si ritiene che questo picco di citochine possa essere correlato ad esso (almeno quello che segue immediatamente il travaglio).

#### **Eventi legati al post-parto.**

Il post-parto è accompagnato spesso da vari eventi: un'elevata frequenza di patologie in avvio di lattazione; un marcato e talora prolungato incremento delle proteine positive di fase acuta (es.

aptoglobina e ceruloplasmina; APPs positive); un calo e/o un lento recupero dei livelli delle proteine negative di fase acuta (es. Retinol Binding Protein, lipoproteine, albumine; APPs negative), ma anche una riduzione di sintesi degli enzimi necessari all'eliminazione della bilirubina che quindi si innalza, unitamente a stress ossidativo (aumento dei ROMt) ed infine a bilancio energetico negativo (maggior calo di BCS, riduzione o minore ingestione di sostanza secca, sino ad una minore efficienza nell'uso dell'energia della dieta) (Trevisi e coll., 2007). In questo studio, tali variazioni sono risultate più marcate nelle bovine con alti livelli di IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  nel periparto e questo suggerisce che tali animali (UP-IL6) – che si è detto non mostrare variazioni significative delle APPs positive rispetto a LO-IL6, - potrebbero essere più suscettibili al fenomeno infiammatorio che si verifica dopo il parto. A conferma di ciò, questo gruppo si caratterizza anche per la maggiore lipomobilizzazione (calo di BCS più marcato dopo il parto, anche se non sono state osservate differenze significative per NEFA e corpi chetonici); minore ingestione di sostanza secca e di produzione latte. Tuttavia, va anche ricordato che non tutte le APPs negative hanno mostrato un coerente minor livello in tale gruppo (ad esempio il colesterolo ed il retinolo sono risultati rispettivamente più elevati o analoghi al gruppo LO-IL6). Da notare inoltre che nel gruppo LO-IL6 al parto si ha unicamente innalzamento del TNF- $\alpha$  e nonostante ciò gran parte delle proteine (positive e negative) di fase acuta si comportano come nel gruppo UP-IL6. Questi eventi post-parto non concordano affatto con altre prove condotte in questo Istituto, in cui gli animali sono stati suddivisi in base all'impiego dell'indice LFI (Bertoni e coll., 2006), con lo scopo di valutare le conseguenze di un fatto infiammatorio al momento del parto o in prossimità di esso. Da esse è infatti emerso che il gruppo avente valori bassi di LFI mostrava una elevata frequenza di sintomi clinici; bassa produzione latte e ridotta fertilità, ma soprattutto un picco più alto di aptoglobina al momento del parto, un bilancio energetico negativo più severo confermato da un calo accentuato di BCS e calo di ingestione di sostanza secca. In aggiunta, O' Boyle e coll., (2006), nei loro studi, hanno osservato che i livelli di TNF- $\alpha$ , sono più alti in soggetti con BCS alto ( $\geq 3.5$ ) ed in uno stato di maggior NEB rispetto ai soggetti con un BCS normale (2.5-2.7) e che non sono in uno stato di bilancio energetico negativo. Anche questi dati non concordano con il nostro studio, ma ciò probabilmente a causa del fatto che le bovine dei due gruppi avevano un BCS normale e simile nonostante livelli diversi delle citochine pro-infiammatorie. Semmai dopo il parto vi è stato un calo più intenso del BCS – nonostante la minore produzione – nel gruppo UP-IL6 a confermare, verosimilmente, i già menzionati più intensi processi infiammatori che peraltro si riscontrano in termini di aptoglobina e ceruloplasmina solo dopo 10 giorni dal parto.

### **3.6 Conclusioni**

La valutazione dei risultati di questa prova conferma che il periodo di transizione è accompagnato da eventi infiammatori più o meno severi che possono influenzare negativamente il metabolismo, la salute e l'attività produttiva e riproduttiva della bovina da latte. Indipendentemente dalla causa della comparsa di queste infiammazioni, il livello ematico delle citochine pro-infiammatorie nel periparto è risultato essere importante, ma in certo modo contraddittorio fra le tre determinate. E' quindi verosimile che altri fattori siano in grado di condizionare la APR a livello del fegato, ma nulla di preciso è possibile aggiungere sulla scorta dei nostri risultati.

## CAPITOLO 4

# ANDAMENTO DI ALCUNI MARCATORI DEI PROCESSI DI RISOLUZIONE DELL'INFIAMMAZIONE NEL PERIPARTO E INDIVIDUAZIONE DI UN INDICE PER VALUTARE LA GRAVITÀ DELLE CONSEGUENZE DEL FATTO INFIAMMATORIO

## INTRODUZIONE

Il periparto è uno dei periodi più importanti e critici della bovina da latte, in quanto, è frequente il manifestarsi di una risposta di tipo infiammatorio indotta da differenti tipi di cause (es. malattie infettive e metaboliche, trauma, endotossine, ustioni, alcune sostanze tossiche ecc.) e di stress (es. ossidazione, intenso esercizio fisico, caldo ecc.) (Trevisi e coll., 2011).

La presenza di una risposta infiammatoria è testimoniata dalle variazioni nelle concentrazioni plasmatiche delle principali proteine di risposta di fase acuta. Sulla base di tali parametri ematici di infiammazione, sono stati calcolati indici composti per valutare le conseguenze della risposta infiammatoria durante il periodo di transizione ed i cambiamenti sulla sintesi dell'attività epatica causati da eventi infiammatori che si originano intorno al parto. Tuttavia, il processo infiammatorio suscita una catena di eventi ed induce la produzione di vari mediatori chimici, tra cui quelli lipidici (es: prostaglandine E2 e D2, leucotrieni, trombossano, fattore di attivazione delle piastrine, etc.), la cui sintesi è in parte correlata alla presenza di precursori degli acidi grassi polinsaturi (PUFAs), importanti componenti delle membrane cellulari (Caramia e coll., 2007).

Durante i processi di flogosi, dagli acidi grassi essenziali  $\omega 6$  (Acido Arachidonico; AA) ed  $\omega 3$  (EPA e DHA), per azione degli enzimi COX e LOX, si formano anche mediatori lipidici endogeni con azione anti-infiammatoria chiamati *lipossine*, *resolvine*, *protectine* e/o *neuroprotectine* (quando sono generate nei tessuti neurali). In particolare, le lipossine (LXA4 e LXB4), derivano dall'AA e sono prodotte in risposta ad un stimolo infiammatorio ed agiscono come 'segnali stop', promuovendone la risoluzione e bloccando l'ingresso dei leucociti polimorfonucleati (PMN) nei siti infiammatori (Serhan 2005; Calder 2006). La loro determinazione nella bovina da latte in fase di transizione potrebbe aiutarci a comprendere meglio l'attivazione dei meccanismi di risoluzione che avvengono in seguito ad un evento infiammatorio, o ad un insieme di eventi infiammatori come quelli che verosimilmente si verificano al periparto.

## 4.1 Scopo della prova

La presente ricerca è stata finalizzata a due principali obiettivi:

- Verificare il livello di lipossine, mediatori lipidici, implicati nella risoluzione del fatto infiammatorio stesso in bovine da latte caratterizzate dalla presenza di fatti infiammatori più o meno severi nel periparto;
- Individuazione di un nuovo indice della risposta sulla presenza di un fatto infiammatorio nel periparto, utilizzando alcuni parametri ematici di fase acuta, al fine di individuare tempestivamente in un allevamento quelle bovine maggiormente suscettibili ai processi infiammatori.

## 4.2 Materiali e Metodi

La prova è stata effettuata presso la stalla sperimentale dell'Istituto di Zootecnica dell'Università Cattolica di Piacenza, in una struttura a stabulazione fissa con tappeti in gomma morbida e dotata di controllo ambientale automatizzato (temperatura 18-22 °C e umidità relativa 60-70%) ed illuminazione artificiale (15 ore di luce e 9 di buio). Gli animali sono stati alimentati individualmente con due pasti giornalieri di foraggi (insilato di mais, medica disidratata e fieno di graminacee) somministrati ad un intervallo di 12 ore (8.00-20.00). In aggiunta, le bovine hanno ricevuto più pasti di concentrato distribuito con auto-alimentatore computerizzato: le bovine in asciutta ne ricevevano due pasti uguali ad intervalli di 12 ore (10.30 e 22.30); dopo il parto, la quantità di concentrato è stata gradualmente aumentata ed il numero dei pasti aumentati ad 8 nelle 24 ore. In particolare alle bovine in lattazione il concentrato è stato distribuito ad intervalli di 3 ore, a partire da 30 minuti prima del pasto di foraggi.

Nel complesso sono state seguite 36 bovine da latte pluripare, di razza Frisona Italiana, nel loro mese terminale di gravidanza e nel primo mese di lattazione. Sulle bovine sono stati eseguiti controlli individuali giornalieri che hanno riguardato: lo stato di salute, con registrazione giornaliera di tutti i problemi sanitari riscontrati e le terapie adottate, l'ingestione di alimenti (calcolata come somma degli alimenti somministrati nel corso della giornata, corretta per gli eventuali residui rilevati dopo 24 ore), la produzione di latte (considerata come la somma delle due mungiture precedenti al prelievo ematico) e la temperatura rettale. Campioni di latte sono stati invece raccolti tre volte a settimana prelevando campioni rappresentativi dalla mungitura del mattino (lunedì e giovedì) e del pomeriggio (domenica). Campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena giugulare,

prima del pasto del mattino, due volte a settimana dalla messa in asciutta fino al 28° giorno di lattazione. In aggiunta, prelievi ematici sono stati eseguiti giornalmente nei 10 giorni circa precedenti e successivi al parto. Tutti i prelievi ematici sono stati eseguiti con tecnica Vacutainer, usando provette contenenti litio eparina come anticoagulante, collocate immediatamente in bagno con acqua e ghiaccio fino all'arrivo in laboratorio. Infine, il peso vivo, mediante pesata, e lo stato di ingrassamento (BCS) sono stati rilevati il giorno seguente il parto ed ogni 2 settimane, durante tutto il periodo della prova sperimentale.

#### **4.2.1 Analisi ematiche**

Entro un'ora dal prelievo, una piccola aliquota è stata usata per determinare l'ematocrito, impiegando il microematocritometro su di un'aliquota di sangue intero centrifugata a 12.000 RCF per 10 minuti (centrifuga modello 4203 ALC International Srl, Milano). La restante quota di sangue intero è stata centrifugata a 3500 RCF per 16 minuti alla temperatura di circa 4°C (centrifuga modello 48 R Rotina Hettich, Germania) ed il plasma ottenuto è stato diviso in 5 aliquote, congelato a -20 °C fino al momento delle analisi. Le determinazioni analitiche sono state eseguite presso l'Istituto di Zootecnica dell'Università Cattolica di Piacenza. La maggior parte di esse è stata effettuata con un analizzatore automatizzato (ILAB 600, Instrumentation Laboratory, Lexington, MA) a temperatura costante di 37°C, utilizzando kit commerciali. In particolare sono stati valutati i seguenti indicatori:

- del metabolismo energetico: glucosio (kit IL; mmol/l);
- del metabolismo proteico (kit IL): urea (mmol/l);
- dello stato infiammatorio (kit IL): proteine positive di fase acuta: aptoglobina (g/l) e ceruloplasmina ( $\mu\text{mol/l}$ ), proteine negative di fase acuta e dei loro indici: albumine (g/l) e colesterolo (mmol/l), bilirubina ( $\mu\text{mol/l}$ );
- minerali: magnesio (kit IL; mmol/l), zinco (kit WAKO;  $\mu\text{mol/l}$ ), calcio (Kit IL, mmol/l);
- lipossina (LXA4; ng/ml): è un prodotto di interazione lipossigenase derivato dall'acido arachidonico. Per l'analisi quantitativa dei livelli di LXA4 nel plasma è stata utilizzata una metodica ELISA impiegando il kit EIA (EA45, Oxford Biomedical Research).

### 4.3 Stima dell'indice dei processi infiammatori e delle conseguenze epatiche (PICE).

Sulla base degli indicatori ematici di infiammazione determinati è stato calcolato l'indice dei processi infiammatori e delle conseguenze a livello epatico (PICE), che ha incluso una proteina di fase acuta positiva (APPs positive) e due indicatori delle proteine negative di fase acuta, che danno indicazioni sulla funzionalità epatica. Tra le APPs positive è stata considerata l'aptoglobina, la cui concentrazione plasmatica aumenta subito dopo il parto raggiungendo il picco massimo entro i primi 10 giorni di lattazione. Tra le APPs negative sono stati considerati gli indicatori: bilirubina e colesterolo. La bilirubina è il prodotto del catabolismo dell'emoglobina e la sua concentrazione plasmatica aumenta dopo il parto ed in caso di problemi infiammatori a causa della riduzione di sintesi degli enzimi preposti alla sua eliminazione. Il colesterolo rappresenta invece un indice della sintesi delle lipoproteine. La sua concentrazione plasmatica usualmente si riduce nel periparto ed aumenta con l'avvio della lattazione.

Il valore dell'indice PICE è stato ottenuto dalla somma algebrica di tre indici parziali calcolati nel seguente modo per ogni singolo animale:

- Sottoidice aptoglobina: è stato scelto il valore massimo di tale parametro raggiunto nei primi 10 giorni di lattazione. Il punteggio ad esso attribuito è stato stabilito all'interno di una scala su base 10, in cui il punteggio 0 corrisponde alla situazione di marcata infiammazione (aptoglobina  $\geq 1,5$  g/l; Bertoni e Piccioli 2000), mentre il punteggio 10 corrisponde all'assenza di infiammazione (aptoglobina  $\leq 0,01$  g/l). Sulla base dei valori estremi è stata calcolata la seguente equazione:

$$y = -6,71141 x + 10,06711$$

dove:

x rappresenta il valore massimo di aptoglobina (g/l) osservato tra 0 e 10 giorni di lattazione ed y rappresenta il valore dell'indice parziale dell'aptoglobina compreso tra 0 e 10.

- Sottoidice bilirubina: è stato scelto il valore massimo di tale parametro raggiunto nei primi 10 giorni dopo il parto. Il punteggio ad esso attribuito è stato stabilito all'interno di una scala su base 10 in cui il punteggio 0 corrisponde alla situazione di marcata infiammazione a cui consegue la riduzione della sintesi epatica degli enzimi necessari alla eliminazione (clearance) della bilirubina dal sangue ( $\geq 25$  mcmol/l; Bertoni e coll., 2008), mentre il punteggio 10 corrisponde all'assenza di infiammazione ( $\leq 0,5$  mcmol/l). Sulla base dei parametri è stata calcolata la seguente equazione:

$$y = -0,40816x + 10,20408$$



dove:

x rappresenta il valore massimo di bilirubina (g/l) osservato tra 0 e 10 giorni di lattazione ed y rappresenta il valore dell'indice parziale della bilirubina compreso tra 0 e 10.

- Sottoindice colesterolo: è stato scelto il valore massimo di tale parametro raggiunto al ventottesimo giorno di lattazione. Il punteggio ad esso attribuito è stato stabilito all'interno di una scala su base 10, dove il punteggio 0 corrisponde alla situazione di marcata infiammazione ( $\leq 2$  mmol/l; Bossaert e coll., 2011), mentre il punteggio 10 corrisponde all'assenza di infiammazione ( $\geq 7$  mmol/l). Con tali parametri è stata calcolata la seguente equazione:

$$y = 2,0 x - 4,0$$

dove:

x rappresenta il valore di colesterolo (mmol/l) osservato al ventottesimo giorno di lattazione ed y rappresenta il valore dell'indice parziale del colesterolo compreso tra 0 e 10.

In base a questa modalità di calcolo, i valori elevati di tale indice rappresentano una bassa sollecitazione infiammatoria e/o una buona risposta dell'animale all'evento infiammatorio, mentre i valori bassi indicano grave insulto infiammatorio e/o una ridotta risposta dell'animale a tale insulto. Le 36 bovine di questa ricerca sono state suddivise in terzili in base al valore dell'indice (LO-PICE, IN-PICE, UP-PICE) e sono pertanto risultati composti da 12 soggetti ciascuno.

Successivamente sono state scelte 6 bovine appartenenti a ciascuno dei due terzili estremi sulle quali si è proceduto alla determinazione della lipossina A4 (LXA4). Nei gruppi LO-PICE (terzile peggiore) ed UP-PICE (terzile migliore) la LXA4 è stata analizzata a -3 giorni prima e a 4, 8 giorni dopo il parto

Le metodiche utilizzate sono spiegate dettagliatamente in Appendice.

#### 4.4 Analisi statistica

Per l'elaborazione statistica dei risultati è stata applicata l'analisi della varianza per osservazioni ripetute con procedura MIXED del SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC, release 9.2). Prima dell'analisi si è proceduto alla verifica della normalità della distribuzione di ciascun parametro, mediante calcolo di Skewness e Curtosi e, quando necessario, alla normalizzazione dei dati mediante trasformazione logaritmica. Il modello statistico ha incluso i fattori di classificazione fissi (distanza dal parto e gruppo PICE), il fattore casuale individuale (bovina entro gruppo) e l'interazione gruppo x distanza parto. In particolare il modello statistico utilizzato è risultato il seguente:

$$Y_{iklm} = \mu + G_i + T_k + (G*T)_{ik} + B_l(i) + e_{iklm}$$

dove:

$Y_{iklm}$  = osservazione m-esima della 1-esima bovina B1 entro l'i-esimo gruppo G1 alla K-esima distanza parto Tk:

$\mu$  = media totale;

$G_i$  = effetto dell'i-esimo gruppo (i = UP-, IN- e LO-PICE);

$T_k$  = effetto della K-esima distanza dal parto, con un aumento di livelli variabile in funzione di parametri: 27 per i parametri ematici (-28, -21, -14, -10, -9, -8, -7, -6, -5, -4, -3, -2, -1, 0, 1, 2,3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 21, 28); 26 per la temperatura rettale e il DMI (-28, -21, -14, -10, -9, -8, -7, -6, -5, -4, -3, -2, -1, 1, 2,3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 21, 28); 14 per la produzione di latte (0, 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 14, 21, 28) e 7 per il BCS (-28, -14, -7, 1, 7, 14, 28);

$(G*T)_{ik}$  = effetto dell'interazione tra l'i-esimo gruppo e la k-esima distanza dal trattamento;

$B_l(i)$  = effetto dell' i-esima bovina, entro l'i-esimo gruppo;

$E_{iklm}$  = effetto casuale o errore.

L'analisi è stata effettuata utilizzando tre tipi di struttura di covarianza (Autoregressive Order, Compound Symmetry e Spatial Power) scelti per ogni tipo di parametro in base al loro criterio di informazione di Akaike (Littell e coll., 1998). Le differenze sono state considerate significative per  $P < 0.05$ , mentre le tendenze sono state dichiarate per  $P < 0.10$ . E' stata valutata la differenza statistica tra i gruppi (LO-PICE, IN-PICE e UP-PICE) per ogni livello di distanza dal parto.

## 4.5 Risultati

### Problemi di salute

Nel complesso sono state controllate 36 bovine nel corso del loro periparto, che sono state divise in terzi secondo l'indice PICE: LO, IN e UP-PICE.

Di seguito verranno valutate le differenze tra questi tre gruppi, in particolare ci si soffermerà tra quelle dei 2 terzi estremi (LO-PICE e UP-PICE) che rappresentano i soggetti con le più gravi e le più modeste conseguenze ai processi infiammatori verificatesi nel periparto, basandosi sul valore dell'indice PICE.

Nella fase di asciutta sono stati riscontrati nei tre gruppi alcuni problemi quasi tutti di lieve entità:

- UP-PICE si sono verificati 2 casi di gonfiore (uno alla mascella e l'altro al garrese);
- IN-PICE si è verificato solo uno (gonfiore al garretto);
- LO-PICE sono stati riscontrati 4 problemi (ferita, gonfiore garretto, diarrea e mastite)

Nella fase di lattazione i problemi riscontrati sono stati:

- Nel gruppo LO-PICE: diarrea (almeno 2 giorni consecutivi, 70% delle bovine), mastite (60%) chetosi (50%), ritenzione placenta (33%), zoppie e gonfiori agli arti (42%) collasso puerperale (17%);
- Nel gruppo IN-PICE: diarrea (40%), mastite (10), chetosi (10%), ritenzione placenta (30%), zoppie e gonfiori agli arti (30%), dislocazione abomaso (10%);
- Nel gruppo UP-PICE: diarrea (30%), chetosi (25%), zoppie e gonfiori agli arti (17%), collasso puerperale (8%).

In tabella 4.1 è riportata l'incidenza complessiva (%) delle patologie osservata nei tre gruppi (LO-, IN- e UP-PICE). Differenze statisticamente significative sono state osservate tra il gruppo LO-PICE rispetto ad IN- ed ad UP-PICE ( $P < 0.001$ ).

Tab. 4.1. Incidenza (% bovine) delle patologie osservate nei 3 gruppi di PICE (Processi Infiammatori e delle Conseguenze Epatiche) nel primo mese di lattazione. Gli asterischi indicano la significatività statistica dell'incidenza complessiva delle patologie osservata nel gruppo LO-PICE vs IN- e UP-PICE (+P<0.1, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).

Gruppo	Parto Distocico	Collasso Puerperale	Ritenzione Placentare	Dislocazione Abomaso	Mastite	Chetosi	Diarrea <sup>a</sup>	Gonfiore arti e Zoppie	Incidenza complessiva
LO-PICE	8.3	16.6	33.3	0	7	50	66.7	41.7	57
IN-PICE	0	0	30	10	10	10	33,3	20	113.3***
UP-PICE	0	8.3	0	0	0	25	25	16.6	66.6***

Con riguardo all'analisi statistica, nella tabella 4.2 è riportato per i 3 gruppi in cui sono state suddivise le bovine, secondo l'indice PICE, il valore medio dell'intero periodo controllato e la significatività dei fattori principali inseriti nel modello statistico. Da questa si evince che tutti i parametri hanno presentato una elevata significatività del fattore tempo (DIM). Il fattore PICE è risultato significativo, oltre ai parametri utilizzati per il suo calcolo (bilirubina e aptoglobina), anche per: ingestione di sostanza secca, produzione di latte, temperatura rettale, ematocrito, urea, magnesio, ceruloplasmina ed albumina. Il colesterolo, pur essendo stato utilizzato nel calcolo dell'indice, è risultato nel complesso del periodo solo tendenzialmente significativo ( $P < 0.10$ ), come pure la variazione massima del BCS ( $\Delta\text{BCS-28}$ ) e lo zinco. Invece, l'interazione tempo x PICE è risultata statisticamente significativa per colesterolo e aptoglobina e solo tendenzialmente per la bilirubina. Inoltre, tale interazione è risultata significativa anche per il BCS e la sua variazione massima ( $\Delta\text{BCS-28}$ ).

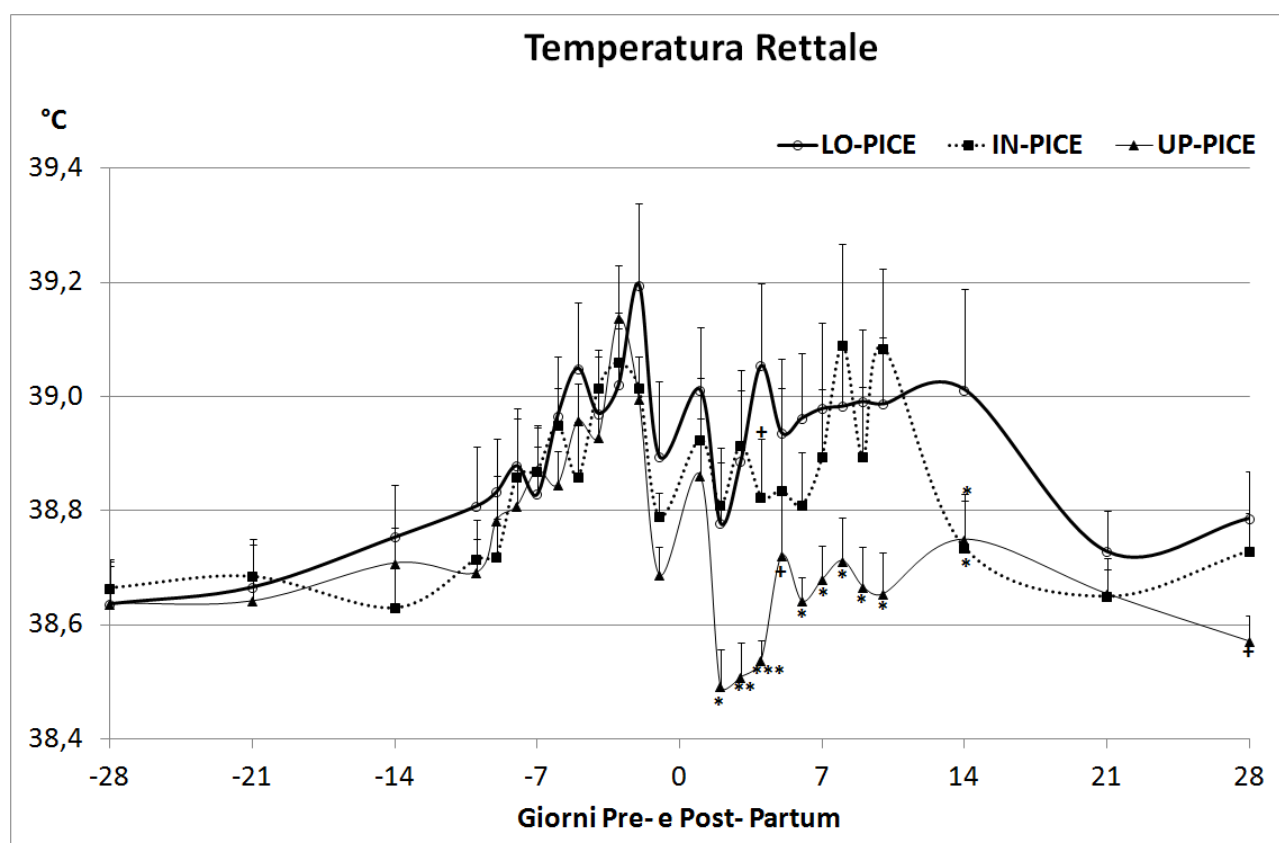
Tab. 4.2 - Comportamento medio delle concentrazioni dei parametri valutati nel periodo di transizione in bovine suddivise in base all'indice PICE calcolato nei primi 10 giorni di lattazione: LO-PICE, IN-PICE e UP-PICE (+ P<0.1, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).

Parametri	LO-PICE (n=12)	IN-PICE (n=12)	UP-PICE (n=12)	P modulo	P PICE	P DIM	P DIM*PICE	
DMI	kg/d	11,53	12,42	14,23	***	***	***	NS
BCS		2,46	2,41	2,31	***	NS	***	**
ΔBCS-28		-0,20	-0,12	-0,11	***	+	***	***
Produzione Lattea	kg/d	28,96	26,54	32,00	***	*	***	NS
Temperatura Rettale	°C	8,85	8,91	8,74	***	*	***	+
Ematocrito (PCV)	l/l	0,32	0,32	0,31	***	**	***	NS
Aptoglobina	g/l	0,44	0,32	0,21	***	***	***	***
Ceruloplasmina	μmol/l	3,36	3,13	2,68	***	**	***	NS
Albumine	g/l	4,43	5,35	5,86	***	**	***	NS
Colesterolo	mmol/l	2,04	2,42	2,47	***	+	***	**
Bilirubina	μmol/l	4,72	3,91	2,91	***	***	***	+
Urea	mmol/l	4,16	3,68	3,71	***	**	***	NS
Glucosio	mmol/l	4,01	3,98	3,98	***	NS	***	NS
Calcio	mmol/l	2,55	2,54	2,53	***	NS	***	NS
Magnesio	mmol/l	1,03	1,00	1,04	***	***	***	NS
Zinco	μmol/l	0,52	1,41	1,79	***	+	***	NS

## Temperatura corporea

La temperatura corporea (Fig. 4.1), è stata rilevata ogni mattina, ha mostrato un andamento simile tra i tre gruppi sino al parto, praticamente costante sino a 2 settimane prima del parto (circa 38.7 °C) a cui è seguito un incremento, caratterizzato da un picco (NS) a -3 giorni dal parto (39.1). Immediatamente prima del parto vi è stato un calo di temperatura evidente in tutti e tre i gruppi, ma più marcato in UP-PICE.

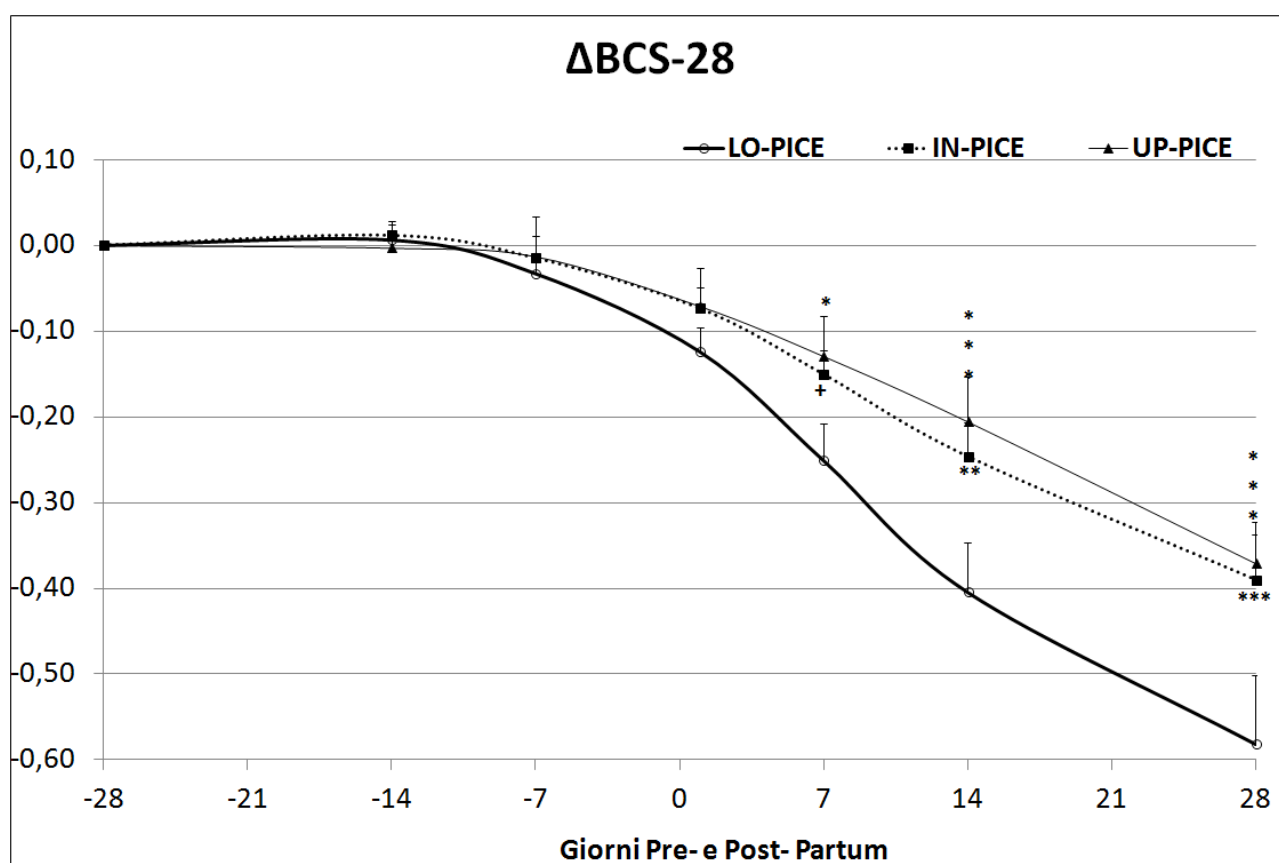
Dopo il parto la temperatura è risultata più bassa nel gruppo UP-PICE rispetto ai gruppi IN-PICE e LO-PICE. Le differenze tra i gruppi UP- e IN-PICE sono risultate statisticamente significative da 2 a 4 giorni dopo il parto ( $P < 0.05$ ), a 8 e 10 giorni dopo il parto ( $P < 0.01$ ). Le differenze tra UP- e LO-PICE sono invece risultate statisticamente significative da 2 a 4 giorni dopo il parto ( $P < 0.001$ ) e da 6 sino al 14° giorno di lattazione ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 4.1 – Andamento della temperatura rettale in bovine da latte di razza Frisona, suddivise in terzi in base al valore dell'indice PICE e monitorate giornalmente da -28 giorni prima a 28 giorni dopo il parto. La significatività statistica tra il gruppo LO-PICE e gli altri due (IN-PICE e UP-PICE) ad un determinato livello temporale è indicata con un simbolo accanto al valore medio di questi gruppi: + $P < 0.10$ ; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .**

## Body Condition Score

Il calo del BCS (Fig. 4.2) nell'ultimo mese di gravidanza è risultato più elevato in LO- (-0.12 punti) rispetto a UP-PICE (-0.07 punti). Anche dopo il parto, il calo nel gruppo LO-PICE è stato più pronunciato di quello degli altri due gruppi (-0.58 punti vs -0.37 di UP-PICE e -0.39 di IN-PICE). Differenze significative sono state riscontrate tra LO-PICE vs UP-PICE da 7 a 28 giorni di lattazione ( $P < 0.001$ ) e tra LO-PICE vs IN-PICE tra 14 e 28 giorni di lattazione ( $P < 0.001$ ), mentre nessuna differenza significativa è stata riscontrata tra IN-PICE vs UP-PICE.



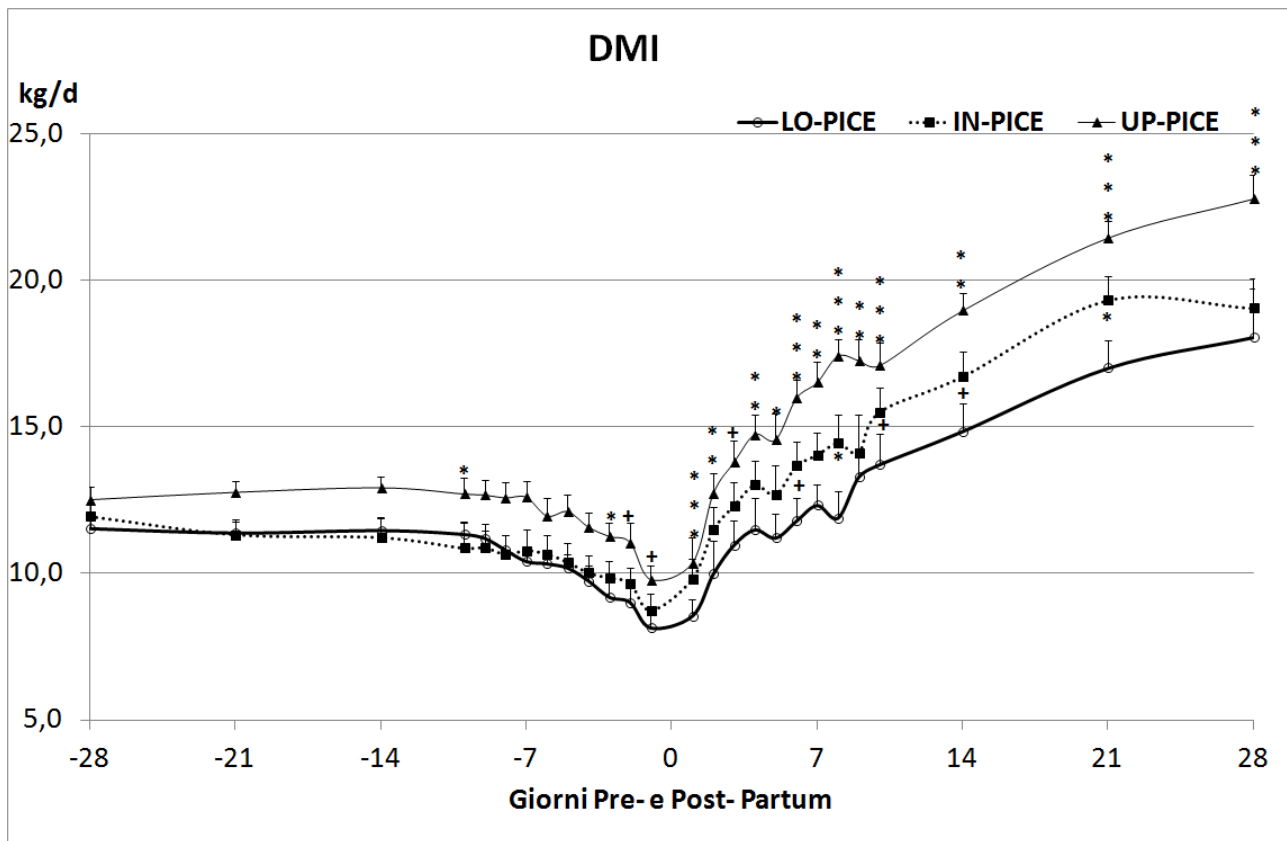
**Fig. 4.2 – Andamento del BCS ( $\Delta$ -28) in bovine da latte di razza Frisone, suddivise in terzi in base al valore dell'indice PICE e monitorate giornalmente da -28 giorni prima a 28 giorni dopo il parto. La significatività statistica tra il gruppo LO-PICE e gli altri due (IN-PICE e UP-PICE) ad un determinato livello temporale è indicata con un simbolo accanto al valore medio di questi gruppi: + $P < 0.10$ ; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .**

### **Ingestione di sostanza secca**

L'ingestione di sostanza secca (Fig. 4.3) ha mostrato il tipico andamento del periodo di transizione. Infatti è risultata essere costante in tutti e tre gruppi sino a 2 settimane circa dal parto, dopo di che ha mostrato una lieve flessione sino al parto dove ha raggiunto il minimo in tutti i gruppi. Tale flessione è stata più marcata da -4 a -3 giorni dal parto ed ha raggiunto il calo più marcato al 1° giorno pre-parto in tutti i gruppi. Successivamente al parto, si è osservato un rapido aumento a partire dal 2° e 3° giorno di lattazione in tutti i gruppi. La ripresa è risultata essere più lenta nel gruppo LO-PICE che ha mostrato livelli di ingestione inferiori nel 1° mese di lattazione, rispetto agli altri gruppi.

Differenze significative sono state riscontrate tra i gruppi LO- ed UP-PICE da 1 a 28 giorni dopo il parto ( $P < 0.001$ ), tra LO- ed IN-PICE a 8 ed a 21 ( $P < 0.05$ ) giorni dopo il parto e tra IN- ed UP-PICE da 5 a 9 ( $P < 0.01$ ) e da 14 a 28 ( $P < 0.001$ ) giorni dopo il parto.



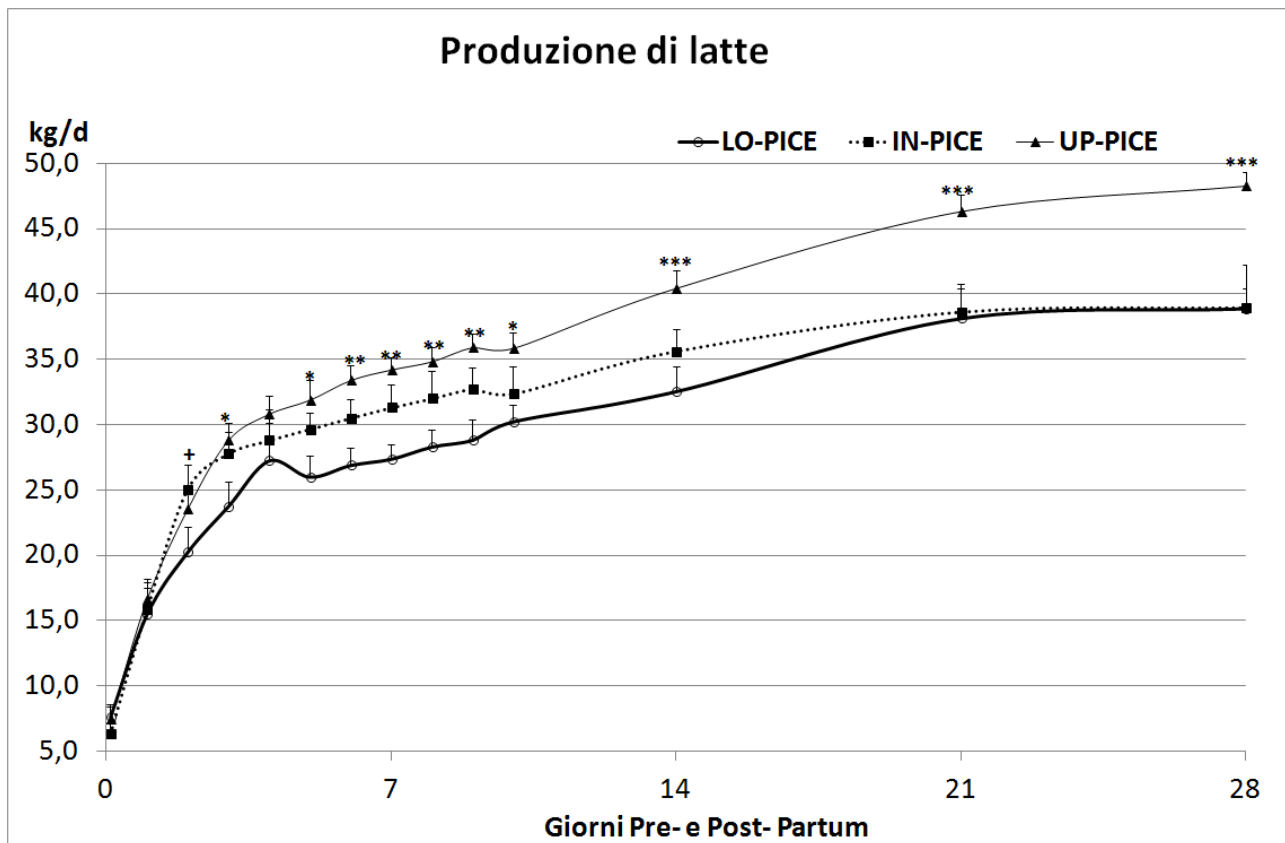


**Fig. 4.3 – Andamento del DMI in bovine da latte di razza Frisone, suddivise in terzi in base al valore dell'indice PICE e monitorate giornalmente da -28 giorni prima a 28 giorni dopo il parto. La significatività statistica tra il gruppo LO-PICE e gli altri due (IN-PICE e UP-PICE) ad un determinato livello temporale è indicata con un simbolo accanto al valore medio di questi gruppi: +P<0.10; \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.**

## **Produzione di latte**

La produzione di latte (Fig. 4.4) ha mostrato, come consueto, una rapida crescita iniziale in tutti i gruppi. Le differenze tra IN- e LO-PICE sono andate affievolendosi dopo il 14° giorno di lattazione. Differenze significative tra i gruppi IN-PICE ed UP-PICE si sono verificate a 21 ( $P<0.01$ ) ed a 28 ( $P<0.001$ ) giorni di lattazione, mentre tra i gruppi LO-PICE ed UP-PICE dal 5° ( $P<0.05$ ) al 28° ( $P<0.001$ ) giorno di lattazione, mentre tra i gruppi LO-PICE ed IN-PICE non è stata riscontrata alcuna differenza significativa.

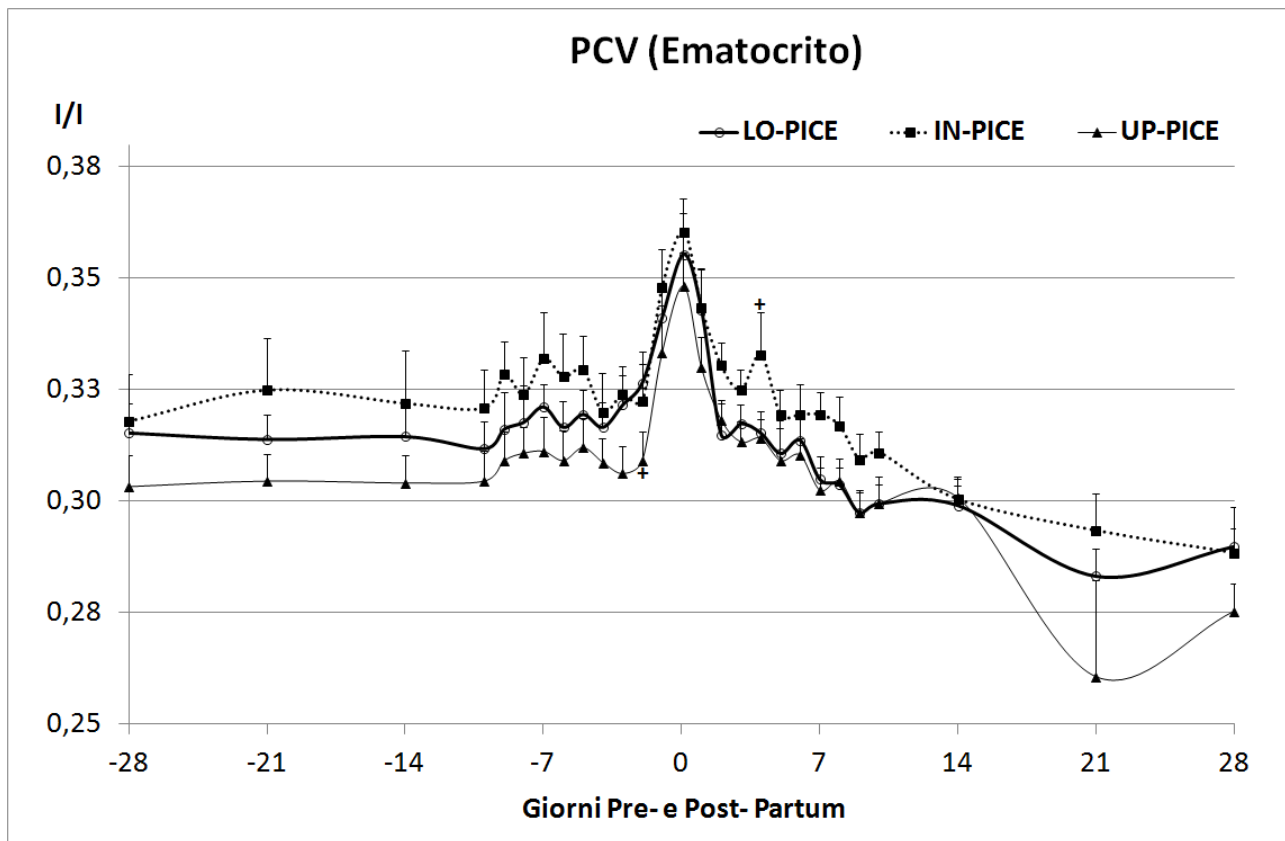
Si può comunque osservare che per tutti e tre i gruppi l'andamento produttivo è risultato soddisfacente per il 1° mese di lattazione, sfiorando circa 40 kg/capo/d nei gruppi LO-PICE ed IN-PICE e 50 kg/capo/d nel gruppo UP-PICE; a conferma che nonostante la presenza di vari problemi di salute durante il periodo controllato (come più sopra evidenziato) questi non hanno determinato né la riforma degli animali né gravi ripercussioni sulla produzione latte.



**Fig. 4.4 – Andamento della produzione lattea in bovine da latte di razza Frisona, suddivise in terzili in base al valore dell'indice PICE e monitorate giornalmente da -28 giorni prima a 28 giorni dopo il parto. La significatività statistica tra il gruppo LO-PICE e gli altri due (IN-PICE e UP-PICE) ad un determinato livello temporale è indicata con un simbolo accanto al valore medio di questi gruppi: +P<0.10; \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.**

## INDICI EMATICI

L'ematocrito (Fig.4.5) ha mostrato lo stesso andamento sino al parto in tutti e 3 i terzili, con valori leggermente più elevati in IN-PICE. Al momento del parto, si è verificato un modesto aumento, analogo in tutti i gruppi, come già descritto in precedenti studi effettuati presso l'Istituto (Cappa e coll., 1989). Dopo il parto si è verificato un calo che è risultato più prolungato nel gruppo UP-PICE. Il gruppo IN-PICE ha presentato sempre i livelli più elevati e le differenze con UP-PICE sono risultate statisticamente significative rispettivamente a -21 (P<0.05), -14 (P<0.05), -7 (P<0.05) giorni prima del parto e a 21(P<0.05) giorni dopo di esso.



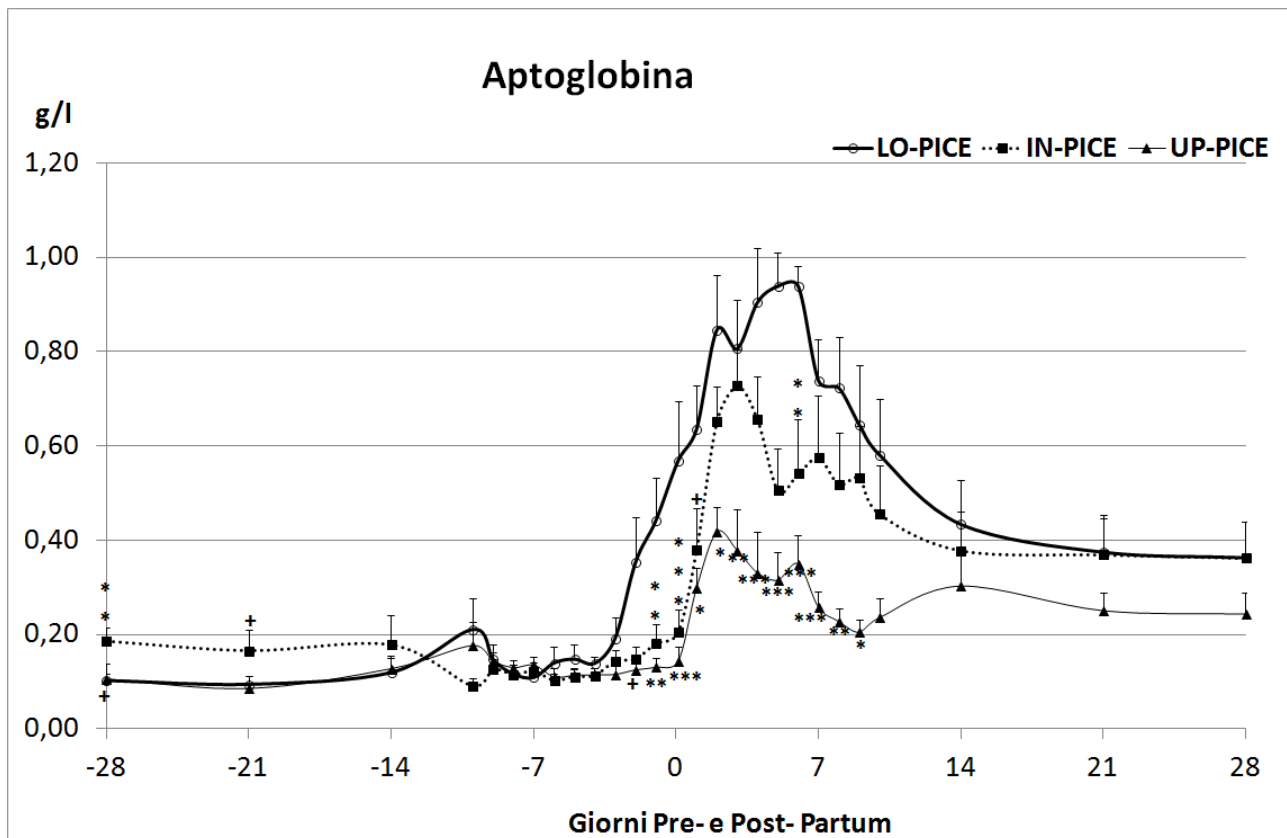
**Fig. 4.5 – Andamento delle concentrazioni plasmatiche medie di PCV in bovine da latte di razza Frisona, suddivise in terzi in base al valore dell'indice PICE e monitorate giornalmente da -28 giorni prima a 28 giorni dopo il parto. La significatività statistica tra il gruppo LO-PICE e gli altri due (IN-PICE e UP-PICE) ad un determinato livello temporale è indicata con un simbolo accanto al valore medio di questi gruppi: +P<0.10; \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.**

## **Parametri dello stato infiammatorio**

### Proteine positive della fase acuta.

Tra le proteine positive di fase acuta sono state considerate l'aptoglobina e la ceruloplasmina.

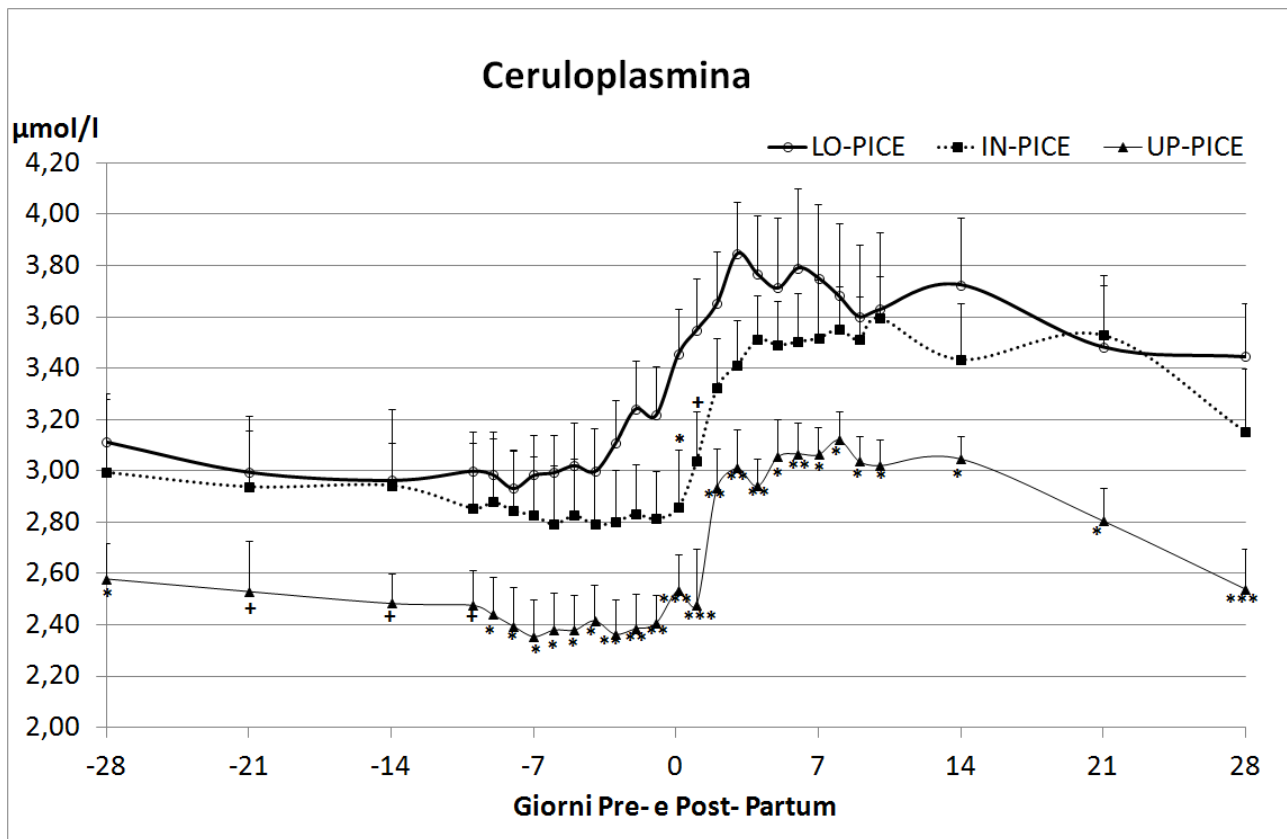
In fase di asciutta, l'aptoglobina (Fig. 4.6) ha mostrato lo stesso andamento nei tre gruppi, con valori generalmente bassi ed inferiori a 0.2 g/l, considerato il limite oltre il quale è in atto un processo infiammatorio (Bertoni e Piccioli, 2000). Con l'approssimarsi al parto, i livelli plasmatici di aptoglobina del gruppo LO-PICE sono risultati più elevati rispetto agli altri gruppi (IN- e UP-PICE), spesso anche in modo significativo rispetto al gruppo UP-PICE (da -1 a 9 giorni di lattazione;  $P < 0.001$ ). Dopo il parto, i valori plasmatici di aptoglobina si sono accresciuti anche nei gruppi IN-PICE ed UP-PICE, rispettivamente. L'aumento post-parto in UP-PICE è stato modesto ed i livelli sono risultati sempre più bassi rispetto agli altri due gruppi per l'intero mese di lattazione. Il gruppo LO-PICE ha mostrato invece i livelli plasmatici di aptoglobina più elevati, sia rispetto ai gruppi IN-PICE a -1 ( $P < 0.01$ ), 0 ( $P < 0.001$ ) ed a 6 ( $P < 0.01$ ) giorni dal parto e UP-PICE tra -1 e 9 giorni dal parto (spesso  $P < 0.001$ ). In tutti e 3 i gruppi si è osservato un calo non significativo dell'aptoglobina dal 21° giorno di lattazione. È interessante osservare che anche le differenze tra i gruppi IN-PICE ed UP-PICE sono risultate essere significative al 3° ( $P < 0.01$ ), al 4° ( $P < 0.001$ ), al 5° ( $P < 0.05$ ) ed al 9° giorno dal parto.



**Fig. 4.6 – Andamento delle concentrazioni plasmatiche medie di aptoglobina in bovine da latte di razza Frisona, suddivise in terzi in base al valore dell'indice PICE e monitorate giornalmente da -28 giorni prima a 28 giorni dopo il parto. La significatività statistica tra il gruppo LO-PICE e gli altri due (IN-PICE e UP-PICE) ad un determinato livello temporale è indicata con un simbolo accanto al valore medio di questi gruppi: + $P<0.10$ ; \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ .**

La ceruloplasmina (Fig. 4.7) ha presentato un andamento analogo in tutti e 3 i gruppi, tendenzialmente decrescente nell'ultimo mese di gravidanza sino al parto, rapido aumento dopo il parto e, quindi, calo più o meno pronunciato. Prima del parto tuttavia, i gruppi LO-PICE ed IN-PICE hanno mostrato valori più elevati di UP-PICE. Tra LO-PICE ed UP-PICE, tali valori sono risultati essere statisticamente significativi a -28 ( $P<0.05$ ) e da -9 a -1 ( $P<0.01$ ) giorni prima del parto. Dopo il parto, tale indice ha presentato un incremento in tutti e tre i gruppi, ma i valori sono risultati più elevati nel gruppo LO-PICE vs UP-PICE (spesso  $P<0.05$ ). Inoltre, il successivo calo di ceruloplasmina è risultato più marcato in UP-PICE rispetto ad LO-PICE a 14 e a 28 giorni di lattazione ( $P<0.001$ ) ed a IN-PICE a 10 e da 21 a 28 giorni di lattazione ( $P<0.05$ ). Pertanto il calo nel primo mese di lattazione nei gruppi IN e LO-PICE è risultato piuttosto modesto e in tali gruppi

la ceruloplasmina ha continuato a mantenere livelli analoghi tra di essi e piuttosto elevati (>3.4 mcml/l).

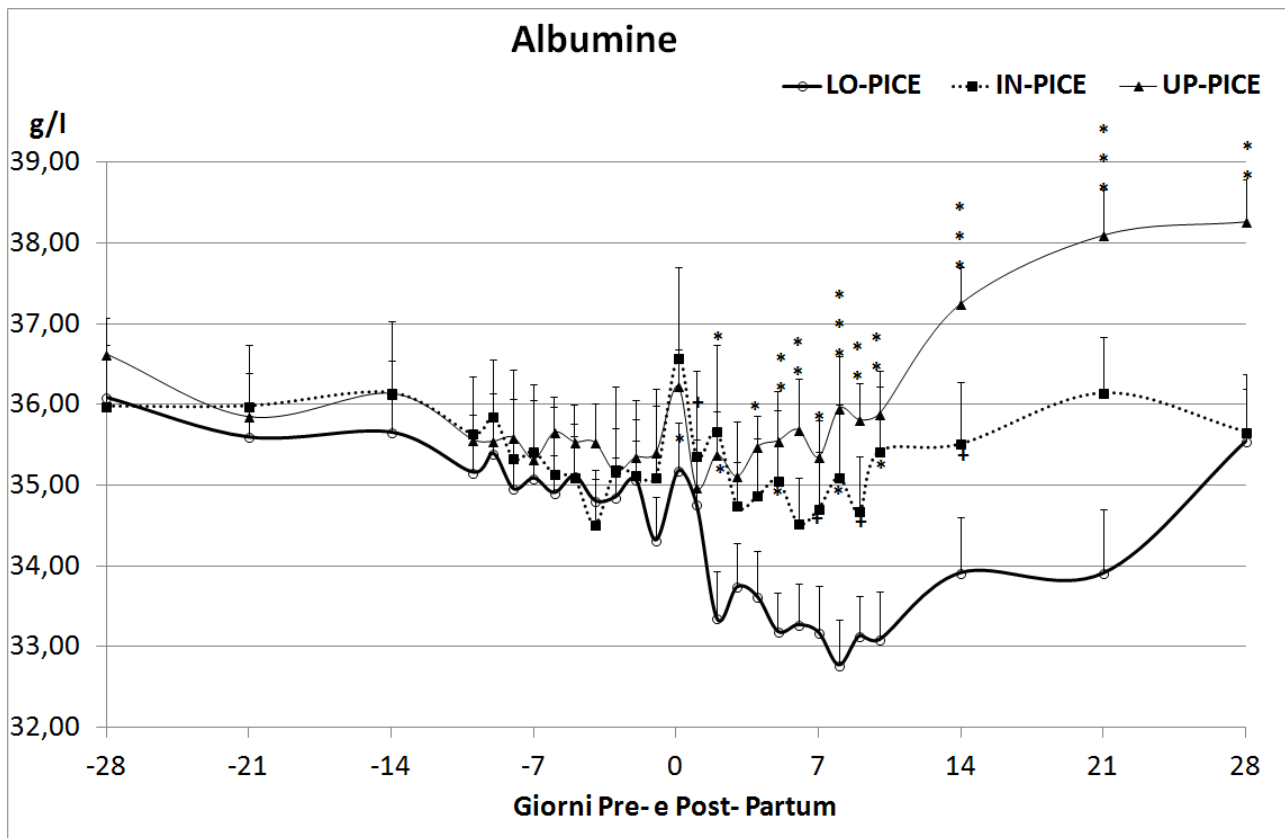


**Fig. 4.7 – Andamento delle concentrazioni plasmatiche medie di ceruloplasmina in bovine da latte di razza Frisona, suddivise in terzi in base al valore dell'indice PICE e monitorate giornalmente da -28 giorni prima a 28 giorni dopo il parto. La significatività statistica tra il gruppo LO-PICE e gli altri due (IN-PICE e UP-PICE) ad un determinato livello temporale è indicata con un simbolo accanto al valore medio di questi gruppi: +P<0.10; \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.**

### Proteine negative della fase acuta.

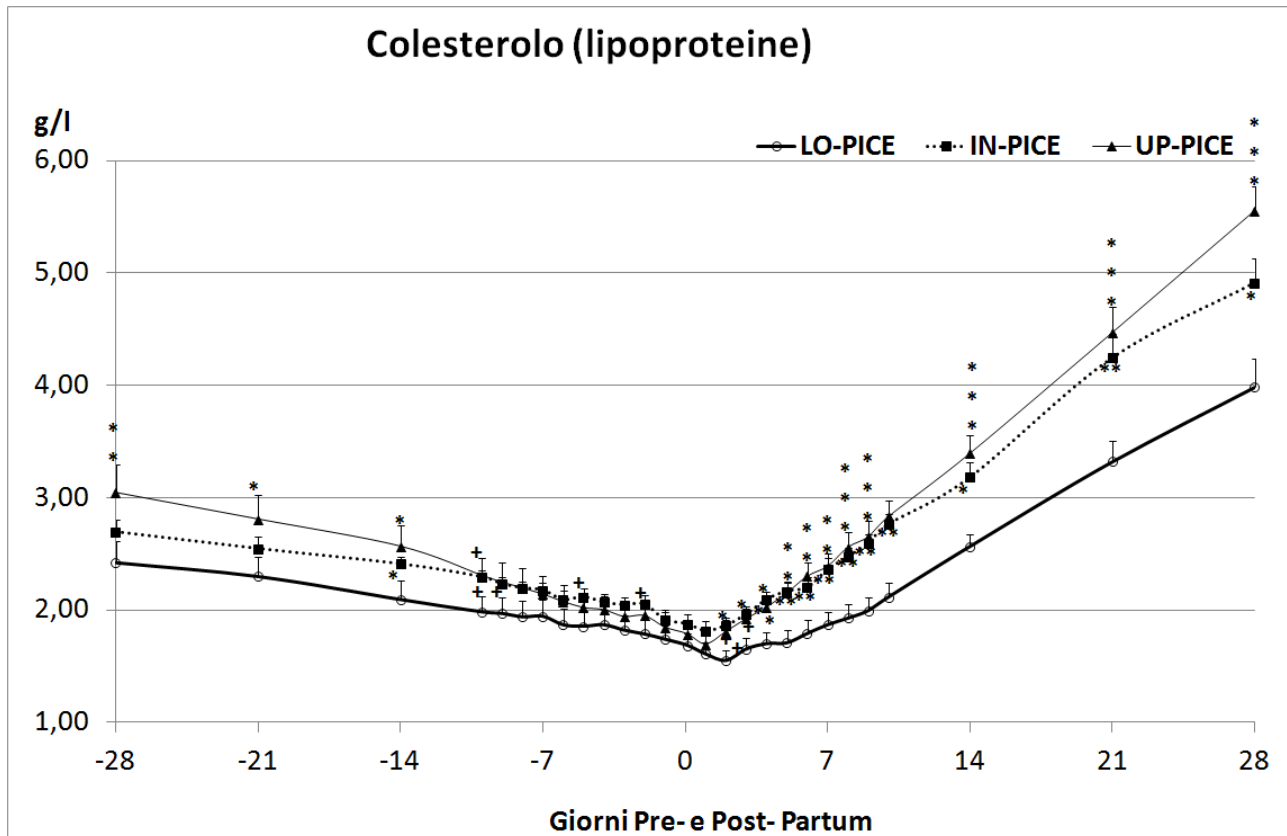
Le albumine (Fig. 4.8) hanno presentato un lieve calo nelle ultime due settimane di asciutta in tutti i gruppi, circoscritto a qualche giorno pre-parto ed a qualche giorno dopo il parto. Nel gruppo UP-PICE, tale flessione è modesta e limitata nel tempo ed i livelli plasmatici hanno raggiunto valori più alti di quelli osservati in asciutta dal 14° DIM. Nel gruppo LO-PICE, invece il calo è proseguito anche dopo il parto sino al 8°- 10° DIM, dal 14° DIM è iniziato un recupero proseguito sino al 28° DIM. Nel gruppo IN-PICE il calo post-parto è stato intermedio a LO- ed UP-PICE, ma il recupero successivo meno marcato di LO-PICE, tanto che al 28° DIM i livelli erano analoghi tra i due gruppi. Il gruppo UP-PICE ha mostrato livelli più elevati di LO-PICE 2 giorni dopo il parto ( $P<0.05$ ) e tra 4 e 28 DIM ( $P<0.01$ ), nonché di IN-PICE tra 10 e 28 DIM ( $P<0.01$ ), a notare che anche IN-PICE ha mostrato livelli più elevati di LO-PICE tra 2 e 21 DIM (spesso  $P<0.05$ ).





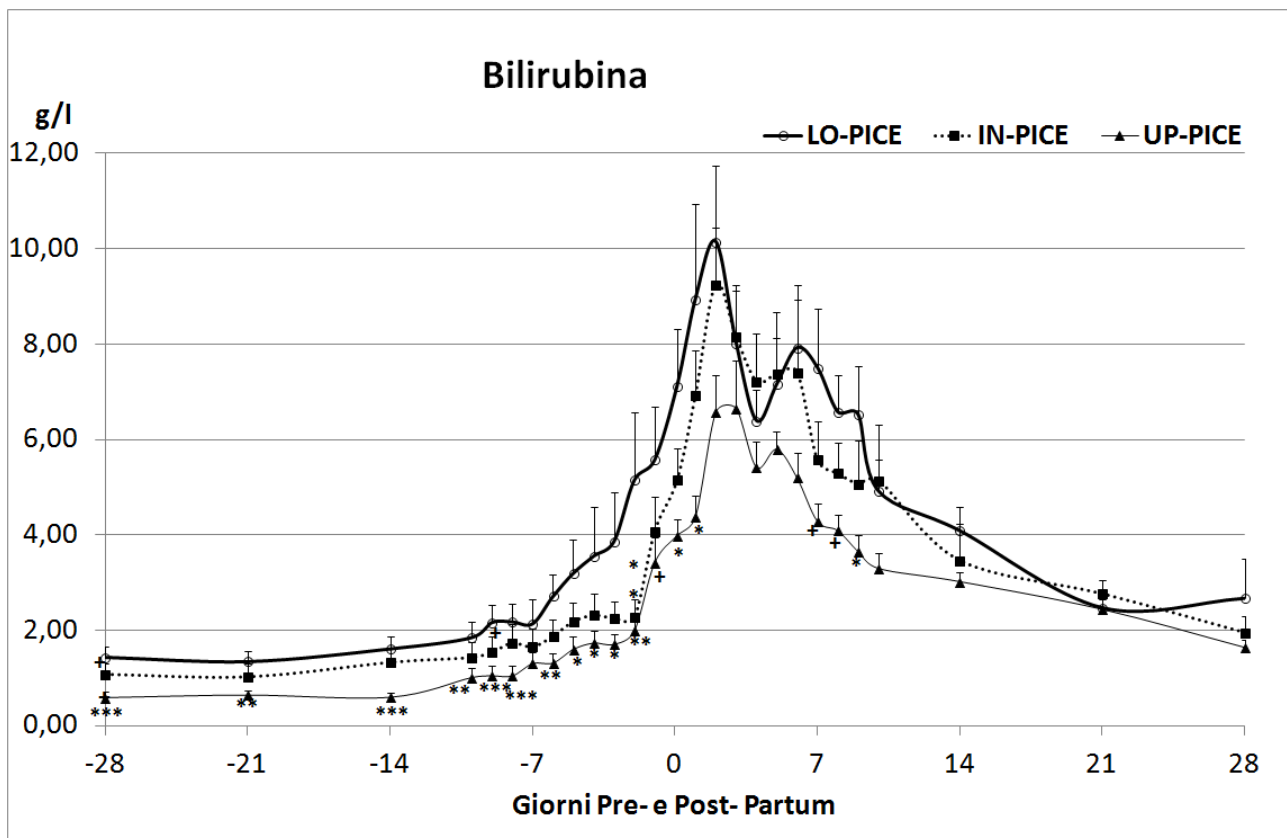
**Fig. 4.8 – Andamento delle concentrazioni plasmatiche medie di albumine in bovine da latte di razza Frisona, suddivise in terzi in base al valore dell'indice PICE e monitorate giornalmente da -28 giorni prima a 28 giorni dopo il parto. La significatività statistica tra il gruppo LO-PICE e gli altri due (IN-PICE e UP-PICE) ad un determinato livello temporale è indicata con un simbolo accanto al valore medio di questi gruppi: +P<0.10; \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.**

Il colesterolo (indice delle lipoproteine; Fig. 4.9) ha mostrato un andamento analogo in tutti e 3 i gruppi e tipico del periparto: lievemente decrescente nella fase di asciutta e nei primissimi giorni post-parto, marcato aumento successivamente, sino al 28° DIM. Nel gruppo LO-PICE, i livelli plasmatici di colesterolo sono risultati più bassi rispetto ai gruppi IN-PICE ( $P<0.01$ ) e UP-PICE ( $P<0.001$ ) per l'intero periodo controllato e quasi sempre in modo statisticamente significativo. Nessuna differenza significativa è stata riscontrata tra i gruppi IN- ed UP-PICE.



**Fig. 4.9 – Andamento delle concentrazioni plasmatiche medie di colesterolo (indice delle lipoproteine) in bovine da latte di razza Frisona, suddivise in terzi in base al valore dell'indice PICE e monitorate giornalmente da -28 giorni prima a 28 giorni dopo il parto. La significatività statistica tra il gruppo LO-PICE e gli altri due (IN-PICE e UP-PICE) ad un determinato livello temporale è indicata con un simbolo accanto al valore medio di questi gruppi: + $P<0.10$ ; \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ .**

La bilirubina (Fig. 4.10) rappresenta un indice della funzionalità epatica che aumenta quando, per effetto del fatto infiammatorio, si riduce la sintesi degli enzimi necessari alla sua eliminazione. Non sono state osservate fluttuazioni importanti a 7 giorni prima del parto in tutti i gruppi. Tuttavia, nel gruppo UP-PICE sono state riscontrate differenze statisticamente significative sia verso LO-PICE ( $P < 0.001$ ; da -28 a -8) sia verso IN-PICE ( $P < 0.01$ ; a -28 e -14). Con l'avvicinarsi del parto, i livelli sono gradualmente aumentati, raggiungendo il picco il primo giorno di lattazione in tutti i gruppi. L'incremento maggiore prima del parto e il picco più alto è stato osservato nel gruppo LO-PICE ( $P < 0.05$ ; tra -6 e 1 giorno di lattazione). Dopo il parto il gruppo LO-PICE ha mostrato livelli medi di bilirubina più elevati sia rispetto a IN-PICE (NS) sia rispetto ad UP-PICE (spesso in modo significativo).

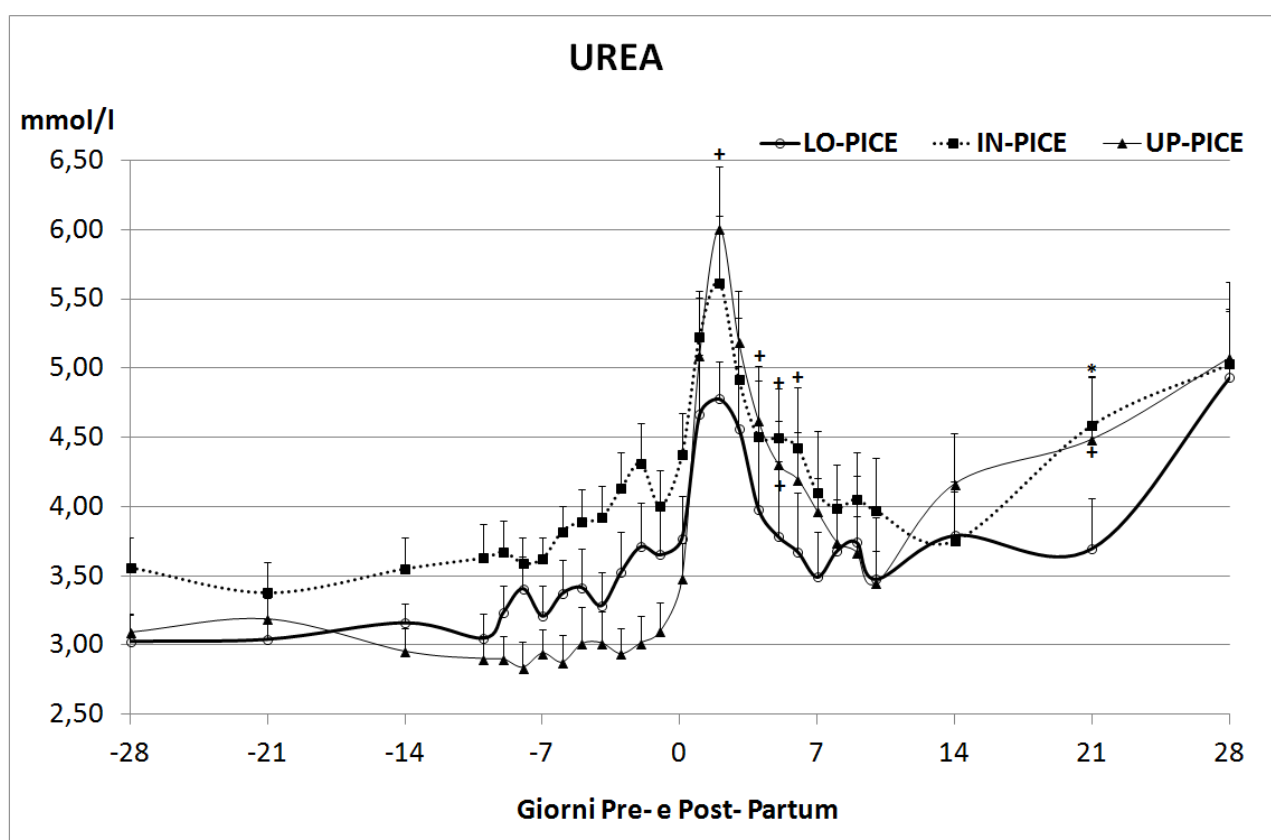


**Fig. 4.10** – Andamento delle concentrazioni plasmatiche medie di bilirubina in bovine da latte di razza Frisona, suddivise in terzili in base al valore dell'indice PICE e monitorate giornalmente da -28 giorni prima a 28 giorni dopo il parto. La significatività statistica tra il gruppo LO-PICE e gli altri due (IN-PICE e UP-PICE) ad un determinato livello temporale è indicata con un simbolo accanto al valore medio di questi gruppi: +  $P < 0.10$ ; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

## INDICI METABOLISMO ENERGETICO-PROTEICO E MINERALE

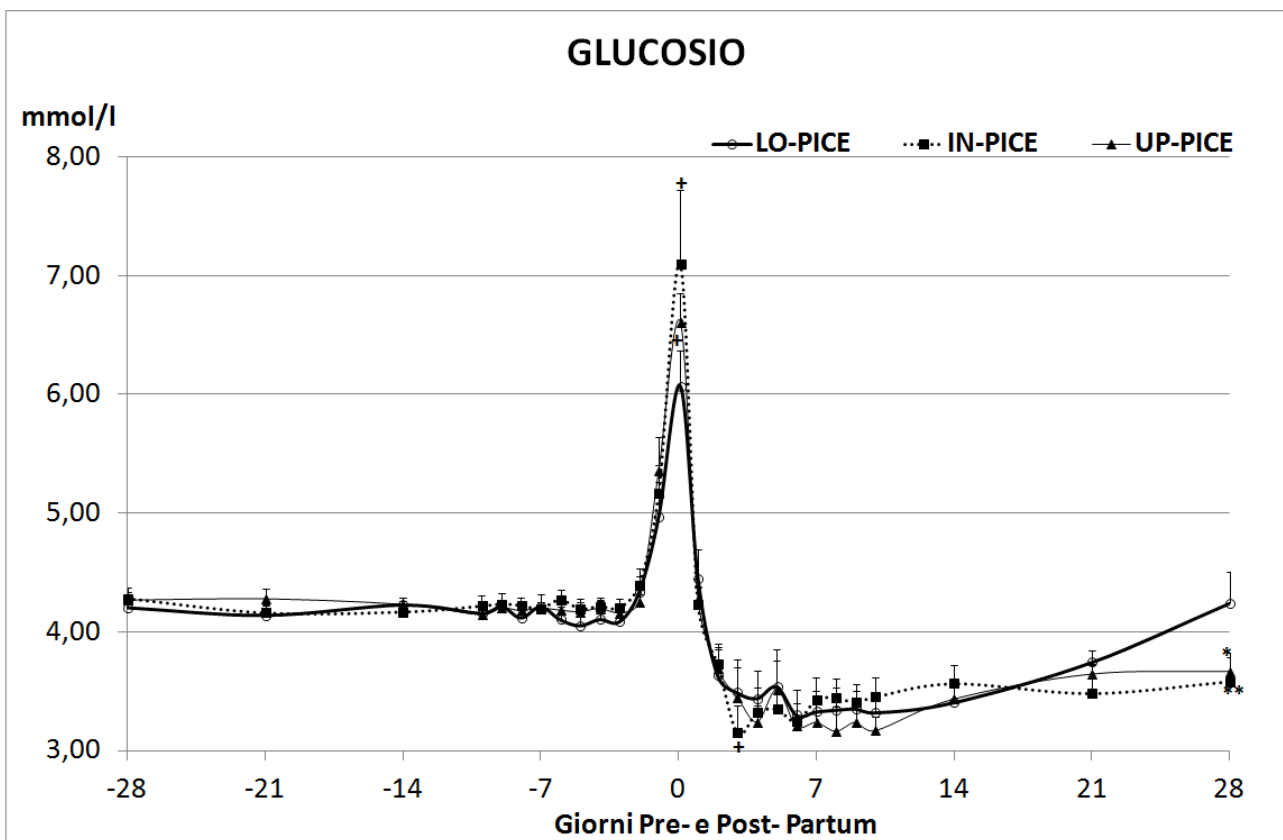
Tra gli indici dello stato proteico ed energetico, sono stati determinati l'urea ed il glucosio.

L'urea (Fig.4.11) ha presentato un andamento tendenzialmente crescente nel corso dell'ultimo mese di gravidanza in tutti e tre i gruppi. Il gruppo IN-PICE ha presentato livelli più elevati e con un aumento pre-parto maggiore rispetto agli altri gruppi, ma è stata raggiunta la significatività statistica solo con UP-PICE tra -8 e 0 giorni dal parto ( $P<0.05$ ). Dopo il parto l'urea ha subito un forte e transitorio aumento in tutti e 3 i gruppi. Tale aumento è risultato più marcato nel gruppo UP-PICE. Dopo tale aumento i livelli di urea si sono ridotti, ma è nuovamente iniziato ad aumentare dal 21° DIM in tutti e 3 i gruppi.



**Fig. 4.11 – Andamento delle concentrazioni plasmatiche medie di urea in bovine da latte di razza Frisone, suddivise in terzi in base al valore dell'indice PICE e monitorate giornalmente da -28 giorni prima a 28 giorni dopo il parto. La significatività statistica tra il gruppo LO-PICE e gli altri due (IN-PICE e UP-PICE) ad un determinato livello temporale è indicata con un simbolo accanto al valore medio di questi gruppi: + $P<0.10$ ; \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ .**

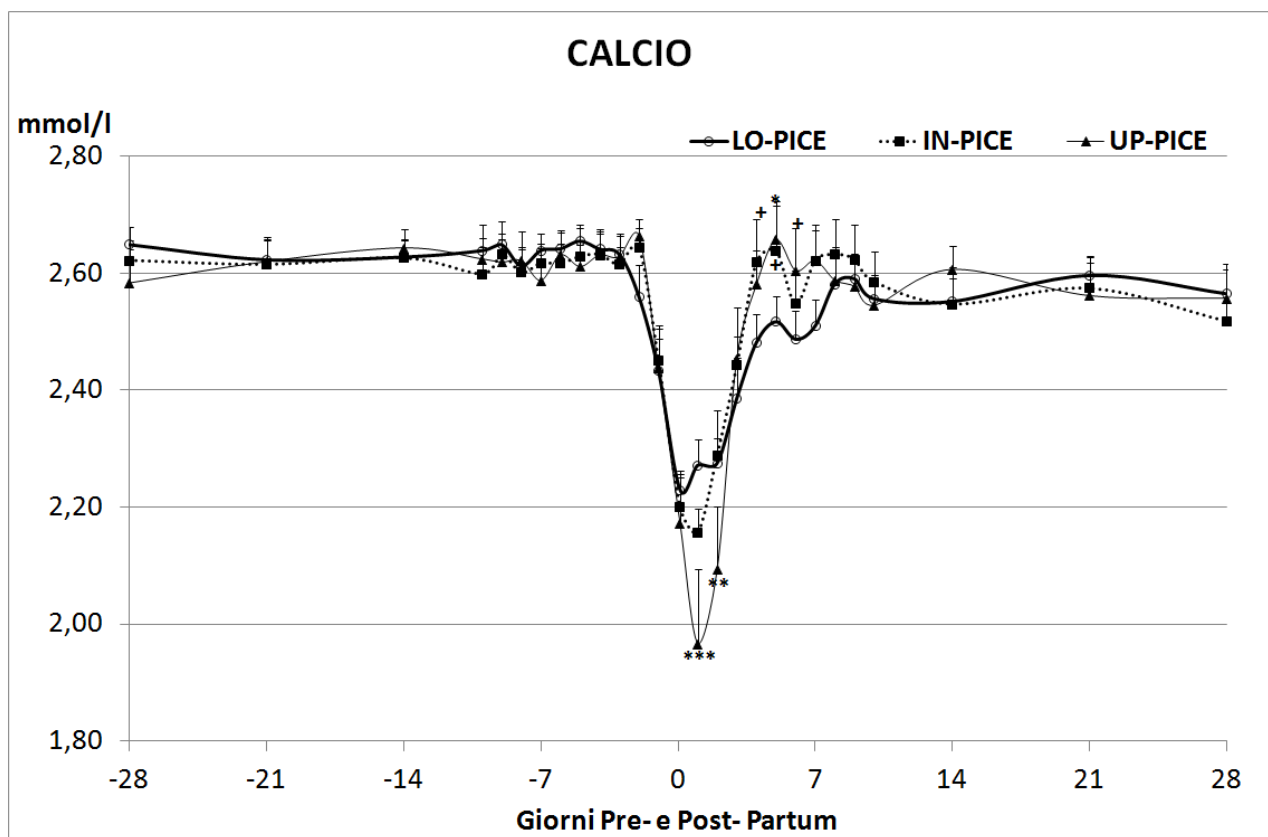
Il glucosio (4.12) ha mostrato il tipico andamento del periparto, con valori pressoché costanti in tutti e tre i gruppi sino al parto, un marcato aumento appena dopo il parto seguito da una rapida riduzione con il raggiungimento dei valori minimi nella prima settimana di lattazione. Quindi il livello della glicemia è lentamente tornato ad aumentare in tutti i gruppi, mantenendosi comunque oltre 3.3 mmol/l (ritenuto minimo fisiologico). Al momento del parto, in tutti i gruppi si è verificato un picco transitorio dei livelli plasmatici di glucosio. Ad esso è seguito un marcato calo e una lenta ricrescita analoga in tutti i gruppi. Nel gruppo LO-PICE tuttavia i valori al 28° DIM sono risultati più elevati sia rispetto al gruppo IN-PICE ( $P<0.01$ ) che UP-PICE ( $P<0.05$ ).



**Fig. 4.12 – Andamento delle concentrazioni plasmatiche medie di glucosio in bovine da latte di razza Frisona, suddivise in terzili in base al valore dell'indice PICE e monitorate giornalmente da -28 giorni prima a 28 giorni dopo il parto. La significatività statistica tra il gruppo LO-PICE e gli altri due (IN-PICE e UP-PICE) ad un determinato livello temporale è indicata con un simbolo accanto al valore medio di questi gruppi: + $P<0.10$ ; \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ .**

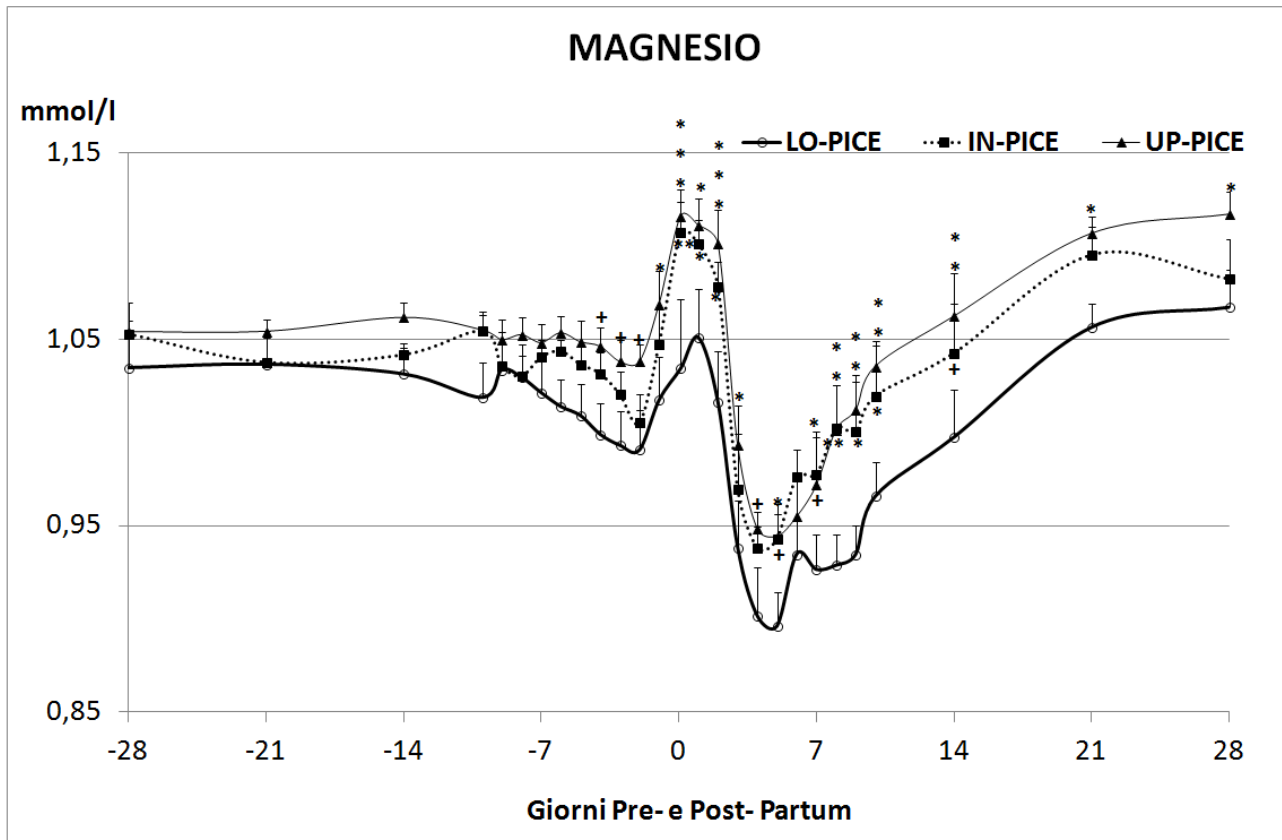
## MINERALI

Il calcio (Fig.4.13) ha mostrato una sostanziale stabilità nell'ultimo mese di gravidanza in tutti i gruppi. In seguito è diminuito in modo particolare nei primi giorni dopo il parto. Nel gruppo UP-PICE tale calo è risultato statisticamente significativo rispetto al gruppo IN-PICE ( $P<0.01$ ) ed UP-PICE ( $P<0.001$ ). Va osservato che nel gruppo UP-PICE si è verificato un episodio di collasso puerperale. Altrettanto rapidamente dal suddetto calo, la calcemia è tornata a livelli superiori a 2.4 mmol/l. Differenze significative sono state riscontrate anche tra i gruppi IN- e UP-PICE nei primi due giorni dopo il parto ( $P<0.01$ ).



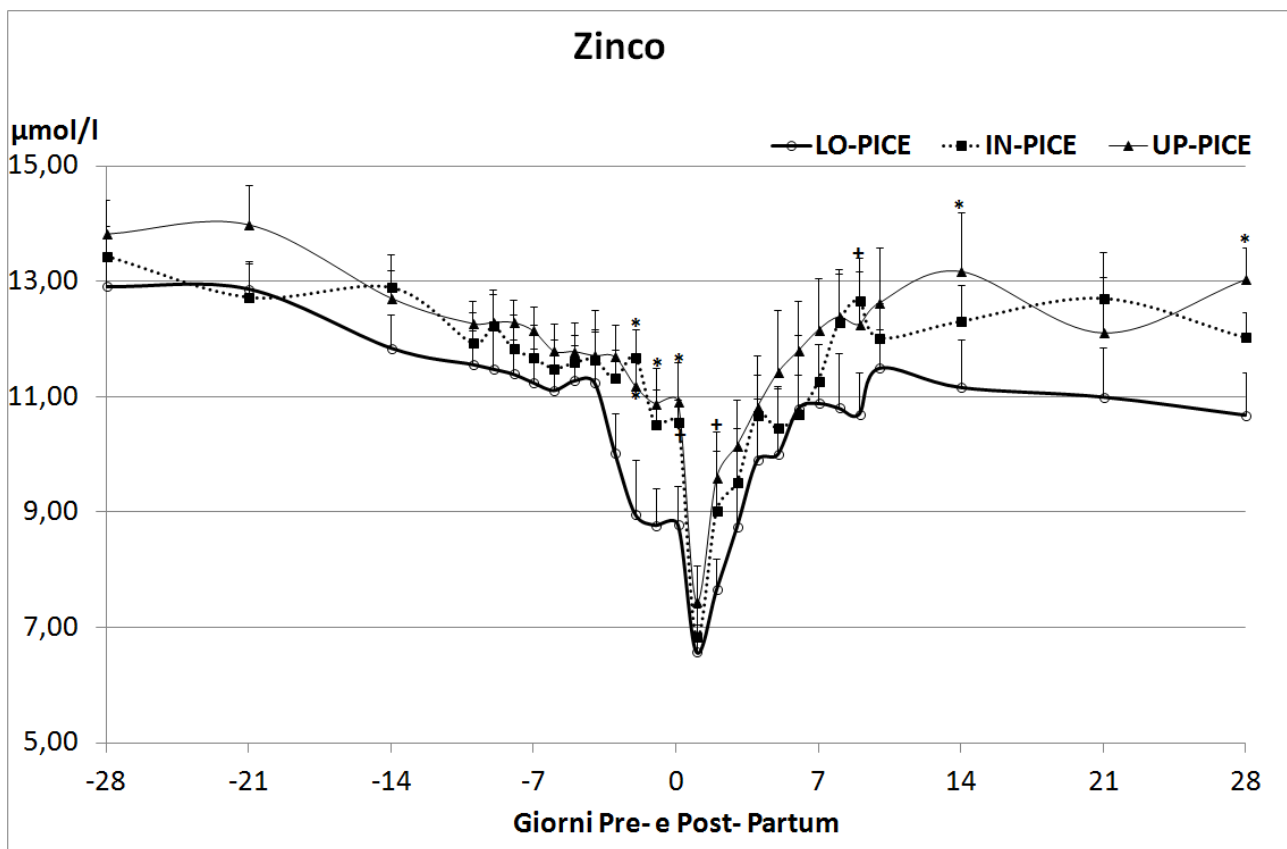
**Fig. 4.13 – Andamento delle concentrazioni plasmatiche medie di calcio in bovine da latte di razza Frisona, suddivise in terzi in base al valore dell'indice PICE e monitorate giornalmente da -28 giorni prima a 28 giorni dopo il parto. La significatività statistica tra il gruppo LO-PICE e gli altri due (IN-PICE e UP-PICE) ad un determinato livello temporale è indicata con un simbolo accanto al valore medio di questi gruppi: +  $P<0.10$ ; \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ .**

Il magnesio (Fig. 4.14) ha presentato lo stesso andamento nei tre gruppi durante l'ultimo mese di gestazione. In tutti i gruppi c'è stato un calo del magnesio nei 3 giorni precedenti il parto, a cui è seguito un aumento che è proseguito sino al 21° DIM. Il gruppo LO-PICE, ha presentato valori più bassi rispetto a IN-PICE (spesso  $P < 0.05$ ) tra 0 e 10 giorni dopo il parto ed a UP-PICE tra 0 e 28 DIM (spesso  $P < 0.01$ ). Mentre nessuna differenza significativa è stata riscontrata tra i gruppi IN-PICE vs UP-PICE.



**Fig. 4.14 – Andamento delle concentrazioni plasmatiche medie di magnesio in bovine da latte di razza Frisona, suddivise in terzili in base al valore dell'indice PICE e monitorate giornalmente da -28 giorni prima a 28 giorni dopo il parto. La significatività statistica tra il gruppo LO-PICE e gli altri due (IN-PICE e UP-PICE) ad un determinato livello temporale è indicata con un simbolo accanto al valore medio di questi gruppi: + $P < 0.10$ ; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .**

Lo zinco (Fig.4.15) ha presentato livelli simili nei 3 gruppi durante l'asciutta, ma i valori sono lentamente diminuiti nell'ultimo mese di gravidanza. In LO-PICE il calo pre-parto è stato più marcato nella settimana precedente il parto stesso ( $P<0.05$  tra 2 giorni preparto ed il parto). Immediatamente dopo il parto, si è verificata una marcata riduzione dello zinco plasmatico in tutti i gruppi, soprattutto nel gruppo LO-PICE. Successivamente i livelli di zinco sono aumentati in tutti i gruppi sino al 14° giorno di lattazione. Differenze significative tra i gruppi LO-PICE ed UP-PICE sono state osservate da -2 a 0 ( $P<0.05$ ), a 14 ( $P<0.05$ ) e a 28 ( $P<0.05$ ) giorni dal parto. Nessuna differenza significativa è risultata dal confronto IN-PICE ed UP-PICE.



**Fig. 4.15 – Andamento delle concentrazioni plasmatiche medie di zinco in bovine da latte di razza Frisona, suddivise in terzi in base al valore dell'indice PICE e monitorate giornalmente da -28 giorni prima a 28 giorni dopo il parto. La significatività statistica tra il gruppo LO-PICE e gli altri due (IN-PICE e UP-PICE) ad un determinato livello temporale è indicata con un simbolo accanto al valore medio di questi gruppi: + $P<0.10$ ; \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ .**



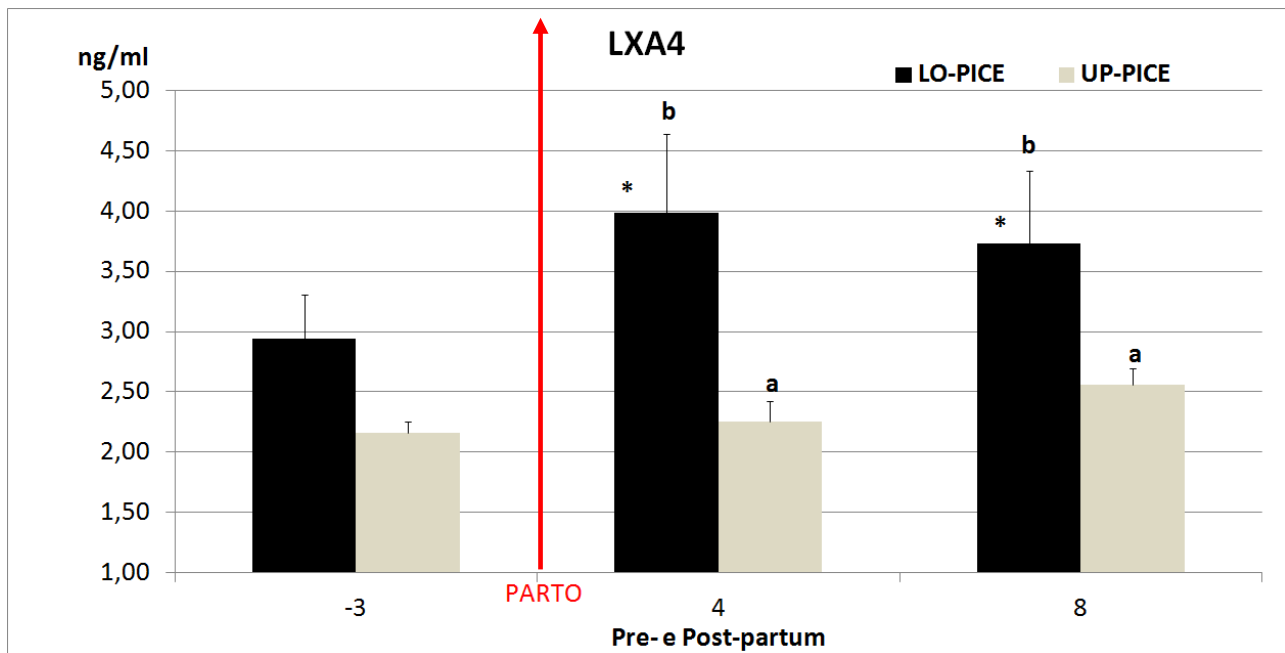
#### **4.5.1 IL LIVELLO DI LIPOSSINE IN BOVINE DA ALTO O BASSO PICE**

##### **Indice dei processi infiammatori e delle conseguenze a livello epatico.**

Dalle 12 bovine appartenenti ai gruppi LO- ed UP-PICE ne sono state scelte la metà in modo randomizzato, sulle quali si è proceduto all'analisi della lipossina A4. Di seguito si presenteranno le differenze osservate tra i due gruppi di tale mediatore endogeno implicato nella risoluzione del processo infiammatorio, delle performance e degli altri parametri ematici.

##### **Lipossina (LXA4)**

La lipossina A4 (Fig.4.16) è un mediatore lipidico endogeno, rilasciato dall'AA in seguito ad uno stimolo infiammatorio ed interviene nella risoluzione dell'infiammazione (Calder, 2006). I livelli plasmatici di tale indice sono stati determinati in ambo i gruppi di PICE a -3 giorni dal parto, a 4 e 8 giorni di lattazione. Il gruppo UP-PICE ha presentato valori più bassi di tale indice sia prima che subito dopo il parto. È visibile un lieve incremento di tale livello all'8° giorno di lattazione. Il gruppo LO-PICE, invece, ha presentato livelli plasmatici più elevati fin da prima del parto (ns vs UP-PICE). Dopo il parto si è verificato un forte aumento, con un picco al 4° giorno di lattazione, a cui è seguita una leggera riduzione. La significatività statistica tra i due gruppi è stata riscontrata al 4° ( $P < 0.01$ ) ed all'8° ( $P < 0.05$ ) giorno di lattazione.



**Fig. 4.16 –** Variazioni (media ed errore standard) nelle concentrazioni plasmatiche della LXA4 in 12 bovine da latte appartenenti ai terzili estremi (LO- e UP-PICE), suddivise in due gruppi sulle quali si è proceduto alla determinazione della lipossina A4. Le differenti lettere indicano differenze statistiche tra le medie dei gruppi LO-PICE vs UP-PICE. Gli asterischi indicano, per ogni gruppo, la significatività rispetto alla distanza dal parto (+P<0.1, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).

Pur avendo selezionato solo il 50% dei soggetti nei 2 terzili di PICE si confermano tutte le differenze a livello di stato di salute, temperatura rettale, produzione di latte, ingestione di sostanza secca, BCS e dei parametri ematici (infiammatori e metabolici) precedentemente descritti e le cui differenze statisticamente significative sono illustrate nelle Tab. 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8.

Tab. 4.3 Variazioni (media  $\pm$  Es) della Temperatura rettale, Ingestione di sostanza secca (DIM) e Produzione di latte nel periodo di transizione di bovine da latte suddivise in due gruppi (UP-PICE = alto valore e LO-PICE= basso valore) in base al valore medio dell'indice PICE (Indice dei Processi Infiammatori e delle Conseguenze Epatiche). (+ P<0.1, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).

DIM	Temperatura Rettale				DMI				Produzione di latte						
	LO-PICE (n=6)		vs	UP-PICE (n=6)		LO-PICE (n=6)		vs	UP-PICE (n=6)		LO-PICE (n=6)		vs	UP-PICE (n=6)	
	MEDIA	ES		MEDIA	ES	MEDIA	ES		MEDIA	ES	MEDIA	ES		MEDIA	ES
-28	38,59	0,13	ns	38,61	0,07	10,99	0,37	ns	13,02	0,49					
-21	38,65	0,11	ns	38,62	0,06	11,07	0,46	ns	13,11	0,57					
-14	38,83	0,13	ns	38,75	0,08	11,10	0,42	ns	13,37	0,35					
-10	38,78	0,18	ns	38,75	0,06	10,75	0,47	ns	13,11	0,78					
-9	38,89	0,16	ns	38,76	0,10	10,38	0,58	+	13,18	0,61					
-8	39,01	0,13	ns	38,82	0,06	9,75	0,28	*	13,10	0,69					
-7	38,84	0,08	ns	38,82	0,06	9,13	0,25	*	13,10	0,64					
-6	39,07	0,14	ns	38,82	0,05	9,42	0,14	+	12,37	0,71					
-5	39,24	0,13	+	38,95	0,04	9,11	0,30	*	12,66	0,68					
-4	39,03	0,15	ns	38,98	0,08	8,47	0,48	*	12,39	0,63					
-3	39,01	0,17	ns	39,03	0,09	8,10	0,57	*	11,77	0,63					
-2	39,10	0,20	ns	39,01	0,13	8,55	0,89	*	11,77	1,08					
-1	39,01	0,23	*	38,66	0,05	7,44	0,45	ns	9,12	0,44					
1	38,99	0,07	ns	38,79	0,16	8,59	0,95	ns	10,23	1,27	14,60	2,36	ns	15,63	2,08
2	38,68	0,16	ns	38,49	0,08	8,95	2,06	*	12,66	0,44	21,23	3,20	ns	21,20	1,82
3	38,79	0,12	+	38,52	0,07	10,03	1,54	*	13,36	0,69	24,47	3,08	ns	27,80	1,87
4	38,88	0,08	*	38,55	0,06	10,12	2,05	**	14,25	0,83	23,95	3,52	ns	29,72	1,87
5	38,81	0,12	ns	38,62	0,06	9,92	1,41	**	14,56	1,23	26,37	2,81	ns	31,55	2,11
6	38,91	0,14	ns	38,65	0,04	10,11	1,10	***	16,35	1,03	25,73	2,18	+	33,48	1,70
7	38,88	0,20	ns	38,71	0,11	10,79	0,99	***	17,67	0,89	25,50	1,55	*	35,03	1,60
8	38,98	0,18	ns	38,73	0,15	9,87	1,20	***	18,00	0,85	26,35	1,63	*	36,45	1,58
9	38,90	0,14	ns	38,78	0,12	12,28	0,83	***	18,04	1,03	25,92	2,30	**	37,38	1,57
10	38,87	0,14	ns	38,72	0,13	11,73	1,62	***	17,98	0,90	27,67	1,79	*	37,28	1,30
14	38,77	0,11	ns	38,73	0,09	14,65	1,02	**	19,66	1,05	29,82	3,12	**	40,58	1,69
21	38,70	0,07	ns	38,63	0,07	15,58	1,65	***	21,92	0,99	35,23	3,82	**	46,37	1,76
28	38,65	0,05	ns	38,59	0,08	16,33	3,14	***	23,74	1,06	35,38	6,46	**	48,42	1,95

Tab. 4.4 Variazioni (media  $\pm$  Es) del  $\Delta$ BCS<sub>-28</sub> nel periodo di transizione di bovine da latte suddivise in due gruppi (UP-PICE = alto valore e LO-PICE= basso valore) in base al valore medio dell'indice PICE (Indice dei Processi Infiammatori e delle Conseguenze Epatiche). (+ P<0.1, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).

DIM	$\Delta$ BCS <sub>-28</sub>				
	LO-PICE (n=6)		vs	UP-PICE (n=6)	
	MEDIA	ES		MEDIA	ES
-28	0,00	0,00	ns	0,00	0,00
-14	0,00	0,01	ns	-0,03	0,06
-7	-0,05	0,03	ns	-0,03	0,09
1	-0,17	0,03	ns	-0,10	0,09
7	-0,34	0,03	*	-0,17	0,08
14	-0,50	0,05	***	-0,23	0,07
28	-0,71	0,06	***	-0,39	0,05

**Tab. 4.5** Variazioni (media  $\pm$  Es) dell'ematocrito (PCV) e della bilirubina nel periodo di transizione di bovine da latte suddivise in due gruppi (UP-PICE = alto valore e LO-PICE= basso valore) in base al valore medio dell'indice PICE (Indice dei Processi Infiammatori e delle Conseguenze Epatiche).

(+ P<0.1, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).

DIM	PCV					Bilirubina				
	LO-PICE (n=6)		vs	UP-PICE (n=6)		LO-PICE (n=6)		vs	UP-PICE (n=6)	
	MEDIA	ES		MEDIA	ES	MEDIA	ES		MEDIA	ES
-28	0,31	0,01	ns	0,30	0,01	1,75	0,35	ns	0,52	0,12
-21	0,32	0,01	ns	0,30	0,01	1,48	0,25	ns	0,56	0,11
-14	0,33	0,01	*	0,30	0,01	1,78	0,29	ns	0,56	0,19
-10	0,31	0,01	ns	0,30	0,01	2,09	0,47	ns	0,95	0,30
-9	0,31	0,01	ns	0,30	0,01	2,58	0,54	ns	1,06	0,33
-8	0,33	0,01	+	0,30	0,01	2,76	0,58	ns	0,91	0,22
-7	0,33	0,01	+	0,30	0,01	2,88	0,83	ns	1,13	0,29
-6	0,32	0,00	ns	0,30	0,01	3,31	0,69	ns	0,98	0,26
-5	0,32	0,01	ns	0,30	0,01	3,91	1,23	ns	1,24	0,31
-4	0,33	0,01	ns	0,30	0,01	4,69	1,89	*	1,25	0,28
-3	0,33	0,00	+	0,30	0,01	4,95	1,89	*	1,31	0,26
-2	0,33	0,01	*	0,30	0,01	6,18	2,76	**	1,47	0,24
-1	0,35	0,01	**	0,32	0,01	6,40	2,08	*	2,88	0,53
0	0,36	0,01	ns	0,34	0,01	7,63	2,21	*	3,62	0,44
1	0,35	0,02	ns	0,33	0,01	10,09	3,75	***	4,22	0,56
2	0,32	0,01	ns	0,32	0,01	12,24	2,81	***	6,22	1,12
3	0,33	0,00	ns	0,31	0,01	9,87	1,64	*	6,40	1,08
4	0,32	0,00	ns	0,31	0,01	6,23	0,82	ns	5,17	0,72
5	0,32	0,01	ns	0,30	0,02	7,79	1,73	ns	5,49	0,47
6	0,33	0,01	ns	0,30	0,00	9,12	1,92	*	4,86	0,49
7	0,31	0,01	ns	0,30	0,01	7,75	1,78	*	3,82	0,48
8	0,31	0,01	ns	0,30	0,01	7,45	1,04	*	3,69	0,42
9	0,30	0,01	ns	0,29	0,01	7,47	1,57	**	3,18	0,43
10	0,31	0,01	ns	0,30	0,01	4,89	0,85	ns	2,90	0,35
14	0,31	0,00	ns	0,30	0,01	4,40	0,83	ns	3,21	0,33
21	0,29	0,01	*	0,24	0,04	2,76	0,36	ns	2,61	0,40
28	0,30	0,01	ns	0,27	0,01	3,53	1,60	ns	1,53	0,30

Tab. 4.6 Variazioni (media  $\pm$  Es) plasmatiche delle APPs positive (aptoglobina e ceruloplasmina) nel periodo di transizione di bovine da latte suddivise in due gruppi (UP-PICE = alto valore e LO-PICE= basso valore) in base al valore medio dell'indice PICE (Indice dei Processi Infiammatori e delle Conseguenze Epatiche). (+ P<0.1, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).

DIM	Aptoglobina					Ceruloplasmina				
	LO-PICE (n=6)		vs	UP-PICE (n=6)		LO-PICE (n=6)		vs	UP-PICE (n=6)	
	MEDIA	ES		MEDIA	ES	MEDIA	ES		MEDIA	ES
-28	0,09	0,07	ns	0,10	0,01	3,19	0,38	ns	2,81	0,20
-21	0,08	0,03	ns	0,10	0,01	3,08	0,32	ns	2,83	0,21
-14	0,08	0,02	ns	0,14	0,03	3,03	0,29	ns	2,62	0,15
-10	0,22	0,08	ns	0,24	0,10	2,94	0,29	ns	2,72	0,20
-9	0,14	0,03	ns	0,17	0,03	2,88	0,30	ns	2,67	0,23
-8	0,10	0,02	ns	0,13	0,03	2,90	0,26	ns	2,64	0,23
-7	0,08	0,02	ns	0,14	0,02	2,93	0,27	ns	2,54	0,23
-6	0,10	0,03	ns	0,12	0,02	2,93	0,26	ns	2,62	0,22
-5	0,11	0,02	ns	0,11	0,02	2,93	0,27	ns	2,60	0,19
-4	0,15	0,02	ns	0,12	0,03	3,00	0,27	ns	2,67	0,19
-3	0,27	0,07	ns	0,12	0,04	3,10	0,28	ns	2,56	0,20
-2	0,45	0,15	*	0,12	0,03	3,27	0,32	+	2,60	0,21
-1	0,48	0,14	**	0,13	0,04	3,14	0,29	ns	2,59	0,15
0	0,52	0,14	**	0,13	0,05	3,54	0,31	*	2,74	0,20
1	0,61	0,15	*	0,29	0,07	3,56	0,35	+	2,83	0,20
2	0,73	0,13	ns	0,53	0,06	3,69	0,35	ns	3,16	0,26
3	0,69	0,08	ns	0,54	0,14	3,95	0,35	+	3,23	0,23
4	1,00	0,22	***	0,49	0,16	3,93	0,34	*	3,09	0,14
5	1,05	0,11	***	0,39	0,11	3,95	0,30	+	3,25	0,21
6	0,93	0,07	***	0,33	0,10	4,13	0,38	*	3,22	0,20
7	0,78	0,14	***	0,20	0,05	4,09	0,31	*	3,19	0,17
8	0,69	0,13	***	0,17	0,04	3,96	0,30	+	3,28	0,18
9	0,56	0,18	**	0,18	0,04	3,94	0,26	+	3,20	0,12
10	0,48	0,16	*	0,21	0,06	3,94	0,31	*	3,16	0,16
14	0,32	0,11	ns	0,21	0,06	3,92	0,32	*	3,15	0,13
21	0,34	0,10	ns	0,20	0,05	3,70	0,40	+	2,99	0,16
28	0,36	0,15	ns	0,20	0,04	3,50	0,33	*	2,73	0,23

Tab. 4.7 Variazioni (media  $\pm$  Es) plasmatiche delle APPs negative (albumine e lipoproteine) nel periodo di transizione di bovine da latte suddivise in due gruppi (UP-PICE = alto valore e LO-PICE= basso valore) in base al valore medio dell'indice PICE (Indice dei Processi Infiammatori e delle Conseguenze Epatiche). (+ P<0.1, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).

DIM	Albumine					Colesterolo (lipoproteine)				
	LO-PICE (n=6)		vs	UP-PICE (n=6)		LO-PICE (n=6)		vs	UP-PICE (n=6)	
	MEDIA	ES		MEDIA	ES	MEDIA	ES		MEDIA	ES
-28	36,08	0,82	ns	36,62	0,64	2,53	0,28	ns	3,13	0,31
-21	35,48	0,41	ns	36,37	0,98	2,39	0,26	ns	2,91	0,29
-14	36,48	0,56	ns	35,93	0,70	2,23	0,29	ns	2,61	0,26
-10	35,05	0,78	ns	35,34	0,56	2,01	0,23	ns	2,36	0,21
-9	34,93	0,61	ns	35,38	1,16	1,97	0,23	ns	2,29	0,24
-8	34,80	0,58	ns	35,62	1,67	1,96	0,24	ns	2,26	0,25
-7	34,93	0,65	ns	34,47	1,84	1,95	0,24	ns	2,17	0,23
-6	34,61	0,91	ns	35,85	0,81	1,88	0,23	ns	2,13	0,21
-5	34,40	0,85	ns	35,45	0,77	1,84	0,22	ns	2,08	0,17
-4	34,37	0,63	ns	35,70	0,87	1,94	0,22	ns	2,05	0,16
-3	33,97	0,82	ns	35,06	0,89	1,85	0,21	ns	1,96	0,16
-2	34,35	0,78	ns	35,31	0,93	1,86	0,22	ns	1,96	0,17
-1	33,44	0,85	+	35,64	1,14	1,81	0,20	ns	1,92	0,18
0	34,22	0,98	*	36,72	0,73	1,74	0,19	ns	1,84	0,15
1	33,97	0,97	ns	35,32	1,09	1,67	0,17	ns	1,73	0,13
2	32,74	1,01	*	35,63	1,01	1,58	0,15	ns	1,85	0,14
3	33,87	1,01	+	35,93	0,86	1,68	0,16	ns	1,99	0,12
4	33,43	1,00	*	36,00	0,71	1,72	0,13	ns	2,09	0,10
5	32,90	0,85	**	36,07	0,55	1,70	0,17	ns	2,20	0,14
6	33,49	0,65	+	35,65	0,95	1,75	0,17	ns	2,32	0,16
7	33,17	0,59	ns	35,17	0,77	1,82	0,14	ns	2,46	0,16
8	32,24	0,29	**	36,06	0,97	1,84	0,15	*	2,64	0,22
9	33,64	0,73	ns	35,57	0,86	1,94	0,17	*	2,74	0,21
10	32,98	0,90	*	35,97	0,73	2,03	0,15	*	3,00	0,18
14	34,48	0,63	*	37,23	0,50	2,60	0,11	*	3,60	0,23
21	33,91	0,53	***	38,19	1,08	3,41	0,21	***	4,75	0,30
28	35,06	0,68	***	38,71	0,90	4,05	0,38	***	5,80	0,28

Tab. 4.8 Variazioni (media  $\pm$  Es) plasmatiche dello zinco, del magnesio nel periodo di transizione di bovine da latte suddivise in due gruppi (UP-PICE = alto valore e LO-PICE= basso valore) in base al valore medio dell'indice PICE (Indice dei Processi Infiammatori e delle Conseguenze Epatiche). (+ P<0.1, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).

DIM	Zinco					Magnesio				
	LO-PICE (n=6)		vs	UP-PICE (n=6)		LO-PICE (n=6)		vs	UP-PICE (n=6)	
	MEDIA	ES		MEDIA	ES	MEDIA	ES		MEDIA	ES
-28	13,27	0,56	ns	13,46	1,11	1,07	0,02	ns	1,05	0,01
-21	13,45	0,35	ns	13,60	0,82	1,06	0,02	ns	1,06	0,00
-14	12,93	0,59	ns	12,01	0,65	1,06	0,02	ns	1,06	0,01
-10	11,45	0,76	ns	12,07	0,62	1,03	0,02	ns	1,04	0,01
-9	11,44	0,86	ns	12,04	0,74	1,04	0,02	ns	1,03	0,01
-8	11,26	0,92	ns	11,86	0,61	1,04	0,02	ns	1,04	0,01
-7	11,36	0,73	ns	11,67	0,56	1,03	0,02	ns	1,02	0,00
-6	11,32	1,03	ns	11,39	0,46	1,02	0,02	ns	1,04	0,01
-5	11,08	0,86	ns	11,60	0,71	1,02	0,03	ns	1,03	0,01
-4	10,00	0,93	ns	11,34	0,53	1,00	0,03	ns	1,03	0,02
-3	9,67	1,21	ns	11,14	0,70	1,00	0,03	ns	1,01	0,01
-2	8,96	1,56	*	11,02	0,62	0,99	0,03	ns	1,02	0,01
-1	8,83	1,12	+	11,04	0,93	1,02	0,03	ns	1,06	0,03
0	8,41	1,14	+	10,46	0,82	1,05	0,02	*	1,13	0,02
1	6,22	0,80	ns	6,92	0,80	1,04	0,02	*	1,11	0,02
2	7,11	0,58	ns	8,75	1,22	1,04	0,03	*	1,11	0,03
3	9,22	1,25	ns	10,15	0,95	0,96	0,04	ns	0,99	0,04
4	10,68	1,83	ns	11,10	1,20	0,93	0,04	ns	0,96	0,01
5	11,15	1,85	ns	11,17	1,54	0,91	0,03	ns	0,95	0,02
6	12,15	2,08	ns	11,30	1,38	0,95	0,03	ns	0,99	0,02
7	12,61	1,08	ns	11,50	1,37	0,93	0,03	**	1,02	0,02
8	11,69	1,45	ns	12,41	1,39	0,90	0,02	***	1,04	0,01
9	12,13	0,79	ns	12,21	1,38	0,93	0,02	***	1,05	0,01
10	12,50	0,83	ns	12,39	1,25	0,98	0,03	*	1,05	0,02
14	12,29	0,96	ns	13,43	1,52	1,04	0,03	ns	1,08	0,01
21	11,96	1,26	ns	12,73	1,34	1,08	0,01	ns	1,11	0,01
28	10,77	0,75	ns	13,08	1,02	1,07	0,03	ns	1,11	0,02

## 4.6 Discussione

### UTILITA' DELL'INDICE PICE

Le bovine da latte manifestano una risposta di fase acuta più o meno severa nel loro periparto che si caratterizza per l'aumento delle proteine positive di fase acuta e per il calo delle proteine negative di fase acuta, come precedentemente descritto in varie ricerche (Bionaz. e coll., 2007; Bertoni e coll., 2008; Trevisi e coll., 2009). Tale risposta ha conseguenze più o meno gravi per le bovine che comportano anomalie del loro stato di salute, in particolare l'aumento della frequenza delle patologie tipiche o meno del periparto (Bertoni e coll., 2008), quindi una riduzione delle performance: sia del livello produttivo (Bionaz e coll. 2007, Bertoni e coll., 2008), con elevato ricorso alle riserve corporee (Bertoni e coll., 2008) e riduzione della efficienza dei nutrienti (Trevisi e coll., 2007; Trevisi e coll., 2010c) e sia della fertilità (Bertoni e coll., 2008). In tale contesto uno dei problemi più rilevanti nell'allevamento delle bovine da latte è quello di individuare precocemente i soggetti che presentano le conseguenze più gravi dovute alla manifestazione dei processi infiammatori verificatisi nel periparto. Con tale finalità, presso l'Istituto di Zootecnica dell'Università Cattolica di Piacenza sono stati fatti in passato dei tentativi, che hanno portato alla definizione del:

- LAI (Trevisi e coll., 2001), che include la variazione nel primo mese di lattazione di 3 indici plasmatici diretti e indiretti delle proteine negative di fase acuta, albumine, colesterolo quale indice delle lipoproteine e vitamina A quale indice della Retinol Binding Protein rispettivamente;
- LFI (Bertoni e coll., 2006), che include la variazione tra il 3° e 28° giorno di lattazione di 3 indici diretti e indiretti delle proteine negative di fase acuta: albumine, colesterolo quale indice delle lipoproteine e bilirubina totale quale indice degli enzimi di produzione epatica preposti all'eliminazione della bilirubina. In entrambi i casi il sostanziale limite è rappresentato dalla impossibilità di ottenere una valutazione precoce delle conseguenze dell'evento infiammatorio. Infatti tali indici mostrano la loro utilità in campo solo per eventuali trattamenti riguardanti la sfera riproduttiva offrendo una valutazione delle bovine solo a 35- 40 giorni dopo il parto, consentendo eventualmente di anticipare le sole terapie per ripristinare la corretta ciclicità ovarica (Bertoni e coll., 2008). L'utilità del nuovo indice denominato PICE nasce dalla possibilità di valutare in modo più preciso la gravità dei processi infiammatori (massimo aumento dell'aptoglobina) limitando il monitoraggio entro i primi 10 giorni di lattazione e le conseguenze a livello epatico (minimo livello di bilirubina entro 10 DIM e colesterolo entro 28 DIM). Tale indice non consente ancora di



individuare gli animali problema in anticipo rispetto a LFI e LAI, ma permette di individuare meglio la gravità delle forme infiammatorie subcliniche.

In particolare, l'efficacia della classificazione delle bovine con tale criterio è dimostrata sia dalle differenze tra le bovine appartenenti ai terzili migliore (UP-PICE) e peggiore (LO-PICE) relativamente alle proteine positive e negative di fase acuta incluse o meno nel calcolo dell'indice; sia dalle differenze relative alle performance che dalla buona correlazione fra PICE e l'indice LFI ( $r = 0.609$ ;  $P < 0.001$ ). Le differenze osservate tra i terzili di PICE sono molto simili a quelle viste nei precedenti lavori in cui è stato valutato l'indice LFI (Bertoni e coll., 2006), l'indice LAI (Bertoni e coll., 2008) o la PON (Bionaz e coll., 2007). Infatti, il gruppo LO-LFI mostrava alti valori delle proteine positive di fase acuta, bassi valori delle proteine negative di fase acuta, nonché un peggioramento del metabolismo lipidico. Tutto questo è in buon accordo con quanto osservato in questo studio: ripartendo le bovine secondo l'indice PICE si è potuto constatare che il gruppo LO-PICE ha mostrato al momento del parto una risposta infiammatoria più severa rispetto al gruppo UP-PICE. In entrambi i gruppi si è infatti riscontrata la presenza di una risposta di fase acuta al parto, come è evidenziato dall'aumento delle proteine positive di fase acuta (aptoglobina e ceruloplasmina) e da un calo delle proteine negative di fase acuta (lipoproteine e Retinol Binding Protein) più marcato in LO-PICE, ciò in analogia a quanto ben evidenziato in precedenti ricerche (Trevisi e coll., 2001; Bionaz e coll., 2007). Tuttavia il gruppo LO-PICE ha anche mostrato un aumento marcato dell'urea al momento del parto ed una marcata riduzione dello zinco plasmatico, fatti non sempre evidenti nelle precedenti ricerche. Questi indici si modificano fortemente in associazione a seri problemi di salute e in presenza di fatti infiammatori (Goff e coll., 1990).

In aggiunta, sia nel gruppo LO-PICE che in quello LO-LFI, si è osservato un calo di ingestione ed un più lento aumento della produzione latte, eventi molto comuni nella bovina da latte in fase di transizione e che possono essere indotti da fattori metabolici e fisici (Trevisi e coll., 2011). Inoltre, le bovine spesso mostrano un aumento più marcato della temperatura corporea nei giorni successivi al parto e ciò è stato osservato sia nei gruppi LO-LFI che LO-PICE (Bertoni e coll., 2006). Tali aumenti della temperatura sono verosimilmente connessi ad un rilascio di citochine pro-infiammatorie che, come è stato osservato da Elsasser e coll. (2000), inducono febbre, anoressia, e catabolismo muscolare. Infatti, Trevisi e coll. (2010a) hanno riscontrato un rilascio maggiore di IL-6 nel gruppo LO-LFI, il cui picco è stato raggiunto a 3 DIM. Inoltre, anche il predetto minor livello produttivo e di ingestione, può essere giustificato dallo stress indotto dal parto, infatti Drackley e coll., (2005) e Pedersen e coll., (1998) hanno riportato che una condizione di stress estremo può indurre il rilascio delle citochine pro-infiammatorie le quali influenzano negativamente la

produzione lattea e l'ingestione di sostanza secca. Nel lavoro precedente, infatti, è stato osservato che il gruppo UP-PICE, che ha mostrato un aumento marcato delle citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ed IL-6) rispetto al gruppo LO-PICE in fase di asciutta è stato anche quello che ha presentato un calo marcato di ingestione al momento del parto ed una minore produzione lattea.

La similitudine fra i due criteri di stima (PICE ed LFI) è quindi evidente; il coefficiente di correlazione tra i due indici non è tuttavia così elevato da poterli considerare surrogati uno dell'altro. Questo è probabilmente giustificato dal fatto che l'indice PICE è stimato principalmente sulla base delle osservazioni nei giorni immediatamente successivi al parto (nei primi 10 DIM) mentre LFI valuta l'effetto verificatosi entro il primo mese di lattazione (differenza ottenuta tra 3° e 28° DIM). Bionaz e coll. (1997), nei loro studi, hanno osservato che basse concentrazioni ematiche della PON già prima del parto erano associate a peggiori performance produttive e riproduttive, riuscendo in questo modo ad individuare precocemente bovine che mostravano una risposta infiammatoria più severa in lattazione.

Nonostante ciò, l'uso dell'indice PICE ha fornito risultati incoraggianti soprattutto per la massima tempestività del riscontro, tuttavia potrebbe essere semplificato attraverso l'individuazione di pochi parametri ematici che nei primi 10 giorni di lattazione forniscano un indice il più possibile correlato con l'indice LAI, soprattutto con la fertilità successiva e che infine possa aiutare l'allevatore ad individuare tempestivamente le bovine che necessitano di maggiori cure post-parto.

#### EFFICACIA DELLE LIPOSSINE NEL DEFINIRE LA RISPOSTA DELLE BOVINE ALL'INFIAMMAZIONE.

Le lipossine (LXA4) sono state annoverate tra gli indicatori coinvolti nella risoluzione del processo infiammatorio e sono generate dagli acidi grassi polinsaturi omega-6 (acido arachidonico) (Serhan., 1997). In letteratura esistono molti studi che dimostrano la funzione anti-infiammatoria espletata da questi mediatori in molte malattie infiammatorie ed autoimmuni che colpiscono l'uomo. Boutet e coll., (2003) in uno studio condotto in bovine affette da mastite cronica, mastite acuta e bovine sane, hanno dimostrato una maggiore presenza della LXA4 rispetto al leucotriene B4 (LTB4) nel latte prodotto da bovine affette da mastite acuta. Nelle bovine con mastiti croniche invece, tali autori hanno osservato un rapporto ritenuto sfavorevole tra questi due eicosanoidi (ovvero bassa LXA4 ed alto LTB4) e che la persistenza dell'accumulo di neutrofili potrebbe essere attribuita ad un incremento nella sintesi di LTB4 oppure alla minore produzione di LXA4. Il basso rapporto LXA4/LTB4 è presente nelle infiammazioni croniche e potrebbe causare una lenta risoluzione del processo infiammatorio. Tali risultati sembrano inoltre suggerire che bassi livelli di LXA4 nel latte

di bovine con mastite cronica potrebbero essere implicati nei meccanismi attraverso cui l'infiammazione non si risolve e diventa persistente.

Nel nostro caso, tutte le bovine hanno mostrato un aumento della LXA4 dopo il parto, ma più elevato nei soggetti appartenenti al gruppo LO-PICE (processi infiammatori più intensi). Ciò è in sintonia con quanto proposto da Van Dyke e coll. (2003) secondo cui la produzione di tali mediatori lipidici aumenta per bloccare il processo infiammatorio e probabilmente l'aumento è stato più elevato quanto maggiore è stato il fatto infiammatorio stesso. Infatti in LO-PICE vs UP-PICE, i processi infiammatori sono stati più severi e duraturi, come dimostrato da un aumento maggiore delle proteine positive di fase acuta e da un calo più prolungato delle proteine negative di fase acuta. Il fatto più rilevante è tuttavia quello che riguarda i livelli assoluti di LXA4. Infatti, il gruppo UP-PICE ha mostrato valori più bassi di tale mediatore, sia prima che dopo il parto, rispetto al gruppo LO-PICE; tuttavia, come era lecito attendere, le differenze statistiche tra i due gruppi sono state riscontrate solo dopo il parto a 4 ed a 8 DIM. Il risultato ci porterebbe a suggerire che nei soggetti UP-PICE vi era una minore produzione di tali mediatori lipidici prima del parto probabilmente in conseguenza ad una situazione metabolica migliore; per contro, in LO-PICE, esistevano probabilmente fatti infiammatori già prima del parto come testimoniato dalla diversa presenza delle proteine di fase acuta (specie le negative) già prima del parto. Questo spiegherebbe anche il motivo per cui gli studi condotti in questo Istituto sono principalmente focalizzati sull'uso di indici composti principalmente da proteine negative di fase acuta in quanto mostrano interessanti variazioni plasmatiche, spesso già prima del parto. Tuttavia allo stato attuale non è stato ancora possibile trovare un indice in grado di individuare i soggetti problema valutando le loro variazioni prima del parto. Appare comunque di notevole interesse investigare in tale direzione.

## Conclusioni

I risultati suggeriscono che il momento del parto è accompagnato da condizioni infiammatorie più o meno severe, spesso senza la comparsa di sintomi clinici evidenti. Tali condizioni infiammatorie inducono una risposta di fase acuta: una reazione sistemica dell'organismo caratterizzata da cambiamenti nelle concentrazioni plasmatiche di proteine derivate dal fegato. L'impiego di queste proteine nel calcolo di indici complessi consente di valutare lo "stato di salute" dei soggetti anche senza manifestazioni cliniche. Ciò può essere particolarmente utile perché:

- i soggetti che mostrano una risposta infiammatoria più "severa" intorno al parto necessitano di un'accurata diagnosi e di eventuali interventi con la massima tempestività. E' interessante rimarcare che una importante quota di tali soggetti con severo stato infiammatorio post-parto (LO-PICE) è risultato asintomatico, ovvero non ha subito trattamenti terapeutici;
- i soggetti che mostrano una bassa risposta infiammatoria intorno al parto, ad esempio alto PICE e bassa lipossina al momento del parto, necessitano di minore impegno di monitoraggio da parte del personale.

## **CAPITOLO 5**

### **STUDIO DEGLI EFFETTI E/O CONSEGUENZE DELLO STATO METABOLICO SUL PROCESSO INFIAMMATORIO VALUTANDO LE RISPOSTE AL CHALLENGE CON LPS INTRAMAMMARIO DURANTE INFUSIONE A LUNGO TERMINE CON INSULINA, GLUCOSIO E CORPI CHETONICI.**

#### **INTRODUZIONE**

La fase di transizione dalla gravidanza alla lattazione, rappresenta spesso una esperienza disastrosa per la bovina da latte (Drackley 1999). Infatti, le bovine subiscono considerevoli cambiamenti metabolici e fisiologici, che hanno lo scopo di soddisfare gli incrementati fabbisogni nutrizionali per la crescita fetale e per la lattogenesi. In tale fase si verifica un aumento considerevole della produzione lattea ed un lento aumento dell'ingestione di sostanza secca in quanto l'apparato digerente deve adattarsi alle richieste energetiche imposte dalla produzione lattea (Bertoni e coll., 2009). Per cui le bovine si vengono a trovare in uno stato di Bilancio Energetico Negativo (NEB) che, quando diviene eccessivo e prolungato, conduce ad una esagerata mobilitazione delle riserve corporee, riduce la produzione lattea ed induce problemi riproduttivi (Bertoni e coll., 2009). Pertanto in una situazione in cui i fabbisogni eccedono la quantità di energia che le bovine riescono ad ottenere mediante l'alimentazione si verifica una incrementata lipolisi (idrolisi dei trigliceridi in glicerolo ed acidi grassi) ed una ridotta lipogenesi (sintesi degli acidi grassi a partire dall'acetil-CoA) a livello del tessuto adiposo; nonché un incremento della gluconeogenesi (permette di ottenere glucosio da precursori non saccaridici es: piruvato, lattato etc.); di conseguenza, nel fegato è stimolata la glicogenolisi, processo metabolico che degrada il glicogeno fino ad ottenere glucosio (Suriyasathaporn e coll., 2000). Tali cambiamenti metabolici sono fisiologici, ma se divengono esagerati possono impedire alla bovina di raggiungere la sua potenziale produzione di latte e, specie se associati con altri fattori di stress, possono contribuire alla manifestazione di vari problemi di salute, quali chetosi, steatosi epatica, le metriti, e la dislocazione dell'abomaso, che accadono principalmente entro le prime settimane di lattazione.

L'infezione è associata al rilascio di endotossina (LPS), principale componente della parete cellulare dei batteri Gram-negativi, in seguito a batteriolisi o durante periodi di rapida proliferazione batterica (Wang e coll., 2006). Le cellule immunitarie riconoscono l'agente patogeno ed attivano una serie di meccanismi difensivi che conducono al rilascio di vari mediatori dell'infiammazione tra cui le citochine pro-infiammatorie che svolgono un ruolo importante nello stimolare la APR (Calder, 2006). I principali obiettivi dell'APR sono: prevenire un ulteriore danno al tessuto e/o

organo; isolare, distruggere e contrastare l'agente infettivo o abiotico che ha indotto la risposta; rimuovere le molecole dannose; ripristinare l'omeostasi; attivare i processi di riparazione affinché l'organo possa riprendere la sua normale funzionalità (Henrich e coll., 1990).

## 5.1 Scopi della prova

La prova sperimentale è stata finalizzata al raggiungimento dei seguenti obiettivi:

- 1) Valutare l'effetto di diverse condizioni fisiologiche (euglicemia stato che simula la condizione di insulino-resistenza; ipoglicemia stato che simula il deficit energetico; iperchetonemia stato che simula la chetosi subclinica in assenza di deficit energetico) che possono manifestarsi in bovine da latte, al fine di investigare quale condizione fisiologica determina le maggiori conseguenze sulla risposta di fase acuta;
- 2) Valutare le conseguenze metabolico – funzionali della risposta infiammatoria di breve periodo indotta da una stimolazione intramammaria con LPS, su bovine nelle predette condizioni fisiologiche, in quanto poco è stata investigata la relazione esistente tra tali cambiamenti metabolici e la comparsa di malattie infettive come le mastiti.

## 5.2 Materiali e Metodi

### Disegno sperimentale e trattamenti

La prova sperimentale è stata eseguita presso la Stazione Federale Svizzera situata in Posieux dove è presente una sede distaccata dell'Istituto di Fisiologia Veterinaria dell'Università di Berna ed è stata approvata dal Committee per gli Esperimenti Animali del Cantone di Friburgo. Parte di questi dati (ingestione di sostanza secca, produzione di latte ed alcuni parametri ematici, come più sotto specificato) sono già stati precedentemente pubblicati e nella presentazione dei risultati si farà riferimento a tali lavori.

Il presente studio ha coinvolto 19 bovine di razza Holstein in fase intermedia di lattazione, non gravide e non in calore, aventi un numero di lattazioni maggiore o uguale a 2. L'allevamento era a stabulazione fissa; l'alimentazione era costituita da fieno ad libitum (5.8 MJ/kg di sostanza secca) e apposito concentrato, somministrato due volte a giorno, in base al livello di produzione di latte di ciascuna bovina e da 50 grammi di integrazione minerale somministrata una volta al giorno. L'acqua era disponibile ad libitum. La mungitura era effettuata due volte al giorno (5:30 a.m. e 16:00 p.m.) alla posta. Le bovine erano monitorate giornalmente per quanto riguarda: stato di salute, ingestione di alimenti (DMI), produzione latte e tenore di cellule somatiche. Condizione fondamentale della prova sperimentale era che tutti i quarti non dovevano presentare sintomi clinici e subclinici di infiammazione e pertanto dovevano presentare un tenore in cellule somatiche inferiore a 150.000 cellule/ml. La temperatura rettale, il peso corporeo ed il BCS erano valutati settimanalmente.

Le bovine sono state suddivise in 4 gruppi in base al tipo di trattamento (NaCl, BOHB, EuG, IpoG). Le infusioni di corpi chetonici (BOHB), glucosio ed insulina, sono state eseguite attraverso un catetere intravenoso (Cavix®, Certo® Splittocan®, B. Braun Mesung AG, Germania), con una lunghezza di 32 cm ed un diametro di 16 G, inserito in una vena giugulare e con l'ausilio di una pompa peristaltica (Perpex Jubile pump, H.J. Guldener, Zürich, Svizzera). Ciascun trattamento è durato tre giorni, dalle ore 9:00 del primo giorno alle ore 17.00 del terzo giorno. Anche nella vena giugulare contrapposta a quella usata per l'infusione, è stato inserito un catetere che è stato utilizzato per i prelievi ematici. Entrambi i cateteri sono stati posizionati in vena il giorno precedente l'inizio delle infusioni. Sugli stessi animali, dopo 48 ore dall'inizio dell'infusione è stata effettuata una stimolazione intramammaria con 200 µg di LPS da E. coli sierotipo 026:B6 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, # L8274), diluito in 10 ml di soluzione salina sterile allo 0.9% in due quarti della mammella (entrambi i destri o i sinistri) decisi in base al valore delle cellule somatiche, mentre gli altri due, sono serviti da controllo e si è proceduto alla infusione intramammaria di 10 ml di soluzione fisiologica allo 0,9%.

Il gruppo controllo (NaCl, n=6) ha ricevuto una soluzione salina fisiologica con un tasso di infusione di 20 ml/h per 56 ore; il gruppo iperchetonemico, (BOHB, n=4) ha ricevuto una soluzione di β-idrossibutirrato al fine di indurre chetosi subclinica, per mantenere un livello stabile di corpi chetonici plasmatici pari a 1.5 - 2.0 mmol/l, che sono stati valutati frequentemente durante l'infusione mediante lo strumento Cobas Mira Plus (Roche); il gruppo ipoglicemico (IpoG, n=4), ha ricevuto un'infusione di insulina di 0.6 mU/kg PV/min ± 0.1mU/kg PV/min, per ottenere una condizione ipoglicemica costante di 2.3±0.1 mmol/l di glucosio ematico; infine, il gruppo euglicemico (EuG, n=5), ha ricevuto un tasso di insulina di 0.6 mU/kg PV/min (in base al tasso di infusione medio stabilito nella precedente tesi IpoG) e contemporaneamente di glucosio al 40% (Dr. G. Bichsel AG, Interlaken, Svizzera), al fine di mantenere le concentrazioni di glucosio ematico pre-trattamento nel plasma (3.8 ± 0.2 mmol/l) ed elevate concentrazioni di insulina (Kreipe e coll., 2011).



### **Preparazione delle soluzioni.**

Per la preparazione della soluzione di insulina, usata nei gruppi EuG e IpoG, è stata impiegata una soluzione stock preparata il giorno prima dell'infusione. Per 500 ml di soluzione stock, 11.85 g di cloruro di potassio (Merck Sharp & Dohme-Chibret AG, Svizzera), 4.688 g di cloruro di sodio (Merck Sharp & Dohme-Chibret AG, Svizzera) e 0.521 g di albumina di siero bovino (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Germania) sono stati disciolti in 500 ml di acqua bi-distillata. La soluzione stock è stata poi filtrata (Millipore Express® PLUS Membrane 45 mm, Millipore, Cina) e conservata a 5°C. La soluzione finale di insulina, preparata più volte durante i trattamenti, è stata ottenuta aggiungendo 27 U/mg insulina di bovino, (I4011, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germania) e il 4.17 % di plasma in eparina, ottenuto al momento da sangue centrifugato a 3000 x g per 20 minuti, alla soluzione stock di 500 ml. La soluzione insulina è stata successivamente preparata in due differenti concentrazioni contenenti 4 mU/kg PV o 1 mU/kg PV di insulina.

Per la preparazione della soluzione di  $\beta$ -idrossibutirrato sono state effettuate le seguenti operazioni: solubilizzazione di 837.16 g di acido DL- $\beta$ -idrossibutirrato (Sigma-Aldrich, H 6501) in acqua bi-distillata fino a raggiungere una quantità di soluzione pari a 3000 ml; omogenizzazione mediante un rotor mixer; aggiustamento del pH con HCl a 7.4; sterilizzazione mediante autoclave a 1 bar e a 131 °C per 50 minuti; filtrazione (Millipore Express® PLUS Membrane 45 mm, Millipore, Cina). Infine la soluzione è stata stoccata a 4°C fino al suo uso. Il tasso di infusione iniziale della suddetta soluzione è stato calcolato sulla base del peso corporeo dell'animale e la molarità (1.7 mol/l). Il tasso di infusione iniziale era di circa 9  $\mu$ mol/kg PV/min al fine di raggiungere i livelli di chetonemia pari a 1.5 – 2.0 mmol/, successivamente mantenuti costanti durante la prova sperimentale.

### **Campioni di sangue e determinazione dei parametri ematici.**

Campioni di sangue sono stati prelevati da ogni bovina dopo la mungitura ed a digiuno dalla vena giugulare usando provette contenenti litio eparina come anticoagulante. Le provette sono state collocate immediatamente a bagno in acqua e ghiaccio fino al momento della centrifugazione. I prelievi sono stati eseguiti secondo il seguente protocollo sperimentale:

- una settimana prima dell'inizio della prova sperimentale;
- un'ora prima dell'infusione di insulina, glucosio-insulina, BOHB, soluzione fisiologica;
- un'ora prima e ad 6.5 ore dopo il challenge di LPS in mammella.

I campioni di sangue così ottenuti sono stati centrifugati a 3000 RCF per 20 minuti ed il plasma ottenuto diviso in più aliquote e conservato a -20°C fino all'arrivo presso il laboratorio dell'Istituto di Zootecnica dell'Università Cattolica di Piacenza. Su ciascun campione, con l'impiego di analizzatore automatizzato (ILAB 600, Instrumentation Laboratory, Lexington, MA) a temperatura costante di 37°C, è stata eseguita la determinazione degli indici dello stato infiammatorio: proteine positive di fase acuta: aptoglobina (g/l), ceruloplasmina ( $\mu\text{mol/l}$ ), proteine negative di fase acuta: albumine (g/l) e dei loro indici: colesterolo (mmol/l), retinolo (o vitamina A;  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ ) e alfa-tocoferolo (o vitamina E;  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ ).

Sul plasma dei campioni di sangue prelevati si è proceduto anche all'analisi quantitativa dei livelli di TNF- $\alpha$  ed IL-6 nel plasma mediante i kit Bovine TNF e IL-6 Screening Set ENDOGEN secondo metodologia ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), come riportato in appendice.

Altre analisi ematiche sono state invece effettuate nel laboratorio del Dipartimento di Fisiologia Veterinaria, presso la Facoltà Medicina Veterinaria di Berna, in Posieux. Tali determinazioni sono state eseguite secondo quanto descritto da Van Dorland e coll. (2009) ed hanno riguardato:

- glucosio, urea, trigliceridi, mediante l'impiego di kit da bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia (no. 61269, 61974, 61236 e 63212, rispettivamente);
- NEFA e BHBA con kit FA115 e RB1007, Randox Laboratories Ltd. (Ibach, Svizzera);
- GLDH (glutammate deidrogenase) , mediante kit 1192992216, F. Hoffmann-La Roche Ltd;
- Insulina, misurata mediante RIA .

### 5.3 Analisi statistica

Per l'elaborazione statistica dei risultati è stata applicata l'analisi della varianza per osservazioni ripetute con procedura MIXED del SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC, release 9.2). Il modello statistico ha incluso i fattori di classificazione fissi (distanza dal trattamento di infusione, gruppo di infusione), il fattore individuale casuale (bovina entro gruppo) e l'interazione gruppo x distanza trattamento (da infusione e/o da LPS). In particolare il modello statistico utilizzato è risultato il seguente:

$$Y_{iklm} = \mu + G_i + T_k + (G*T)_{ik} + B_l(i) + e_{iklm}$$

dove:

$Y_{iklm}$  = osservazione m-esima della 1-esima bovina  $B_l$  entro l'i-esimo gruppo  $G_i$  alla K-esima distanza dal trattamento  $T_k$ :

$\mu$  = media totale;

$G_i$  = effetto dell'i-esimo gruppo ( $i = \text{NaCl, BOHB, EuG e IpoG}$ );

$T_k$  = effetto della K-esima distanza dal trattamento, con un aumento di livelli variabile in funzione dei parametri: 5 per l'aptoglobina, la ceruloplasmina, le albumine, il colesterolo, il retinolo, il tocoferolo (-192, -1, 24, 48, 54.5 ore) e 2 per il TNF- $\alpha$  e IL-6 (48 e 54.5 ore)

$(G*T)_{ik}$  = effetto dell'interazione tra l'i-esimo gruppo e la k-esima distanza dall'inizio del trattamento;

$B_l(i)$  = effetto dell' i-esima bovina, entro l'i-esimo gruppo;

$e_{iklm}$  = effetto casuale o errore.

Con lo stesso modello è stato anche possibile valutare l'effetto conseguente al trattamento con LPS in mammella avvenuto in coincidenza del prelievo ematico a 48 ore dall'inizio delle infusioni endovenose e 6.5 ore dopo (54.5 ore da infusioni endovenose). L'analisi è stata effettuata utilizzando tre tipi di struttura di covarianza (Autoregressive Order, Compound Symmetry e Spatial Power) scelti per ogni tipo di parametro in base al loro criterio di informazione di Akaike (Littell e coll., 1998).

Le differenze sono state considerate significative per  $P < 0.05$ , mentre le tendenze sono state dichiarate per  $P < 0.10$ .

## 5.4 Risultati

### Ingestione di sostanza secca e produzione di latte

L'ingestione di sostanza secca è risultata analoga tra i 4 gruppi prima dell'inizio delle infusioni. Dopo 2 giorni di infusione, i gruppi BOHB ed EuG hanno mostrato un calo di ingestione (anche il trattamento di controllo). I gruppi BOHB e EuG ( $P < 0.05$ ) hanno mostrato un calo rispetto agli altri gruppi come già precedentemente riportato da Kreipe e coll. (2011) e da Zarrin e coll. (2011).

Nel giorno seguente il trattamento con LPS, avvenuto in concomitanza con le infusioni, a parte i gruppi IpoG ed NaCl dove non è stato possibile rilevare il dato, si è assistito ad un recupero di ingestione in tutti i gruppi.

La produzione lattea prima delle infusioni era simile entro i gruppi, ma mostrava un livello inferiore nel gruppo NaCl.

Dopo 2 giorni di infusione dei rispettivi prodotti, si è avuto un calo della produzione lattea in tutti i gruppi metabolici, ma il gruppo BOHB ( $P < 0.05$ ) ha mostrato un calo più marcato rispetto agli altri gruppi (Zarrin e coll., 2011).

Dopo LPS challenge, la produzione lattea ha subito un forte declino in tutti i gruppi, ma più marcato nei gruppi NaCl, BOHB ed EuG rispetto al gruppo IpoG (Vernay e coll., 2011 comunicazione personale).

## MEDIATORI PRO-INFIAMMATORI: CITOCHINE

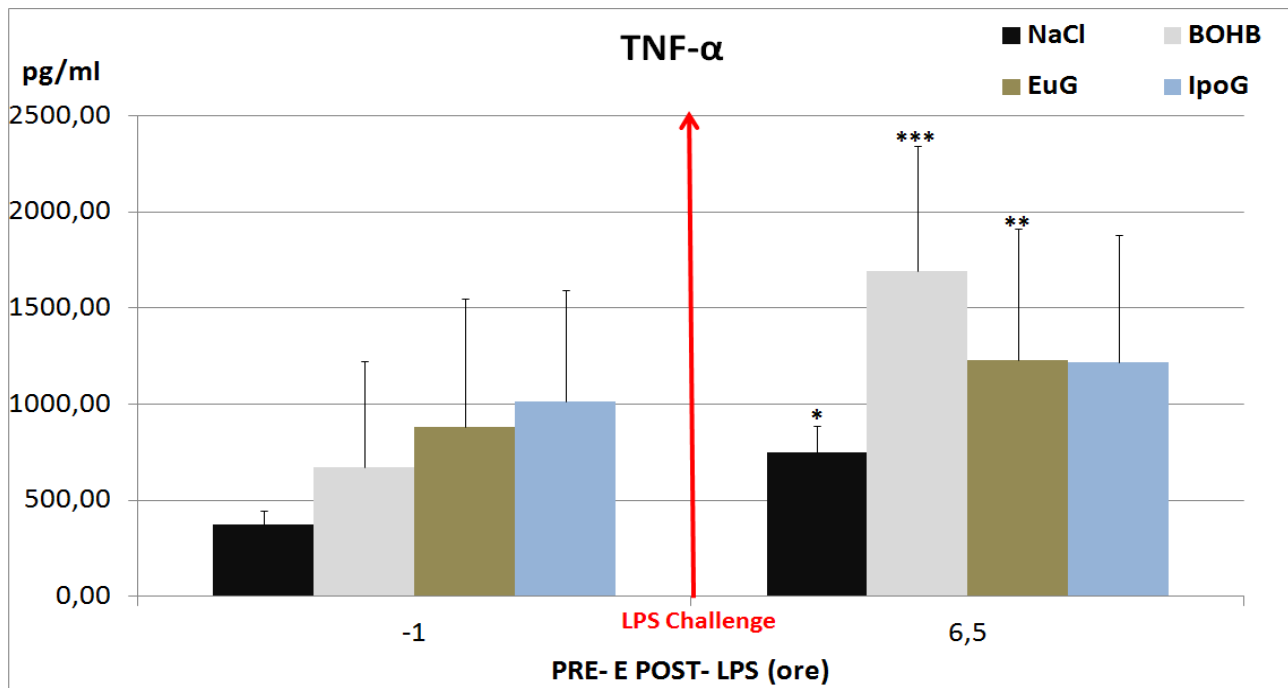
Tra le citochine sono state determinate il TNF- $\alpha$  (Fig. 5.1) e IL-6 (Fig. 5.2) e sono state valutate unicamente prima e dopo 6.5 ore da LPS challenge. Il dato pre-challenge se comparato con il dato del gruppo NaCl può essere utilizzato per valutare un possibile effetto dell'infusione eseguita. I gruppi BOHB, EuG, IpoG hanno presentato valori di TNF- $\alpha$  più alti di NaCl prima del challenge con LPS, mai comunque statisticamente significativi a causa dell'elevata variabilità di tale parametro. Inoltre, il gruppo EuG ha anche presentato livelli di IL-6 più alti di NaCl ( $P < 0.05$ ).

In seguito alla stimolazione intramammaria con LPS di E. coli, nei gruppi NaCl, BOHB ed EuG si è verificato un aumento statisticamente significativo dei livelli plasmatici di TNF- $\alpha$ , mentre differenze statisticamente significative nei livelli plasmatici dell'IL-6 sono osservati tra i gruppi NaCl ed Eug.

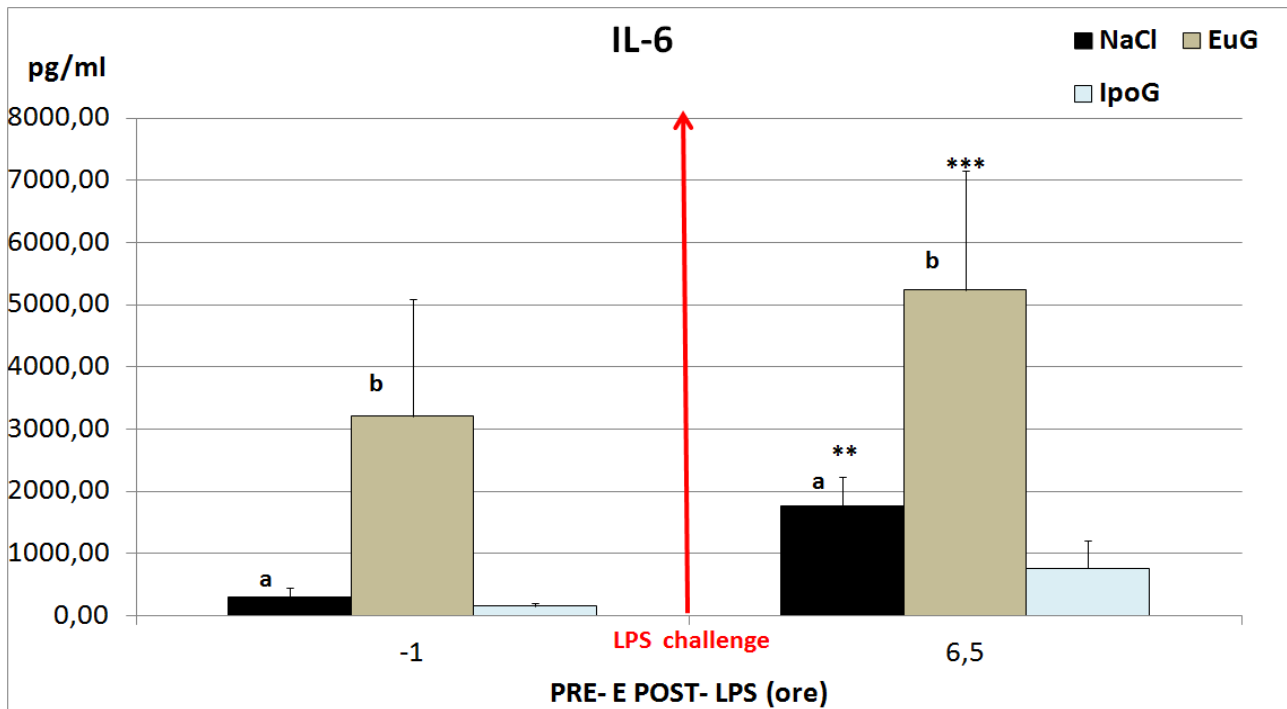
In particolare, a 6.5 ore dal LPS challenge e rispetto al dato pre-challenge si è osservato che:

- nel gruppo NaCl, il TNF- $\alpha$  e IL-6 sono aumentati in modo significativo (rispettivamente di  $P < 0.05$  e  $P < 0.01$ );
- nel gruppo BOHB, dove è stato possibile controllare solo il TNF- $\alpha$ , è stato osservato un suo incremento molto significativo ( $P < 0.001$ );
- nel gruppo EuG, sia il TNF- $\alpha$  che IL-6 sono incrementati in modo molto significativo (rispettivamente di  $P < 0.01$ ;  $P < 0.001$ );
- nel gruppo IpoG, invece, il TNF- $\alpha$  e IL-6 sono aumentate in modo non statisticamente significativo.

Per effetto di tali variazioni sono state osservate differenze significative tra i gruppi EuG e NaCl a 6.5 ore dal LPS challenge ( $P < 0.05$ ) per IL-6.



**Fig. 5.1 - Andamento (media ed errore standard) dei livelli plasmatici di TNF- $\alpha$  in quattro gruppi metabolici prima e dopo LPS “challenge” e durante infusione a lungo termine (56 ore) con soluzione fisiologica (NaCl),  $\beta$ -idrossibutirrato (BOHB), insulina e glucosio (EuG) o insulina (IpoG). Gli asterischi indicano, per ogni gruppo, la significatività dell’effetto LPS (+P<0.1, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).**



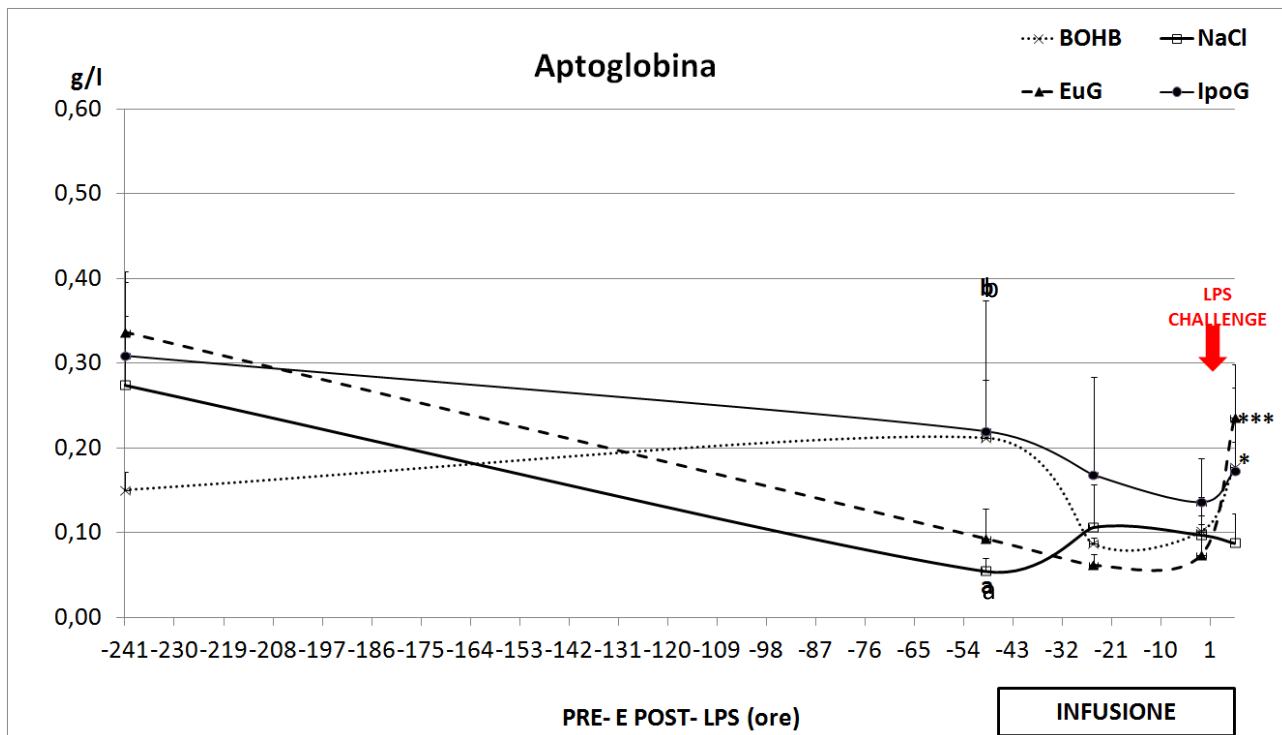
**Fig 5.2 – Andamento (media ed errore standard) dei livelli plasmatici di IL-6 in tre gruppi metabolici prima e dopo LPS “challenge” e durante infusione a lungo termine (56 ore) con soluzione fisiologica (NaCl), insulina e glucosio (EuG) o insulina (IpoG). Gli asterischi indicano, per ogni gruppo, la significatività dell’effetto LPS (+P<0.1, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001). Le lettere differenti indicano significatività rispetto al gruppo NaCl. (Dati incompleti)**

## Indici ematici dell’infiammazione

### Proteine di fase acuta positive.

Per le proteine di fase acuta positive sono state determinate: l’aptoglobina e la ceruloplasmina.

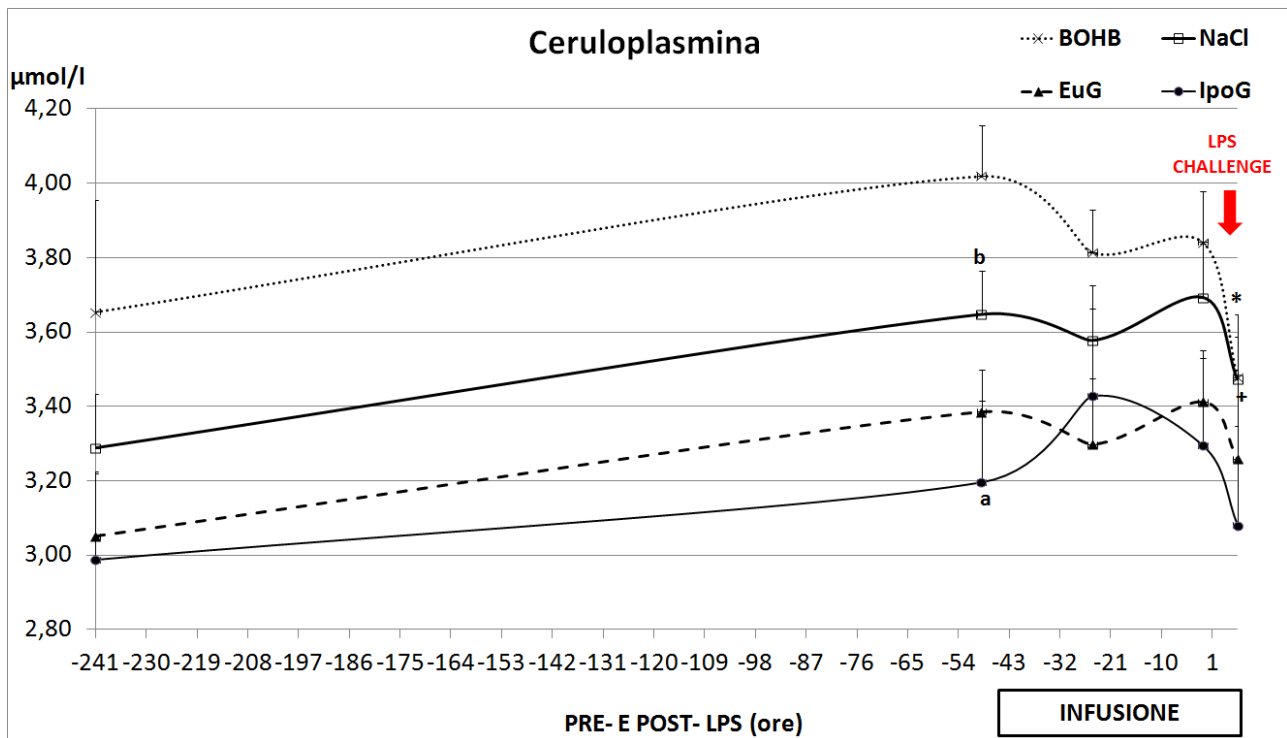
Il gruppo BOHB, rispetto agli altri gruppi, ha mostrato una concentrazione plasmatica di aptoglobina (Fig 5.3) < 0.2 g/l prima dell’infusione e del LPS challenge, ad evidenziare l’assenza di fenomeni infiammatori. Ad inizio dei trattamenti di infusione, il gruppo IpoG ha mostrato livelli leggermente più elevati rispetto al gruppo NaCl (P<0.05). Durante le infusioni il livello di aptoglobina è rimasto costante. Invece, a 6.5 ore dopo LPS challenge, l’aptoglobina è aumentata in modo statisticamente significativo solo nei gruppi BOHB (P<0.05) ed EuG (P<0.001).



**Fig. 5.3 - Andamento della concentrazione plasmatica dell'aptoglobina in tre gruppi metabolici prima e dopo LPS "challenge" e durante infusione a lungo termine (56 ore) con soluzione fisiologica (NaCl),  $\beta$ -idrossibutirrato (BOHB), insulina e glucosio (EuG) o insulina (IpoG). Gli asterischi indicano, per ogni gruppo, la significatività dell'effetto LPS (+ $P < 0.1$ , \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). Le lettere differenti indicano significatività rispetto al gruppo NaCl.**

I valori plasmatici di ceruloplasmina (Fig. 5.4) prima dell'inizio delle infusioni sono risultati essere in lieve aumento in tutti i gruppi, ma più bassi nei gruppi IpoG ed EuG sia rispetto ad NaCl che BOHB. Le differenze sono statisticamente significative pre-infusione in IpoG rispetto a NaCl ( $P < 0.05$ ). Dopo 48 ore dall'infusione, le concentrazioni plasmatiche di ceruloplasmina sono diminuite in tutti i gruppi, eccetto in IpoG, ma comunque in modo non significativo. Dopo 6.5 ore da LPS challenge, tutti i gruppi hanno mostrato un calo di tale parametro, che è risultato essere significativo solo nel gruppo BOHB ( $P < 0.05$ ) e tendente alla significatività in NaCl ( $P < 0.10$ ).





**Fig. 5.4 - Andamento della concentrazione plasmatica della ceruloplasmina in tre gruppi metabolici prima e dopo LPS “challenge” e durante infusione a lungo termine (56 ore) con soluzione fisiologica (NaCl),  $\beta$ -idrossibutirrato (BOHB), insulina e glucosio (EuG) o insulina (IpoG). Gli asterischi indicano, per ogni gruppo, la significatività dell’effetto LPS (+P<0.1, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001). Le lettere differenti indicano differenza significativa rispetto al gruppo NaCl.**

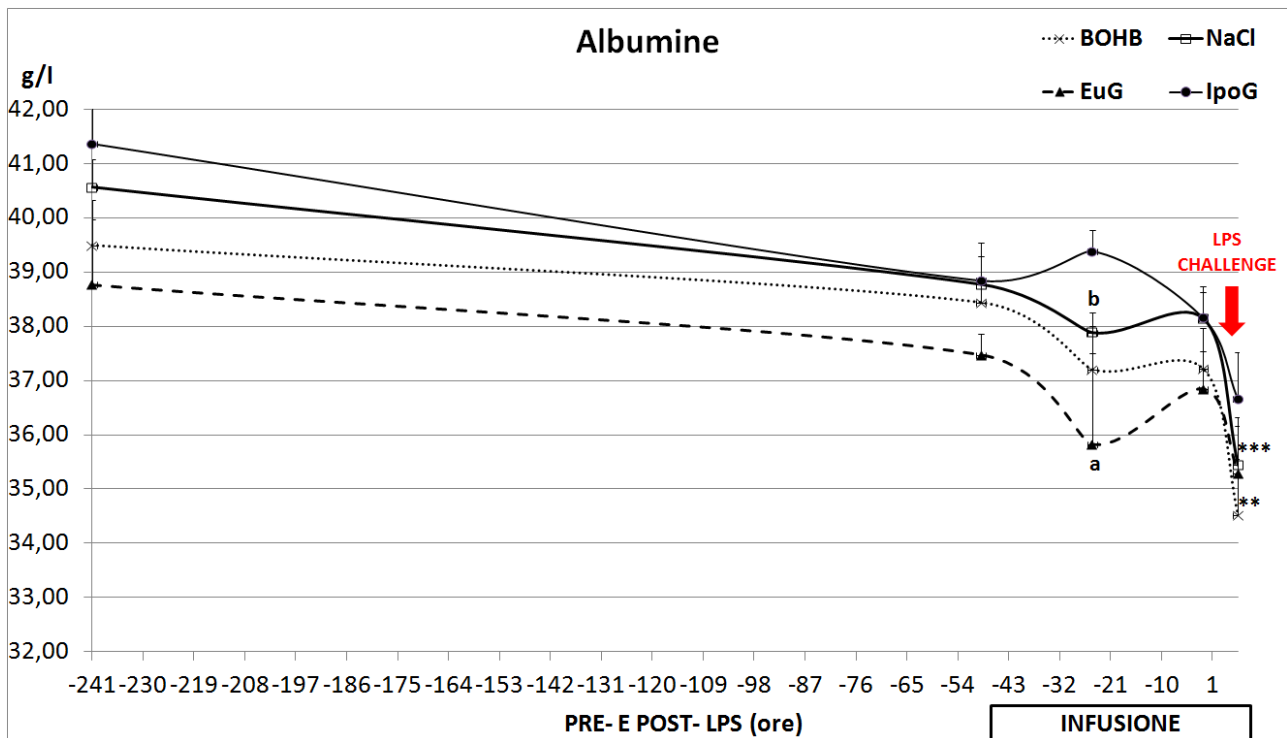
### Proteine negative di fase acuta

Per le proteine negative di fase acuta sono state determinate: l'albumine e le lipoproteine (colesterolo).

In tale capitolo sono anche incluse le vitamine A (retinolo) ed E (alfa-tocoferolo), le cui variazioni plasmatiche sono pure condizionate da fatti infiammatori, in quanto i livelli dei loro carrier, Retinol Binding Protein per la vitamina A e le lipoproteine per la vitamina E, sono ridotti dalla presenza di fatti infiammatori (Trevisi e Bertoni, 2008).

### **ALBUMINE**

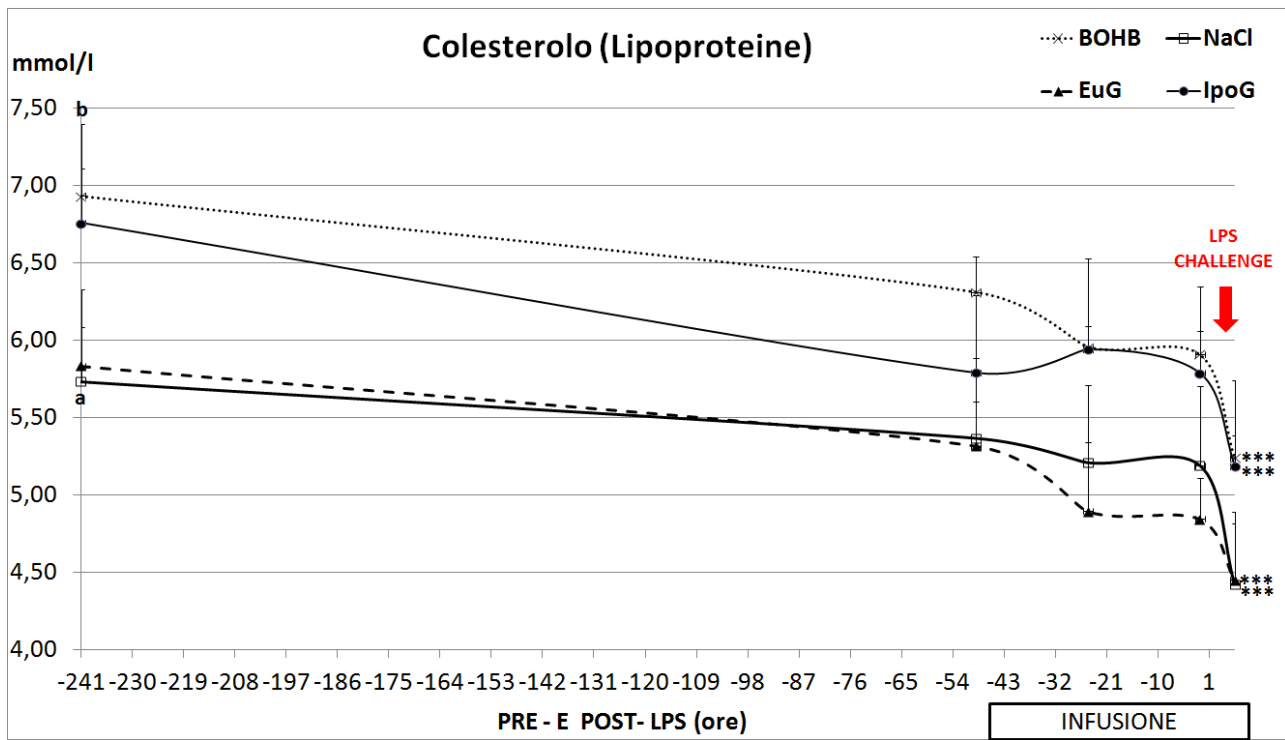
I livelli plasmatici delle albumine (Fig. 5.5) prima delle infusioni endovenose sono risultati in lieve calo e numericamente più bassi nel gruppo EuG rispetto agli altri gruppi (NS). Durante le infusioni, i livelli plasmatici dell'albumina sono risultati più o meno costanti nei 4 gruppi, tuttavia differenze significative sono state osservate tra il gruppo EuG rispetto ad NaCl a 24 ore dopo l'inizio delle infusioni ( $P < 0.05$ ). Dopo LPS challenge, in tutti i gruppi si è avuto un calo dei livelli di albumina. La riduzione è risultata essere statisticamente significativa nei gruppi NaCl ( $P < 0.001$ ) e BOHB ( $P < 0.01$ ).



**Fig. 5.5 - Andamento della concentrazione plasmatica della albumine in tre gruppi metabolici prima e dopo LPS “challenge” e durante infusione a lungo termine (56 ore) con soluzione fisiologica (NaCl),  $\beta$ -idrossibutirrato (BOHB), insulina e glucosio (EuG) o insulina (IpoG). Gli asterischi indicano, per ogni gruppo, la significatività dell’effetto LPS (+P<0.1, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001). Le lettere differenti indicano differenza significativa rispetto al gruppo NaCl.**

## COLESTEROLO

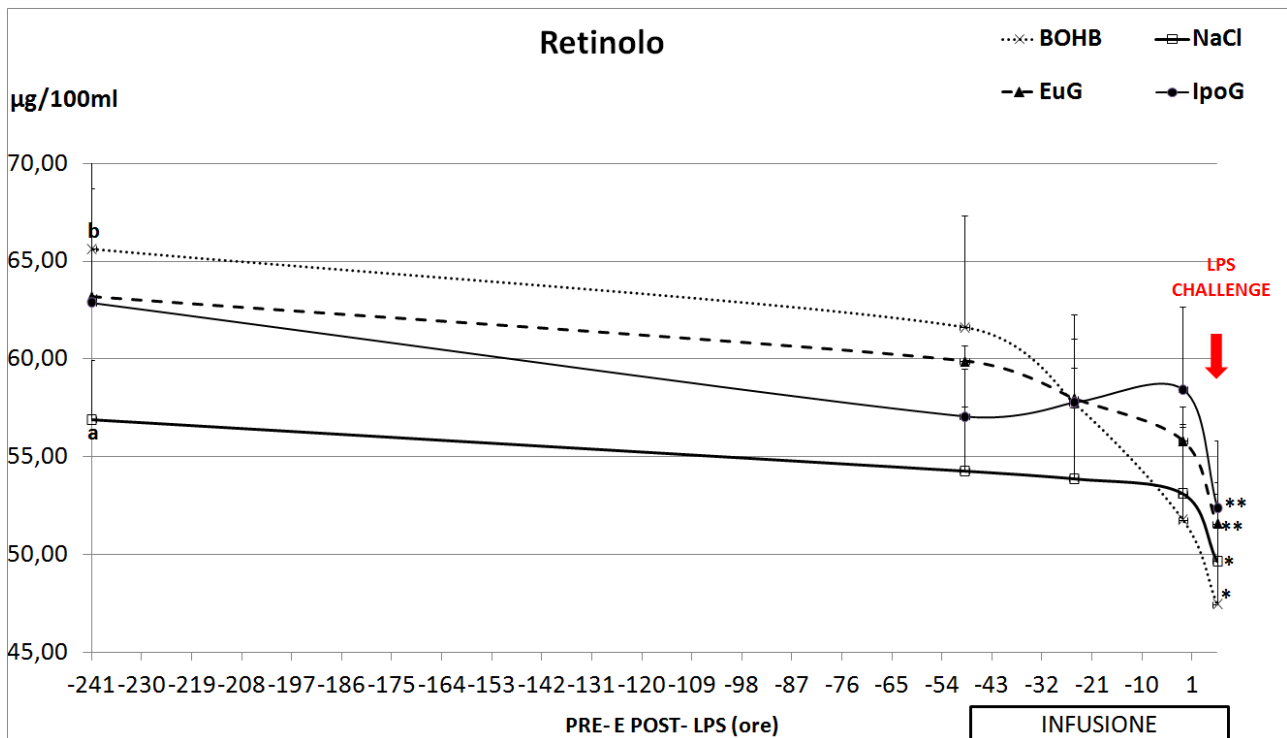
Il colesterolo (indice indiretto per la misurazione delle lipoproteine; Fig. 5.6), ha presentato come le albumine una lieve diminuzione prima delle infusioni in tutti i gruppi. Inoltre, il livello prima dei trattamenti è risultato più elevato in BOHB (P<0.05) rispetto ad NaCl. Dopo 48 ore di infusione vi è stato un calo nei livelli plasmatici di colesterolo in EuG (P<0.10). Invece, dopo LPS challenge, tutti i gruppi hanno avuto un calo significativo nei livelli plasmatici del colesterolo (P<0.001).



**Fig. 5.6 - Andamento della concentrazione plasmatica del colesterolo (indice delle lipoproteine) in tre gruppi metabolici prima e dopo LPS “challenge” e durante infusione a lungo termine (56 ore) con soluzione fisiologica (NaCl),  $\beta$ -idrossibutirrato (BOHB), insulina e glucosio (EuG) o insulina (IpoG). Gli asterischi indicano, per ogni gruppo, la significatività dell’effetto LPS (+P<0.1, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001). Lettere differenti indicano differenza significativa rispetto al gruppo NaCl.**

## RETINOLO

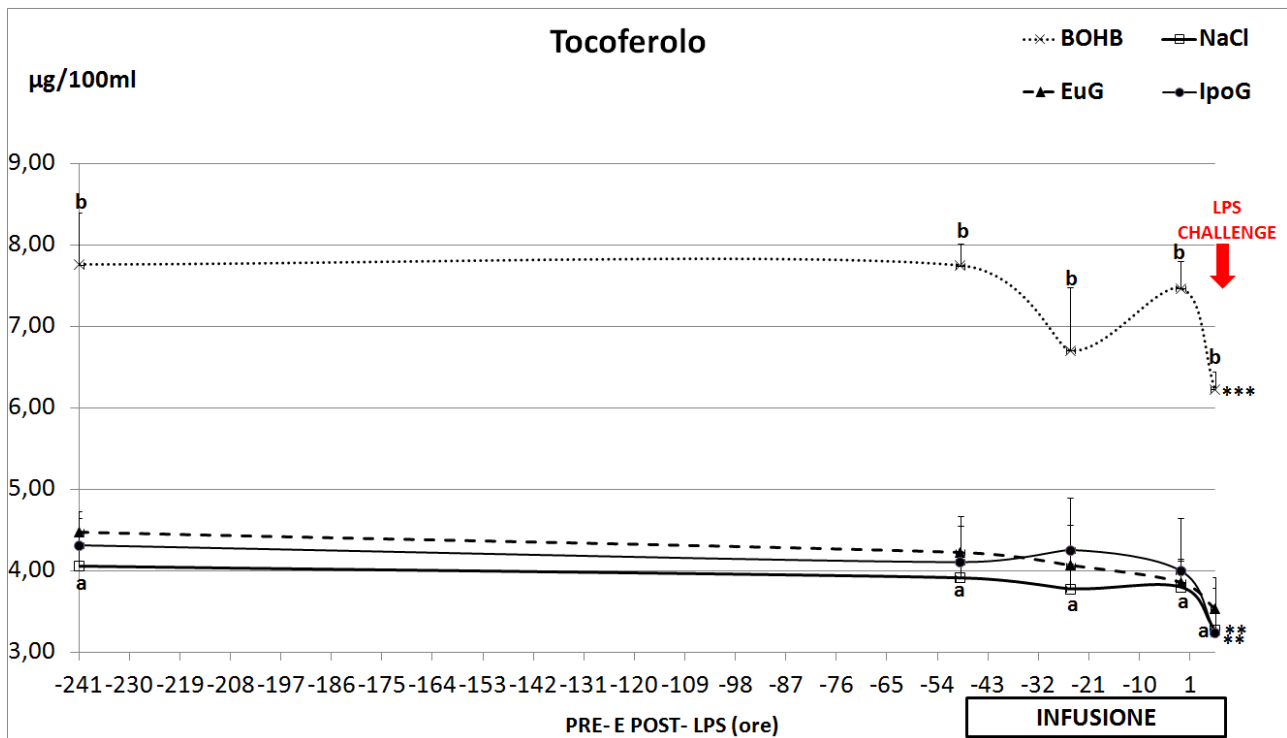
Il retinolo (Fig.5.7) ha mostrato un andamento analogo a quello delle albumine e del colesterolo prima dell’inizio dell’infusione in tutti i gruppi, evidenziando un lieve calo durante tale periodo. Differenze significative del livello di retinolo sono state osservate tra il gruppo BOHB e NaCl (P<0.05). Ma anche in EuG e IpoG il livello plasmatico di retinolo è risultato più alto di quello del gruppo NaCl. Dopo 48 ore dall’infusione vi è stato un calo statisticamente significativo dei livelli plasmatici di retinolo solo nel gruppo BOHB (P<0.05). Invece a 6.5 ore dopo l’LPS challenge, si è avuto un calo significativo in tutti i gruppi (NaCl e BOHB; P<0.05 e Eug, IpoG; P<0.01).



**Fig. 5.7 - Andamento della concentrazione plasmatica del retinolo in tre gruppi metabolici prima e dopo LPS “challenge” e durante infusione a lungo termine (56 ore) con soluzione fisiologica (NaCl), β-idrossibutirrato (BOHB), insulina e glucosio (EuG) o insulina (IpoG). Gli asterischi indicano, per ogni gruppo, la significatività dell’effetto LPS (+ $P<0.1$ , \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ). Lettere differenti indicano differenza significativa rispetto al gruppo NaCl.**

## TOCOFEROLO

Il tocoferolo (Fig. 5.8) è rimasto costante in tutti i gruppi prima dell’infusione. Tuttavia i livelli in BOHB sono risultati più elevati, sia rispetto al gruppo NaCl ( $P<0.05$ ) che agli altri due (EuG e IpoG). Dopo 48 ore dall’inizio dell’infusione, il tocoferolo è rimasto pressochè invariato in tutti i gruppi, invece dopo 6.5 ore da LPS challenge, si è avuto un calo in tutti i gruppi metabolici. Questa riduzione è significativa solo nei gruppi NaCl e IpoG ( $P<0.01$ ) e BOHB ( $P<0.001$ ).



**Fig. 5.8 - Andamento della concentrazione plasmatica del tocoferolo in tre gruppi metabolici prima e dopo LPS “challenge” e durante infusione a lungo termine (56 ore) con soluzione fisiologica (NaCl), β-idrossibutirrato (BOHB), insulina e glucosio (EuG) o insulina (IpoG). Gli asterischi indicano, per ogni gruppo, la significatività dell’effetto LPS (+P<0.1, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001). Le lettere differenti indicano differenza significativa rispetto al gruppo NaCl**

## INDICI DELLO STATO ENERGETICO

Gli indici dello stato energetico sono stati determinati dal gruppo di ricerca Svizzero ed in parte pubblicati da Kreipe e coll. (2011) per cui sono riportati solo in modo sintetico.

Prima dell'inizio delle infusioni, il glucosio è risultato pressochè costante in tutti i gruppi, tuttavia il gruppo IpoG presentava livelli plasmatici più bassi rispetto agli altri gruppi metabolici. Mentre, l'insulina era elevata in IpoG ed EuG. A 48 ore dall'inizio delle infusioni, i livelli di glicemia sono diminuiti nei gruppi BOHB, EuG ed IpoG, mentre sono leggermente aumentati nel gruppo NaCl. Dopo 6.5 ore da LPS challenge i livelli di glucosio sono aumentati nei gruppi IpoG ed EuG, mentre sono diminuiti, anche se lievemente, nei gruppi NaCl e BOHB.

Prima dell'inizio dell'infusione, i livelli di NEFA, BOHB ed urea erano analoghi tra i gruppi. Dopo 48 ore dall'infusione, i livelli di NEFA sono diminuiti in EuG, IpoG ed BOHB, mentre nel gruppo NaCl non hanno subito alcuna variazione per effetto dell'infusione. I livelli di BOHB sono aumentati in tutti i gruppi, ma eccetto nel gruppo EuG in cui sono diminuiti in modo significativo ( $P < 0.05$ ). Infine i livelli di urea sono diminuiti in tutti i gruppi ma in modo statisticamente significativo nei gruppi IpoG e NaCl ( $P < 0.05$ , rispettivamente). Dopo 6.5 ore dal LPS challenge i livelli di NEFA sono fortemente calati in tutti i gruppi, mentre i livelli plasmatici di BOHB sono aumentati nei gruppi BOHB e IpoG, mentre sono diminuiti nei gruppi NaCl ed EuG. Infine, i livelli di urea sono aumentati in tutti i gruppi.

## 5.5 Discussione

### EFFETTO DELLO STRESS METABOLICO SUGLI INDICI EMATICI DELL'INFIAMMAZIONE

Generalmente tutte le bovine in fase di lattazione subiscono una combinazione di insulti (es. stress, bilancio energetico negativo, immunosoppressione, traumi) che possono promuovere l'infiammazione (Sordillo e coll., 2009) ed indurre un cambiamento sia nel metabolismo che nel sistema immunitario con conseguente comparsa di malattie metaboliche (chetosi) ed infettive (mastiti) in fase di lattazione (Leblanc e coll., 2004).

Il gruppo euglicemico (gruppo EuG) ha inteso indagare le possibili conseguenze di uno stato di insulino-resistenza, anche se va precisato che nel nostro modello sono mantenuti a livelli sopra-fisiologici glucosio ed insulina, ma mancano le cause che normalmente inducono tale situazione (es. grave fenomeno infiammatorio con rilascio di TNF- $\alpha$ ). Ad ogni modo, per effetto dell'infusione contemporanea di insulina e glucosio per 48 ore, i livelli dell'aptoglobina e della ceruloplasmina sono rimasti pressoché invariati, mentre vi è stato un calo delle proteine negative di fase acuta, ma significativo solo per il colesterolo (a 24 e 48 ore di infusione) e le albumine (a 24 ore di infusione). Il gruppo ipoglicemico (gruppo IpoG) dopo 48 ore di infusione con solo insulina, ha mostrato solo modificazioni non statisticamente significative: lieve calo dell'aptoglobina e leggero aumento della ceruloplasmina (le albumine, il colesterolo, il retinolo e il tocoferolo sono risultati invariati o in leggero aumento), mentre la glicemia e l'urea sono apparsi nettamente ridotti. Il gruppo iperchetonemico (gruppo BOHB), oltre all'ovvio e marcato aumento dei corpi chetonici, ha presentato una lieve (NS) riduzione nei livelli plasmatici delle proteine positive (aptoglobina e ceruloplasmina), ed un calo delle proteine negative di fase acuta, statisticamente significativo per albumine, colesterolo e vitamina A. Inoltre, ha mostrato anche livelli di glicemia più bassi ed un calo netto di uremia (Zarrin e coll., 2011, comunicazione personale). Questi risultati sono in accordo con lavori in cui è stato visto che un aumento di BOHB induce bassi livelli di vitamina E ( $P < 0.01$ ), delle albumine ( $P < 0.01$ ) e di colesterolo ( $P < 0.01$ ), ma innalzate concentrazioni sieriche di bilirubina totale ( $P < 0.01$ ) in bovine affette da steatosi epatica, malattia caratterizzata da bilancio energetico negativo ed incrementata lipomobilizzazione, rispetto ai soggetti controllo (Mudron e coll., 1999). Da notare tuttavia che il confronto non è agevole poiché in quest'ultimo lavoro il BOHB era innalzato (1.5 mmol/l) anche nel gruppo controllo trattandosi di animali nel puerperio. Infine, il gruppo controllo che dopo 48 ore di infusione con una soluzione salina allo 0.9%, ha



mostrato un leggero aumento delle proteine positive di fase acuta e del glucosio, mentre sono stati osservati livelli invariati delle proteine negative di fase acuta, di tocoferolo e di retinolo.

Nel loro complesso, trascurando le variazioni più o meno rilevanti dei parametri metabolici direttamente (glucosio, BOHB) od indirettamente (urea) coinvolti con le infusioni, risulta interessante:

- il fatto che l'aumento assai consistente (circa 2-3 volte) del BOHB ha portato ad un risultato sorprendente, cioè al calo più o meno evidente di proteine di fase acuta, sia le positive che le negative (come se vi fosse una riduzione delle sintesi di proteine epatiche);
- il fatto che la contemporanea presenza di valori relativamente elevati di glucosio ed insulina (ma considerarlo sovrapponibile ad insulina-resistenza pare azzardato) comporti un certo calo di proteine negative di fase acuta, mentre quelle positive sono pressoché invariate.

Mentre in merito all'infusione di BOHB non abbiamo dati bibliografici da comparare, la situazione EuG potrebbe essere assimilata ai casi, nell'uomo, del consumo di diete d alto contenuto glicemico che paiono indurre processi infiammatori e stress ossidativo da cui malattie cardiovascolari e diabete di tipo 2 (Dickinson e coll., 2008). Da notare al riguardo che, mentre il TNF- $\alpha$  è aumentato per effetto dell'infusione in EuG, IpoG e BOHB, l'IL-6 è aumentata e notevolmente solo in EuG. Questo confermerebbe, come detto più sopra, che solo in condizioni di "insulino-resistenza" si verifica una accentuazione della risposta infiammatoria in presenza di un qualsiasi evento che la induce.

## CONSEGUENZE DEL LPS CHALLENGE IN MAMMELLA IN BOVINE SOTTOPOSTE A 48 ORE DI INFUSIONE

LPS (lipopolisaccaride) è una molecola pro-infiammatoria ed è considerato essere il fattore scatenante la risposta di fase acuta nelle mastiti da E. coli (Burvenich e coll., 2003). Infatti, induce il rilascio di citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) che sono importanti mediatori pro-infiammatori durante le mastiti indotte da endotossina (Barber and Yang, 1998; Taylor e coll., 1997; Shurster e coll., 1993). Ideale quindi il suo impiego per accertare le conseguenze delle alterazioni metaboliche sulla risposta infiammatoria.

A circa 48 ore dall'inizio dell'infusione è stato effettuato l'LPS challenge nei suddetti gruppi di trattamento ed a 6.5 ore dall'inizio del LPS challenge sono state osservate le variazioni plasmatiche dei mediatori pro-infiammatori (TNF- $\alpha$  e IL-6), degli indici dello stato infiammatorio (proteine positive e negative di fase acuta) e degli indici del metabolismo energetico. In particolare, il gruppo

controllo (gruppo NaCl), a 6.5 ore da LPS challenge ha mostrato: un aumento significativo delle citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$  e IL-6), ma è stato osservato un calo di ceruloplasmina (APP positiva), delle proteine negative di fase acuta (APPs negative), come denotato anche dal calo delle vitamine A ed E, nonché degli indici dello stato energetico (NEFA, BOHB). Sensibile è anche la perdita della produzione di latte e dell'ingestione di sostanza secca, mentre l'urea aumenta.

Il gruppo iperchetonemico (gruppo BOHB), a 6.5 ore da LPS challenge ha mostrato un aumento particolarmente marcato del TNF- $\alpha$  ( $P < 0.01$ ), dell'aptoglobina ( $P < 0.05$ ), dei corpi chetonici (BOHB) e dell'urea. Mentre c'è stato un calo più o meno sensibile della ceruloplasmina (APP positiva) e statisticamente significativo delle proteine negative di fase acuta (albumine) e dei loro indici quali colesterolo, vitamine A ed E, dei livelli di glicemia, dei NEFA e della produzione lattea. Il gruppo euglicemico (gruppo EuG) ha mostrato un sensibile aumento delle citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$   $P < 0.01$  e IL6  $P < 0.001$ ) e dell'urea, mentre piuttosto importante è stato quello dell'aptoglobina ( $P < 0.001$ ) e del glucosio. Per contro, un certo calo, statisticamente significativo, vi è stato per le proteine negative di fase acuta (albumine) ed i loro indici colesterolo, vitamine A ( $P < 0.01$ ) ed E, così come degli indici dello stato energetico (NEFA e BOHB) e della produzione lattea.

Il gruppo ipoglicemico (gruppo IpoG) ha mostrato un certo aumento delle citochine (non significativo), lieve aumento dell'aptoglobina, della glicemia, del BOHB e dell'urea, mentre c'è stato un certo calo della ceruloplasmina, delle proteine negative di fase acuta (albumine) o dei loro indici colesterolo ( $P < 0.01$ ), vitamine A ed E ( $P < 0.01$ ), dei NEFA ed infine della produzione lattea. Una prima rilevante differenza nella risposta (infiammatoria) al trattamento con LPS si nota fra i gruppi EuG ed IpoG, tale risposta è molto marcata nel primo gruppo e modesta nel secondo. Poiché la differenza principale fra i due gruppi è il livello di glucosio, l'ipotesi più ragionevole è che la nota attivazione del NF- $\kappa$ B ed anche di altri mediatori infiammatori, come ICAM-1, MPC-1 ecc. (Dandona, 2001; Alajada e coll., 2000), richieda la contemporanea elevata presenza di insulina e glucosio come è stato osservato nelle persone diabetiche (Angelika e coll., 2001).

L'incremento delle citochine pro-infiammatorie comunque osservato a circa 6 ore dal trattamento con LPS challenge risulta essere in accordo anche con una serie di studi effettuati sia nei mammiferi che in altre specie. Blum e coll. (2000) nei loro studi condotti in bovine sottoposte a tre diversi tipi di mastite, hanno osservato che le concentrazioni plasmatiche di TNF- $\alpha$  raggiungevano il picco a 6 ore dopo LPS challenge in mammella. In uno studio in cui vengono esaminati i livelli di TNF- $\alpha$  ed IL-1 $\beta$  in bovine adulte dopo somministrazione intravenosa di LPS estratto da E. coli è stato riscontrato un aumento significativo del TNF- $\alpha$  da 0.5 minuti fino a 6 ore dopo LPS challenge,

raggiungendo il picco a 2 ore dal trattamento. In seguito i livelli di questo mediatore raggiungevano valori fisiologici a 12 ore da LPS challenge. Inoltre, tutte le bovine trattate con LPS mostravano uno stato di depressione sensoriale da 24 a 96 ore (Ohtsuka e coll., 1997). In un altro studio condotto nei polli inoculati con LPS di *E. coli*, l'IL-6 aumentava da 1 ora a 2 giorni e risultava essere elevata a 3 ore dopo LPS challenge, da 4 a 14 giorni risultava essere bassa, mentre nel gruppo controllo, al quale è stata somministrata una soluzione salina, tale mediatore mostrava un lieve incremento da un'ora a 6 ore dopo LPS challenge (Nakamura e coll., 1997). Infine, Wang e coll. (2006) nelle scrofe lattanti sottoposte ad infusione intramammaria con LPS hanno osservato un aumento dei livelli sierici di IL-6 e TNF- $\alpha$  da 3 a 7 ore, e raggiungevano il picco a 3 ore, dopo di che ritornavano a valori fisiologici a 12 ore dopo LPS challenge, rispetto al gruppo controllo. Per quanto concerne la risposta di fase acuta al LPS challenge, Hiss e coll. (2004), in bovine da latte sottoposte ad infusione intracisternale con LPS in un quarto mammario, hanno osservato un incremento nei livelli sierici dell'aptoglobina solo a 9 ore dopo il trattamento. Mentre, Bertoni e coll. (2003) in uno studio condotto su bovine da latte sottoposte a due iniezioni di endotossina (LPS) al terzo giorno dopo il parto, hanno dimostrato un incremento evidente dell'aptoglobina solo dopo 24 ore da LPS challenge. Tali studi indurrebbero a pensare che i bassi incrementi delle proteine positive di fase acuta osservate nei quattro gruppi di trattamento siano dovuti al tempo troppo breve fra challenge e prelievo ematico.

Tra gli effetti indotti da LPS challenge ci sono anche il calo di produzione latte, cambiamenti nei livelli plasmatici di alcuni indici dello stato energetico e delle vitamine che peraltro sono indice di proteine negative di fase acuta. A questo riguardo, è importante la conferma di un loro maggiore coinvolgimento nel gruppo EuG ad indicare una risposta infiammatoria più intensa. Da notare che Waldron e coll. (2003) nei loro studi condotti in bovine in fase di lattazione sottoposte a 4 differenti dosi di LPS mediante infusione giugulare, hanno osservato un calo della produzione latte e dell'ingestione di sostanza secca fino a 24 ore dopo LPS. Una ulteriore importante differenza da evidenziare riguarda la risposta del gruppo BOHB nel quale si è verificato un calo maggiore della produzione latte rispetto agli altri gruppi. Il risultato potrebbe trovare giustificazione nel forte calo di ingestione di sostanza secca prima del LPS challenge, mentre va notato che il TNF- $\alpha$  è aumentato in questo gruppo in misura molto maggiore dopo LPS (per le proteine di fase acuta i risultati sono meno chiari). In tutti i gruppi trattamento si è verificato anche un calo statisticamente significativo delle vitamine E ed A dopo LPS challenge, ciò è da noi interpretato come frutto di calo delle proteine vettrici, tuttavia in accordo con Rezamand e coll. (2007), il trattamento con LPS potrebbe influire anche sulla capacità antiossidante delle bovine.

## CONCLUSIONI

Dall'analisi di questi risultati emerge che l'induzione di uno stress metabolico suscita verosimilmente una certa risposta infiammatoria testimoniata da un aumento – comunque non significativo nel tempo di infusione previsto nella ricerca - di citochine e proteine positive di fase acuta e da un calo (significativo solo in alcuni casi) delle proteine negative di fase acuta dopo 48 dall'inizio dell'infusione. Per contro, dopo 48 ore di infusione, i gruppi EuG e BOHB hanno mostrato un calo significativo degli indici delle proteine negative di fase acuta (colesterolo e albumine in EuG e colosterolo, vitamina A ed E in BOHB). Tali risultati sono di indubbio interesse, ma sono necessari ulteriori studi in particolare per investigare l'effetto di tali condizioni in un periodo di infusione più lungo.

Il trattamento mammario con LPS ha causato una tipica risposta di fase acuta caratterizzata dal rilascio di citochine pro-infiammatorie, da un aumento delle proteine positive di fase acuta e da una riduzione di quelle negative ed ha influenzato negativamente la produzione lattea in tutti i gruppi metabolici. Tuttavia, il gruppo IpoG mostrerebbe una bassa risposta allo stimolo infiammatorio in quanto è l'unico gruppo metabolico in cui non c'è stato un incremento significativo dell'IL-6 ed del TNF- $\alpha$  al contrario del gruppo EuG; ne consegue che alti livelli di glucosio ed insulina, oltre ad indurre infiammazione, accrescerebbero la risposta di altre cause infiammatorie.

## CONSIDERAZIONI FINALI

La fase di transizione rappresenta spesso un'esperienza traumatica per la bovina da latte, da queste ricerche si conferma infatti che ciò può accadere anche in assenza di sintomi clinici evidenti, quando si verificano fenomeni infiammatori di una certa severità. In tutte le bovine a cavallo del parto si osserva l'attivazione della risposta infiammatoria con un aumento delle proteine positive di fase acuta (aptoglobina e ceruloplasmina) ed un calo delle proteine negative di fase acuta (albumine e lipoproteine), ma questi indici – presi singolarmente - non sono in grado di spiegare in tutti i casi la severità dei fatti infiammatori. Per tali ragioni, il nostro tentativo è stato di chiarire al meglio il comportamento in questa fase di mediatori assai noti (citochine), e meno noti (lipossine e reselvine), del processo infiammatorio. Inoltre si è valutata la possibilità di differenziare i soggetti nell'immediato post-parto in base al grado (severità) di risposta infiammatoria e poter individuare precocemente quelli a maggiore rischio da questo punto di vista. Per raggiungere tali finalità è stata focalizzata l'attenzione su alcuni indicatori utili a valutare i meccanismi pro-infiammatori ed anti-infiammatori che caratterizzano il processo, unitamente al calcolo di un nuovo indice costituito da più proteine di fase acuta.

I risultati ottenuti dai nostri studi suggeriscono che durante la fase di transizione è possibile individuare i soggetti che mostrano una maggiore suscettibilità ai fatti infiammatori scaturiti da una serie di eventi, spesso non facilmente identificabili ed asintomatici, sia mediante la determinazione di alcuni mediatori pro-infiammatori (TNF- $\alpha$ , IL-6 ed IL-1 $\beta$ ) che di mediatori endogeni anti-infiammatori (lipossine A4), che attraverso un indice complesso denominato PICE (Processi infiammatori e delle conseguenze epatiche) che valuta contemporaneamente la gravità dei processi infiammatori al parto (massimo aumento dell'aptoglobina) e le conseguenze a livello epatico (minimo livello di bilirubina e colesterolo) nei primi 10 giorni di lattazione.

In particolare, l'indice PICE ha permesso di differenziare i soggetti con la risposta infiammatoria più "severa" intorno al parto (terzile peggiore), ovvero caratterizzati da aumento delle APPs positive più marcato e da recupero delle APPs negative più lento. Di un certo rilievo ci è parso il fatto che i soggetti con il peggior indice PICE siano stati quelli con i più alti livelli plasmatici della lipossina A4 (LXA4), un mediatore endogeno anti-infiammatorio. Questo fatto suggerisce che l'aumento dei mediatori anti-infiammatori si verifica a posteriori rispetto a fatti infiammatori; pertanto, loro bassi valori nel post-parto potrebbero indicare una risposta meno severa. È pure interessante la constatazione che i soggetti con basso PICE e alta LXA4 nel post- parto – quindi sottoposti a processi infiammatori più severi - abbiano mostrato già prima del parto valori di

lipossina più alti, ciò potrebbe indicare che i soggetti più suscettibili all'inflammazione, presentavano tale fenomeno già in precedenza.

Alla luce di quanto è emerso da questi risultati risulta necessario ampliare le conoscenze sul ruolo svolto dai mediatori endogeni anti-infiammatori. Comunque, il loro uso ed ancor più quello di PICE, appare uno strumento di rilievo per distinguere i soggetti più suscettibili all'inflammazione che avranno bisogno di maggiori cure ed attenzioni da parte dell'allevatore al fine di prevenire la comparsa di ulteriori patologie più gravi, ma anche per attenuare le conseguenze dei processi in atto e così conseguire migliori performance produttive e riproduttive.

Un ulteriore obiettivo di questa ricerca ha riguardato lo studio dei cambiamenti metabolici che avvengono durante le fasi iniziali della lattazione al fine di capire quale stress metabolico tipico della transizione ed indotto sperimentalmente (infusione di glucosio, insulina e beta-idrossibutirrato), sia in grado di condizionare la risposta di fase acuta in presenza della stimolazione intramammaria con LPS di E. coli. I nostri risultati suggeriscono che l'induzione sperimentale di uno stress metabolico di per sé non comporta se non una bassa risposta di fase acuta. Tuttavia, tenuto anche conto dei tempi assai brevi, l'interesse è notevole poiché l'iperchetonemia parrebbe comunque indurre un calo generalizzato delle sintesi proteiche del fegato (sia APPs positive che APPs negative); viceversa, l'infusione di glucosio ed insulina – simulazione degli stati di eccesso energetico o di resistenza insulinica – pare indurre la riduzione delle APPs negative, senza modificare le APPs positive. Pure interessante appare poi il fatto che, dopo l'infusione intramammaria con LPS, la chetosi subclinica e l'insulino-resistenza (ovvero, contemporaneamente alte glicemia ed insulinemia) sono le condizioni che hanno determinato la risposta di fase acuta più severa.

Benchè tali dati appaiano molto interessanti, emerge la necessità di eseguire ulteriori studi, in cui possa essere indagato più a lungo l'effetto del trattamento con metaboliti prima e LPS poi; ciò al fine di meglio comprendere la relazione esistente tra i vari stress metabolici, l'inflammazione e la comparsa – sia pre- che post-parto – di malattie metaboliche ed infettive nella bovina da latte.

## APPENDICE

### Analisi chimica del sangue

Ad eccezione della determinazione dell'ematocrito, effettuata subito dopo il prelievo su una piccola aliquota di sangue in toto, utilizzando un'apposita centrifuga (ALC 4203, Cologno Monzese, Italia), la maggior parte delle analisi ematiche è stata effettuata sul plasma utilizzando un analizzatore automatico (ILAB 600 della Instrumentation Laboratory, MA, USA). Il principio delle diverse metodiche è di seguito riportato:

Ematocrito (L/L): ottenuto per la valutazione del volume occupato dagli eritrociti sul volume totale dopo centrifugazione del sangue in micro capillari.

Glucosio (mmol/L): kit IL (Instrumental Laboratory) determinazione enzimatica con ossidasi (Glucosio Ossidasi (GOD) e Perossidasi (POD). L'azione della glucosio ossidasi, catalizza l'ossidazione del glucosio ad acido gluconico e  $H_2O_2$ . La perossidasi catalizza la reazione di due molecole di  $H_2O_2$  con una di fenolo ed una di 4-aminoantipirina a chinoneimina (colorante rosso) e 4 molecole di  $H_2O$ . la formazione del colorante ed il conseguente aumento di assorbanza registrato a 510 nm è proporzionale alla concentrazione di glucosio presente nel campione. La metodica prevede l'impiego di 9  $\mu$ l di plasma cui vengono aggiunti 150  $\mu$ l di reattivo (GOD, POD, 4-aminoantipirina, fenolo) e 75  $\mu$ l di  $H_2O$  e dopo 50 secondi si effettuano le letture a 510 e 600 nm (quest'ultima lettura è paragonabile al bianco campione). La differenza fra le letture è linearmente correlata alla concentrazione di glucosio. Lo strumento è calibrato mediante l'impiego di un pool di plasma bovino a tenore noto di glucosio.

Acidi grassi non esterificati (NEFA) [mmol/l]: kit della WAKO enzimatico-colorimetrico. Dalla reazione, catalizzata dalla Acil-CoA sintetasi (ACS), tra acidi grassi non esterificati del plasma e Coenzima A (CoA), in presenza di adenosin trifosfato (ATP) e ioni magnesio, si liberano adenosin monofosfato, pirofosfato e Acil-CoA. Questo è in seguito ossidato dall'acil-CoA ossidasi (ACOD) con liberazione di acqua ossigenata, la quale, in presenza di una perossidasi (POD), favorisce la condensazione tra la 3-metil-N-etil-N-( $\beta$ -idrossietil)-anilina (MEHA) e la 4-aminoantipirina per formare un complesso colorato con massimo di assorbanza a 546 nm.

La metodica prevede l'impiego di 4  $\mu$ l di plasma a cui vengono aggiunti subito 75  $\mu$ l di reattivo 1 (soluzione tampone a pH 6.9 contenente ACS, CoA, ATP, 4-aminoantipirina) e 5  $\mu$ l di  $H_2O$  a 300 secondi 20  $\mu$ l di  $H_2O$  e a 720 secondi il reattivo 2 (MEHA, ACOD, POD) e 5  $\mu$ l di  $H_2O$ .

Dopo 1270 secondi dall'inizio dell'analisi si effettua la lettura a 546 nm che, depurata del valore del bianco reagente, è linearmente correlata alla concentrazione di NEFA. La calibrazione dello strumento è effettuata mediante standard di potassio oleato con concentrazione pari a 1 mmol/l

B-idrossibutirrato ( $\beta$ OHB) [mmol/l]: kit Randox (cinetico enzimatico). L'enzima idrossi-butirrato-deidrogenasi (HBDH) catalizza l'ossidazione del  $\beta$ -idrossi butirrato ad aceto acetato. La conseguente riduzione del NAD a NADH comporta un aumento dell'assorbanza a 340 nm. Il metodo impiega 7  $\mu$ l di plasma cui vengono aggiunti 280  $\mu$ l di reattivo 1 (Tampone Tris-buffer, acido ossalico, NAD<sup>+</sup>, 3-HBDH) e 10  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O. Vengono effettuate 2 letture a 340 nm, rispettivamente 118,2 secondi e 243,6 secondi dopo l'aggiunta del reattivo. In relazione alla variazione di assorbanza ed in base alla curva di taratura dello strumento è calcolata la concentrazione. La calibrazione è effettuata mediante standard, a concentrazione nota contenuto nel kit.

Colesterolo totale [mmol/l]: kit IL (enzimatico-colorimetrico). La metodica si basa sulla scissione degli esteri del colesterolo presenti nel plasma in colesterolo ed acidi grassi per effetto della colesterolo esterasi (CHOE). Dalla reazione, catalizzata dalla colesterolo ossidasi (CHOD) tra il colesterolo libero e l'ossigeno dell'aria si formano colest-4-en-3-one e acqua ossigenata. L'acqua ossigenata, in una reazione catalizzata dalla perossidasi (POD), reagisce con la 4-amminoantipirina (4-AAP) ed il fenolo per dare acqua e chinoneimina, composto colorato rilevabile a 510 nm. Il metodo impiega 5  $\mu$ l di plasma cui vengono aggiunti 10  $\mu$ l di reattivo (4-AAP, fenolo, POD, CHOD, CHOE) e 150  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O e dopo 490 secondi si effettuano le letture a 510 e 570 nm (la seconda serve come bianco campione). La differenza fra le letture è linearmente correlata con la concentrazione e la calibrazione è effettuata mediante pool di plasma a valore noto.

Vitamina A ( $\mu$ g/100ml), Vitamina E ( $\mu$ g/ml) e  $\beta$ -carotene (mg/100ml): si procede all'estrazione delle vitamine da 0.5 ml di plasma a cui sono aggiunti 0.5 di etanolo assoluto e, dopo agitazione al vortex, 5 ml di n-esano (per HPLC). Si agita nuovamente e si pone la soluzione in agitatore oscillante per 10 minuti. Dopo l'agitazione le provette sono centrifugate alla temperatura di 10 °C e 3520 g per 5 minuti. Si prelevano quindi 4 ml di surnatante e si portano a secco in corrente di azoto mantenendo le provette in bagno termostatico a 37°C ed al riparo dalla luce. Si riprende il tutto con 0.4 ml di soluzione metanolo (80%) e THF (20%), si agitano al vortex e si centrifugano per 5 minuti. A questo punto si procede all'iniezione del surnatante in HPLC: si utilizza una colonna ALLOSPHERE ODS- 2 3 micron, 150 mm x 4.6 mm e la soluzione metanolo (80%) – THF (20%) ad un flusso di 1ml/min come fase mobile. Il tempo di eluizione per la Vitamina A è di 2.05 minuti; per la vitamina E è di 2.90 minuti, il  $\beta$ -carotene invece viene fluito dopo 5 minuti. Le lunghezze



d'onda impiegate sono 325 nm per la vitamina A, 29 nm per la vitamina E e 460 nm per il  $\beta$ -carotene. Per il calcolo del risultato è stata utilizzata una retta di regressione di 4 punti (A, B, C, D), con le seguenti concentrazioni:

1. Punto A: 200  $\mu\text{g/l}$  vitamina A; 625  $\mu\text{g/l}$  vitamina E e  $\beta$  – carotene;
2. Punto B: 400  $\mu\text{g/l}$  vitamina A; 1250  $\mu\text{g/l}$  vitamina E e  $\beta$  – carotene;
3. Punto C: 600  $\mu\text{g/l}$  vitamina A; 2500  $\mu\text{g/l}$  vitamina E e  $\beta$  – carotene;
4. Punto D: 800  $\mu\text{g/l}$  vitamina A; 5000  $\mu\text{g/l}$  vitamine E e  $\beta$  – carotene.

Urea [mmol/l]: kit IL a determinazione enzimatica mediante ureasi e glutammato-deidrogenasi (GDLH). L'ammoniaca originata dall'idrolisi dell'urea per azione dell'ureasi è utilizzata dalla GLDH nella conversione dell' $\alpha$ -osso-glutarato a L-glutammato. In tale reazione, la quantità di NADH ossidata, misurata in termini di riduzione di assorbanza a 340 nm, è proporzionale alla concentrazione di urea.

L'analisi prevede l'utilizzo 8  $\mu\text{l}$  di plasma cui vengono aggiunti 270  $\mu\text{l}$  di reattivo ( $\alpha$ -osso-glutarato, ADP, ureasi, GLDH, NADH) e 30  $\mu\text{l}$  di acqua e dopo un'attesa di 45 secondi vengono effettuate due letture a 340 nm ad un intervallo di 70 secondi l'una dall'altra. La differenza fra le due letture è linearmente correlata alla concentrazione di urea e la calibrazione è effettuata mediante pool di plasma a tenere noto.

Creatinina [mmol/l]: kit IL (colorimetro). Il metodo è basato sulla reazione fra acido picrico e la creatinina in ambiente alcalino. La quantità di complesso colorato formato, con massimo di assorbimento a 510 nm, è in relazione alla concentrazione di creatinina.

La metodica impiegata 12  $\mu\text{l}$  di plasma cui vengono aggiunti 90  $\mu\text{l}$  di reattivo 1 (idrossido di sodio) e dopo 300 secondi 90  $\mu\text{l}$  di reattivo 2 (acido picrico). A 330 e 400 secondi si effettuano 2 letture a 510 e 570 nm (la seconda come bianco campione). La differenza tra le letture è linearmente correlata alla concentrazione di creatinina e la calibrazione si effettua mediante standard a valore noto.

Calcio [mmol/l]: kit IL. Il metodo, di tipo colorimetrico, si basa sulla formazione di un complesso colorato derivante dalla reazione in ambiente alcalino fra calcio e cresoftaleina complessone. L'intensità del colore prodotto è proporzionale alla quantità di calcio presente nel campione. Le interferenze da magnesio sono prevenute dalla capacità complessante selettiva della 8-ossichinolina. La metodica impiegata 9  $\mu\text{l}$  di plasma cui vengono aggiunti 180  $\mu\text{l}$  di reattivo 1 (2-amino-2metil-1-propanolo) e dopo 300 secondi 180  $\mu\text{l}$  di reattivo 2 (orto-cresoftaleina complessone e 8-idrossi chinolina). 20 secondi prima e 100 secondi dopo rispetto all'aggiunta del reattivo 2 vengono effettuate le letture a 570 e 670 nm (quest'ultima serve come bianco campione). La differenza fra le

letture è linearmente correlata alla concentrazione di calcio. La calibrazione dello strumento è effettuata mediante pool di plasma a valore noto.

Magnesio [mmol/l]: kit IL. Il metodo si basa sulla formazione di un complesso colorato (rosa) come prodotto della reazione tra magnesio e calmagite in soluzione alcalina. L'intensità della colorazione è direttamente proporzionale alla concentrazione di magnesio.

Il metodo prevede l'impiego di 12 µl di plasma cui vengono aggiunti 280 µl di reattivo (calmagite, idrossido di potassio) e 40 µl di H<sub>2</sub>O. Dopo 100 secondi sono effettuate le letture a 510 e 700 nm (quest'ultima come bianco campione). La differenza fra le letture è linearmente correlata con la concentrazione di magnesio. La calibrazione è effettuata con pool di plasma a valore noto.

Zinco [µmol/l]: kit WAKO (colorimetrico) mediante reattivo cromogeno con formazione di un chelato rosso. La metodica prevede la deproteinizzazione del campione con acido tricloroacetico. Dalla nostra esperienza di laboratorio, è emerso che, procedendo all'analisi sul plasma senza deproteinizzazione si ottengono risultati ugualmente accettabili. Questo probabilmente grazie all'autoanalizzatore che ci consente di fare una lettura a due lunghezze d'onda e ciò consente l'eliminazione di una parte delle interferenze, causata dalla diversa colorazione della matrice.

La metodica impiega 30 µl di plasma cui vengono aggiunti 150 µl di reattivo cromogeno e 30 µl di H<sub>2</sub>O. Dopo 330 secondi si effettuano le letture a 546 e 660 nm (quest'ultima equiparabile al bianco campione). La differenza fra le letture è linearmente correlata alla concentrazione di zinco e la calibrazione si effettua mediante pool a valore noto.

Ceruloplasmina [µmol/l]: si basa sulla colorazione che trae origine dall'ossidazione dell'ortoparafenilendiammina, operata dalla ceruloplasmina.

La metodica impiega 25 µl di plasma cui vengono aggiunti 140 µl di tampone acetato (0.8 M, Ph 6.4 addizionato estemporaneamente con parafenilendiammina allo 0.14 %) e 40 µl di H<sub>2</sub>O.

Dopo 350 secondi si effettuano le letture a 546 e 660 nm (la seconda funge da bianco campione). La differenza fra le letture è linearmente correlata con la concentrazione di ceruloplasmina e la calibrazione è effettuata mediante pool a valore noto. Il valore del pool è stato determinato dosando il rame nel campione e conoscendo che circa il 90% del rame plasmatico è contenuto nella ceruloplasmina, dove per ogni molecola di ceruloplasmina ci sono 6 atomi di rame, sapendo inoltre che il peso molecolare della ceruloplasmina è di 124000 D si risale, dal tenore in rame, al corrispondente valore in ceruloplasmina.

Aptoglobina [g/l]: la determinazione si effettua mediante un test colorimetrico.

Per l'analisi si impiegano 12 µl di plasma cui si aggiungono 60 µl di reattivo 1 (metaemoglobina, soluzione fisiologica, H<sub>2</sub>O bi distillata) e 5 µl di H<sub>2</sub>O. A 10 secondi dall'aggiunta del reattivo 2 lo

strumento esegue una prima lettura (la reazione colorimetrica non è ancora avvenuta perciò questo valore corrisponde al bianco campione) ed una lettura è effettuata dopo 250 secondi a reazione colorimetrica avvenuta. La variazione di assorbanza a 450 nm è proporzionale alla concentrazione di aptoglobina presente nel campione.

Albumine [g/l]: la determinazione delle albumine è eseguita sfruttando la variazione di colore dovuta alla formazione di un complesso fra le albumine e il verde di bromo cresolo (kit IL).

Per l'analisi si impiegano 5 µl di plasma cui vengono aggiunti 230 µl di reattivo [soluzione di verde bromocresolo e acido succinico (pH 3.8)] e dopo 45 secondi si effettuano le letture a 600 e 700 nm (la seconda come bianco campione). La differenza fra le letture è linearmente correlata con la concentrazione di albumine e la calibrazione è effettuata mediante un pool a valore noto.

Paraoxonasi (PON) [U/ml]: la metodica è di tipo cinetico-fotometrico e si basa sulla misura dell'idrolisi del paraoxon da parte della arildialchil-fosfatasi chiamata anche paraoxonasi, con formazione del p-nitrofenolo. La metodica procede come segue: si pipettano 8 µl di campione a cui si aggiungono 125 µl di soluzione substrato (formato da 1 mmol/l di paraoxon e 1 mmol/l di CaCl<sub>2</sub> in una soluzione tampone di glicina 0.05 mmol/l) e 125 µl di acqua ultra filtrata; la lettura, avviene a 420 nm, essa viene effettuata a 17 (bianco) e 51 secondi (lettura finale). Si misura la differenza di assorbanza tra le 2 letture. Si utilizzano, per la correzione dei risultati, 3 standard a valore noto: Precinorm (Roche, Germania), Randox (Randox Laboratories LTD, UK) e pool di plasma bovino.

Bilirubina totale [µmol/l]: kit IL determinazione colorimetrica con diazotazione. La bilirubina totale presente nel campione è direttamente proporzionale alla quantità di azobilirubina che si forma in seguito alla reazione, in presenza di litio dodecilsolfato, tra la stessa bilirubina totale e l'acido sulfanilico diazotato. Per l'analisi si impiegano 40 µl di plasma cui vengono aggiunti subito 105 µl di reattivo 1 (Litio dodecilsolfato) e 35 µl di H<sub>2</sub>O e dopo 300 secondi 75 µl di reattivo 2 (Acido Cloridrico e Acido Sulfanilico). 20 secondi prima e 220 secondi dopo rispetto all'aggiunta del reattivo 2 si effettuano le letture a 546 nm. La differenza fra le letture è linearmente correlata alla concentrazione di bilirubina e la calibrazione è effettuata utilizzando standard a valore noto.

Metaboliti reattivi dell'ossigeno (ROM) totali [mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/100 ml]: i metaboliti reattivi dell'ossigeno vengono determinati mediante kit colorimetrico (Diacron, Grosseto). I ROM sono una varietà di radicali liberi caratterizzati da ciascuna reattività chimica che formano, nel plasma e nelle cellule, dei derivati altrettanto reattivi. Il principio della determinazione dei ROM totali consiste nella misura spettrofotometrica a 510 nm di un complesso colorato che si forma in seguito alla reazione di questi derivati con un cromogeno opportunamente tamponato. Per l'analisi vengono utilizzati 6 µl di plasma e 150 µl di reattivo. Il reattivo è costituito dalla miscela del tampone e del cromogeno

in rapporto 100:1. La reazione dura 3 min e segue un procedimento cinetico, per cui è misurata la variazione di assorbanza per min ( $\Delta A/\text{min}$ ). Le concentrazioni si ottengono moltiplicando le  $\Delta A/\text{min}$ , relative a ciascun campione di plasma, per il valore del fattore calcolato utilizzando uno standard a concentrazione nota (22,5 mg  $\text{H}_2\text{O}_2/100$  ml) di ROM totali. L'analisi è seguita utilizzando la macchina autoanalizzatrice ILab 600 (Instrumentation Laboratory).

Lipossina (ng/ml): per l'analisi quantitativa dei livelli di LXA4 nel plasma è stato impiegato un metodo ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) di tipo competitivo, utilizzando il kit Lipoxin A4 EIA (EA45, Oxford Biomedical Research). Questo metodo è basato sulla competizione tra la LXA4 - coniugata all'enzima perossidasi e la LXA4 standard (0-2 ng/ml) o presente nel campione, per un numero limitato di siti leganti l'anticorpo (anti-LXA4 ottenuto in coniglio) adsorbito ai pozzetti della micropiastra.

In breve, il campione o la soluzione standard vengono aggiunti per primi alla micro piastra, seguiti dall'enzima coniugato; quindi la miscela viene lasciata a temperatura ambiente per un'ora di incubazione, durante la quale avviene la competizione. Il materiale non legato viene rimosso mediante lavaggio della piastra, mentre l'enzima coniugato legato viene evidenziato dall'aggiunta di substrato che genera colore dopo 30 minuti.

Un risultato quantitativo può essere ottenuto misurando e comparando le assorbanze dei campioni contro quelle degli standards con un lettore di micro piastre a 650 nm.

La quantità di colore sviluppato è inversamente proporzionale alla quantità di LXA4 presente nel campione o nello standard. In particolare, l'assenza di LXA4 nel campione è indicata da un colore blu luminoso del pozzetto, mentre la presenza della LXA4 è testimoniata da una minore o assente colorazione del pozzetto.

L'analisi consiste delle seguenti fasi:

➤ **Estrazione di Lipossina A4 dai campioni di plasma:** diluire 100  $\mu\text{l}$  di plasma con 200  $\mu\text{l}$  di metanolo e successivamente con 1.5 ml di acqua bidistillata; prelevarne 1 ml ed acidificare a pH 3.5 con HCL 1N; condizionare le colonnine C18 Sep-Pak light (Waters Corporation) con 2 ml di metanolo e 2 ml di acqua bidistillata; aggiungere la soluzione acidificata nella colonna e lavare la stessa con 5 ml di acqua bidistillata e 5 ml di esano; eluire la lipossina A4 con 2 ml di metil formato; evaporare il metil formato con un flusso di  $\text{N}_2$ ; ricostituire il residuo con 1 ml di tampone per estrazione diluito con acqua deionizzata.

➤ **Procedura analitica:**

1. Preparare le soluzioni standard:

STANDARD

PREPARAZIONE

- A soluzione stock 1 µg/ml (nel kit)  
 B 20µl di A in 980µl di tampone EIA e miscelare = 20 ng/ml  
 C 200µl di B in 1.8ml di tampone EIA e miscelare = 2 ng/ml  
 D 200µl di C in 1.8ml di tampone EIA e miscelare = 0.2 ng/ml

Continuare la preparazione mediante il seguente schema :

<b>Standards</b>	<b>ng/ml</b>	<b>Tampone EIA (µl)</b>	<b>C Standard µl</b>	<b>D Standard µl</b>
S0	0	tal quale	-	-
S1	0.02	900	-	100
S2	0.04	800	-	200
S3	0.1	500	-	500
S4	0.2	-	-	tal quale
S5	0.4	800	200	-
S6	0.8	600	400	-
S7	2	-	tal quale	-

- Determinare il numero di pozzetti da usare; quindi diluire, per ogni pozzetto, 1µl di enzima coniugato in 50 µl di volume totale di tampone EIA . Per la piastra intera, aggiungere 110µl di enzima coniugato in 5.5 ml di volume totale di tampone EIA e miscelare;
- Aggiungere 50 µl di standard o campione ai pozzetti in duplicato;
- Aggiungere 50 µl di enzima coniugato, diluito, ad ogni pozzetto, mediante una pipetta multicanale;
- Miscelare delicatamente, con movimento orbitale;
- Coprire le piastre con un film plastico ed incubare a temperatura ambiente per un'ora;
- Diluire il tampone di lavaggio, concentrato, con acqua deionizzata. Miscelare accuratamente;
- Dopo l'incubazione, aspirare il contenuto dei pozzetti mediante lavatore automatico per micro piastre, quindi lavare con 300 µl di tampone, ripetendo tale operazione per un totale di 5 lavaggi;
- Aggiungere 150 µl di substrato ad ogni pozzetto, usando una pipetta multicanale e incubare a temperatura ambiente per 30 minuti;
- Agitare leggermente la piastra in modo da garantire un colore uniforme in ciascun pozzetto;
- Leggere la piastra a 650 nm e a 490 nm mediante un lettore di assorbanza per micro piastre;

12. Se si vuole controllare il bianco, usare da 2 ad 8 pozzetti contenenti solo 150 µl di substrato.

➤ **Calcoli**

1. Dopo eventuale sottrazione del bianco a tutte le assorbanze, il valore medio di S0 corrisponde al valore di massimo legame B0; calcolare quindi la percentuale di massimo legame  $(B/B0 * 100)$  per ogni assorbanza di standard e campioni;
2. Disegnare la curva standard riportando, per ogni concentrazione standard, il rapporto B/Bo% sull'asse delle ordinate (Y) e la concentrazione sull'asse delle ascisse (X); usare il metodo 4-parametri o regressione lineare;
3. Dalla curva standard, la concentrazione di ogni campione può essere determinata comparando il rapporto B/Bo% con la concentrazione corrispondente di LXA4 standard;
4. Infine la concentrazione così determinata, deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione.

**IL-1β & IL-6 bovine (pg/ml):**

Per l'analisi quantitativa dei livelli di IL-1β o IL-6 nel plasma bovino è stato impiegato un metodo ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) di tipo non competitivo a "sandwich", utilizzando il kit ELISA Screening Set (Pierce, Thermo Scientific) che contiene i componenti principali per sviluppare, in micro piastra, l'immunodosaggio specifico delle citochine IL-1β e IL-6 bovine.

In breve, un primo anticorpo specifico viene fatto adsorbire alla micropiastra, per creare la fase solida, quindi viene aspirato. Dopo incubazione con un reagente bloccante e successiva rimozione, i campioni, il controllo e le soluzioni standard vengono aggiunti alla fase solida, che cattura la IL-1β o IL-6. L'aspirazione e lavaggio della micro piastra rimuove la citochina non legata ed un secondo anticorpo, coniugato con biotina, viene aggiunto. Quest'ultimo anticorpo si lega a un differente sito della molecola dell'analita, completando il "sandwich". Un ulteriore lavaggio rimuove l'eccesso di anticorpo coniugato non legato, seguito dall'aggiunta di enzima coniugato, a sua volta, con streptavidina. Un ultimo lavaggio della piastra rimuove il materiale non legato, quindi l'aggiunta di substrato genera colore blu in proporzione alla quantità di analita legato. Si blocca, infine, lo sviluppo di colore con aggiunta di soluzione acida, che fa virare il colore da blu a giallo, e si misura la densità ottica a 450 contro 550 nm con un lettore per micro piastre.

➤ **Reagenti principali forniti con il kit:**

- a. anticorpo da immobilizzare in fase solida: 1° anti IL1-β o IL-6 bovina, 1 o 100 µg/ml da conservare in aliquote a -80 °C;

- b. anticorpo per la rilevazione: 2° anti IL1- $\beta$  o IL-6 bovina bovina, coniugato a biotina, 0.75 o 130  $\mu\text{g/ml}$  da conservare in aliquote a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- c. IL1- $\beta$  o IL-6 bovina ricombinante, 4000 o 10000  $\text{pg/ml}$  se ricostituite con tampone diluente;
- d. enzima perossidasi da rafano coniugata a streptavidina;
- e. substrato: tetrametilbenzidina;
- f. soluzione stop: 0.16 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

➤ **Materiali richiesti ma non forniti con il kit:**

1. tampone fosfato (PBS): 0.14 M NaCl, 0.01M KCl, 0.008 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.002 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH, 7.4, filtrato a 0.2  $\mu\text{m}$ ;
2. tampone carbonato-bicarbonato, 0.2M, pH 9.4, filtrato a 0.2  $\mu\text{m}$ ;
3. tampone di lavaggio: 0.05 % Tween 20 in PBS;
4. tampone bloccante: 4 % BSA, 5 % saccarosio in PBS, filtrato a 0.2  $\mu\text{m}$ ;
5. tampone diluente: 4 % BSA in PBS, pH 7.4, filtrato a 0.2  $\mu\text{m}$ .

➤ **Procedura analitica:**

1. preparazione della fase solida: scongelare una aliquota del 1° anticorpo, diluire 1:100 con tampone carbonato-bicarbonato, distribuirne 100  $\mu\text{l}$  nella micro piastra, coprire con un film plastico e incubare 16 ore a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
2. al termine, aspirare il contenuto dei pozzetti mediante lavatore automatico per micro piastre;
3. aggiungere 300  $\mu\text{l}$  di tampone bloccante; coprire e incubare per 1.5-2.0 ore a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
4. diluire i campioni con tampone diluente;
5. preparazione delle soluzioni standard con tampone diluente: diluire la soluzione di partenza in modo da ottenere una concentrazione di 2000  $\text{pg/ml}$  di IL-1 $\beta$  o 5000  $\text{pg/ml}$  di IL-6; proseguire quindi con 7 diluizioni seriali 1:2, per ottenere una curva standard a otto punti;
6. al termine dell'incubazione, aspirare il contenuto dei pozzetti mediante lavatore automatico per micro piastre, quindi aggiungere 100  $\mu\text{l}$  di standard o campione ai pozzetti in duplicato; coprire e incubare 60 minuti a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
7. scongelare una aliquota del 2° anticorpo, coniugato con biotina, diluire 1:100 con tampone diluente;

8. dopo l'incubazione, aspirare il contenuto dei pozzetti mediante lavatore automatico per micro piastre, quindi lavare con 300  $\mu\text{l}$  di tampone, ripetendo tale operazione per un totale di 3 lavaggi;
9. distribuire, nella micro piastra 100  $\mu\text{l}$  di 2° anticorpo, coprire e incubare 60 minuti a 25 °C;
10. diluire l'enzima coniugato 1:400 con tampone diluente;
11. dopo l'incubazione, aspirare il contenuto dei pozzetti mediante lavatore automatico per micro piastre, quindi lavare con 400  $\mu\text{l}$  di tampone, ripetendo tale operazione per un totale di 4 lavaggi;
12. aggiungere alla micro piastra 100  $\mu\text{l}$  di enzima coniugato, coprire ed incubare 30 minuti a 25 °C;
13. al termine dell'incubazione, aspirare il contenuto dei pozzetti mediante lavatore automatico per micro piastre, quindi lavare con 400  $\mu\text{l}$  di tampone, ripetendo tale operazione per un totale di 4 lavaggi;
14. aggiungere 100  $\mu\text{l}$  di substrato ad ogni pozzetto, e incubare a 25 °C per 20 minuti, al buio;
15. aggiungere 100  $\mu\text{l}$  di soluzione stop ad ogni pozzetto;
16. agitare leggermente la piastra con movimento orbitale in modo da garantire un colore uniforme in ciascun pozzetto;
17. leggere la piastra a 450 contro 550 nm mediante un lettore di assorbanza per micro piastre.

➤ **Calcoli**

1. sottrarre la densità ottica dello standard 0 a tutte le assorbanze;
2. costruire la curva standard mediante un programma in grado di generare una funzione logistica a quattro parametri, riportando, per ogni concentrazione standard, la densità ottica sull'asse delle ordinate (Y) e la concentrazione sull'asse delle ascisse (X);
3. dalla curva standard, la concentrazione di ogni campione può essere determinata comparando la densità ottica con la concentrazione corrispondente di citochina standard;
4. infine la concentrazione così determinata, deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione.



### **TNF- $\alpha$ bovino (pg/ml):**

Per l'analisi quantitativa dei livelli di TNF- $\alpha$  nel plasma bovino è stato impiegato un metodo ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) di tipo non competitivo a "sandwich", utilizzando il DuoSet ELISA Development kit (DY2279, R&D Systems, Inc.) che contiene i componenti principali per sviluppare, in micro piastra, l'immunodosaggio specifico del TNF- $\alpha$  bovino.

In breve, un primo anticorpo specifico viene fatto adsorbire alla micropiastra, per creare la fase solida, quindi l'eccesso, non legato, viene rimosso mediante lavaggio. Dopo aggiunta di un reagente bloccante e successivo lavaggio, i campioni, il controllo e le soluzione standard (TNF- $\alpha$  bovino ricombinante, 0-8000 pg/ml) vengono aggiunti alla fase solida, che cattura il TNF- $\alpha$ . Un altro lavaggio della micro piastra rimuove il TNF- $\alpha$  non legato ed un secondo anticorpo, coniugato con biotina, viene aggiunto. Quest'ultimo anticorpo si lega a un differente sito della molecola dell'analita, completando il "sandwich". Un ulteriore lavaggio rimuove l'eccesso di anticorpo coniugato non legato, seguito dall'aggiunta di enzima coniugato, a sua volta, con streptavidina. Un ultimo lavaggio della piastra rimuove il materiale non legato, quindi l'aggiunta di substrato (TMB e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) genera colore blu in proporzione alla quantità di analita legato. Si blocca, infine, lo sviluppo di colore con aggiunta di soluzione acida, che fa virare il colore da blu a giallo, e si misura la densità ottica a 450 contro 570 nm con un lettore per micro piastre.

#### ➤ Reagenti principali forniti con il kit:

- a. anticorpo da immobilizzare in fase solida: 1° anti TNF- $\alpha$  bovino, ottenuto in capra, 144  $\mu$ g/ml, dopo ricostituzione con 1 ml PBS; conservare in aliquote a -80 °C;
- b. anticorpo per la rilevazione: 2° anti TNF- $\alpha$  bovino, ottenuto in capra, coniugato a biotina, 72  $\mu$ g/ml dopo ricostituzione con 1 ml di tampone diluente; conservare in aliquote a -80 °C;
- c. TNF- $\alpha$  bovino ricombinante, 330 ng/ml dopo ricostituzione con 0.5 ml di tampone diluente.
- d. enzima perossidasi da rafano coniugata a streptavidina.

#### ➤ Materiali richiesti ma non forniti con il kit:

1. tampone fosfato (PBS): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH , 7.2-7.4, filtrato a 0.2  $\mu$ m;
2. tampone di lavaggio: 0.05 % Tween 20 in PBS;
3. tampone bloccante = tampone diluente: 5 % Tween 20 in PBS, pH , 7.2-7.4, filtrato a 0.2  $\mu$ m;

4. substrato: miscela 1:1 di reagente A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e B (tetrametilbenzidina) (R&D Systems DY999)
5. soluzione stop: 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (R&D Systems DY994)
6. siero normale di capra inattivato al calore.

➤ **Procedura analitica:**

1. preparazione della fase solida: scongelare una aliquota del 1° anticorpo, diluire alla concentrazione di 0.8 µg/ml con PBS, distribuirne 100 µl nella micro piastra, coprire con un film plastico e incubare 16 ore a 25 °C;
2. dopo l'incubazione, aspirare il contenuto dei pozzetti mediante lavatore automatico per micro piastre, quindi lavare con 400 µl di tampone, ripetendo tale operazione per un totale di 4 lavaggi;
3. aggiungere 300 µl di tampone bloccante; coprire e incubare per 1.5-2.0 ore a 25 °C;
4. diluire i campioni con tampone diluente;
5. preparazione delle soluzioni standard con tampone diluente: diluire la soluzione di partenza in modo da ottenere una concentrazione di 8000 pg/ml; proseguire quindi con 6 diluizioni seriali 1:2, per ottenere una curva standard a sette punti;
6. dopo l'incubazione, aspirare il contenuto dei pozzetti mediante lavatore automatico per micro piastre, quindi lavare con 400 µl di tampone, ripetendo tale operazione per un totale di 4 lavaggi;
7. Aggiungere 100 µl di standard o campione ai pozzetti in duplicato; coprire e incubare 2 ore a 25 °C;
8. scongelare una aliquota del 2° anticorpo, coniugato con biotina, diluire alla concentrazione di 400 ng/ml con tampone diluente, contenente 2% di siero normale di capra inattivato al calore; preparare 1-2 ore prima dell'uso;
9. dopo l'incubazione, aspirare il contenuto dei pozzetti mediante lavatore automatico per micro piastre, quindi lavare con 400 µl di tampone, ripetendo tale operazione per un totale di 4 lavaggi;
10. distribuire, nella micro piastra, 100 µl di 2° anticorpo, coprire e incubare 2 ore a 25 °C;
11. dopo l'incubazione, aspirare il contenuto dei pozzetti mediante lavatore automatico per micro piastre, quindi lavare con 400 µl di tampone, ripetendo tale operazione per un totale di 4 lavaggi;

12. diluire l'enzima coniugato 1:200 con tampone diluente, aggiungerlo alla micro piastra, coprire ed incubare 20 minuti a 25 °C, al buio;
13. 10-15 minuti prima dell'uso preparare il substrato miscelando 1:1 i reagenti A e B;
14. dopo l'incubazione, aspirare il contenuto dei pozzetti mediante lavatore automatico per micro piastre, quindi lavare con 400 µl di tampone, ripetendo tale operazione per un totale di 4 lavaggi;
15. aggiungere 100 µl di substrato ad ogni pozzetto, e incubare a 25 °C per 30 minuti, al buio;
16. aggiungere 50 µl di soluzione stop ad ogni pozzetto;
17. agitare leggermente la piastra con movimento orbitale in modo da garantire un colore uniforme in ciascun pozzetto;
18. leggere la piastra a 450 contro 570 nm mediante un lettore di assorbanza per micro piastre.

➤ **Calcoli**

1. sottrarre la densità ottica dello standard 0 a tutte le assorbanze;
2. costruire la curva standard mediante un programma in grado di generare una funzione logistica a quattro parametri, riportando, per ogni concentrazione standard, la densità ottica sull'asse delle ordinate (Y) e la concentrazione sull'asse delle ascisse (X);
3. dalla curva standard, la concentrazione di ogni campione può essere determinata comparando la densità ottica con la concentrazione corrispondente di TNF- $\alpha$  standard;
4. infine la concentrazione così determinata, deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione.

## **ELENCO ABBREVIAZIONI**

**AA** – Acido Arachidonico

**ACTH** – Adrenocorticotropic hormone

**AGV** – acidi grassi volatili

**AP** – Acute Phase

**APPs** - Proteine di fase acuta

**APR** - Risposta di fase acuta

**ATL** – Aspirin-triggered lipoxin

**BCS** - Body Condition Score

**COX** - Ciclooossigenasi

**CRP** – Proteina C reattiva

**DAMPs** - Damage-associated molecular patterns

**DHA** – Acido docosaesaenoico

**DIM** - Distanza Interparto Media

**DMI** - Ingestione di Sostanza Secca

**DT** - docosatrieni

**EPA** – Acido eicosapentaenoico

**HPA** – Hypothalamic–Pituitary-Adrenal-Axis

**ICAM-1** - Intercellular adhesion molecules

**IκB** – proteina inibitoria – κB

**IL-1** - Interleuchina-1

**IL-6** - Interleuchina-6

**iNOS** – Inductible Nitric Oxide Synthase

**LAI** – Indice dell'attività epatica

**LFI** – Indice della funzionalità epatica

**LOX** - Lipossigenasi

**LPS** - Lipopolisaccaride o endotossina

**LTs** – leucotrieni

**LXA4** - Lipossina A4

**MAMPs** - Microbe-associated molecular patterns

**NEB** – Bilancio Energetico Negativo

**NEFA** – Acidi grassi non esterificati

**NF-κB** - Fattore Nucleare - κB

**NK** – Natural Killer  
**NOS** – nitrico sintetasi  
**PAMPs** - Pathogen-associated molecular patterns  
**PCV** - Packed Cell Volume (ematocrito)  
**PD1** – protectine  
**PGD2** – prostaglandine D2  
**PGE2** – prostaglandine E2  
**PICE** - Indice dei processi infiammatori e delle conseguenze epatiche  
**PICs** - Citochine pro-infiammatorie  
**PLA2** – Fosfolipasi A2 citosolica  
**PMN** – leucociti polimorfo nucleati  
**PV** – Peso Vivo  
**PON**: Paraoxonasi  
**PUFAs** – Acidi grassi polinsaturi  
**RBP** - Retinol Binding Protein  
**ROM** - Reactive Oxygen Metabolite  
**RVE1** – Resolvina E1  
**SAA** – Sieroamiloide  
**TG** - Trigliceridi  
**TNF- $\alpha$**  - Fattore di necrosi tumorale-alfa  
**BOHB** - Acido  $\beta$ -idrossibutirrato

## **BIBLIOGRAFIA**

Akira S., Isshiki H., Sugita T., Tanabe O., Kinoshita S., Nishio Y., Nakajima T., Hirano T., and Kishimoto T. (1990). A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *J. EMBO*. 9:1897-1906.

Alajada A., Saadeh R., Assian E., Ghanim H., Dandona P., (2000). Insulin inhibits the expression of intercellular adhesion molecule-1 by human aortic endothelial cells through stimulation of nitric oxide. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:2572-2575.

Angelika B., Schiekforer S., Schwaninger M., Andrassy M., Humpert P.M., Chen J., Hong M., Luther T., Henle T., Klötting I., Morcos M., Hofmann M., Tritschler H., Weigle B., Kasper M., Smith M., Perry G., Schmidt A.M., Stern D.M., Häring H.U., Schleicher E., Nawroth P.P., (2001). Diabetes-Associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kB. *Diabetes*. 50: 2792-2808.

Barber M., and Yang J.J., (1998). Chemotactic activities in nonmastitic and mastitic mammary secretions: Presence of Interleukin.8 in mastitic but non nonmastitic secretions. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 6: 791-798.

Bertoni G., Bani P., Calamari L., (1990). La ricerca dell'urea e dei corpi chetonici nel sangue e nel latte per il controllo della copertura dei fabbisogni proteici ed energetici. *PRAXIS Vet.* 4: 16-19

Bertoni G., Calamari L., Trevisi E. (2000). Nuovi criteri per l'individuazione dei valori di riferimento di taluni parametri ematici in bovine da latte. *La selezione veterinaria. Suppl.* S261-S268.

Bertoni F., Piccioli Cappelli F., Boldi A., Borghese A., Duranti E., Falasachini A., Formigoni A., Grasso F., Lacetera N., Lupi P., Meluzzi A., Pinna W., Rosi F., Stafanoni B., Zicarelli L., Bernabucci U., Campanile G., Moniello G., Trombetta M.F., (2000). Interpretation of metabolic profiles in farming animals. *Prog. Nutr.* 2: 51-76.

Bertoni G., Trevisi E., Ferrari A., Bionaz M., (2003). Energy and protein metabolism and liver activity changes in dairy cows treated with E.coli endotoxin 3 days after calving. In: "Progress in

Research on Energy and Protein metabolism – EAAP publication No 109. Rostock- Warnemunde, Germany 13-18 September 2003.

Bertoni G., Trevisi E., Ferrari A.R., Gubbiotti A., (2006). The dairy cow performances can be affected by inflammations occurring around calving. Book of abstract of the 57<sup>th</sup> EAAP Meeting, 17-20 September 2006, Antalua, Turkey, 325.

Bertoni G., Trevisi E., Han X., Bionaz M., (2008). Effects of inflammatory Conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91: 3300-3310.

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

Bionaz M., Trevisi E., Calamari L., Librandi F., Ferrari A. Bertoni G., (2007). Plasma Paraoxonase, Health Problems, Inflammatory Conditions and liver function in transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:1740-1750.

Blum J.W., Dosogne H., Hoeben D., Vangroenweghe F., Hammon H.M., Bruckmaier R.M., Burvenich C., (2000). Tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitrite/nitrate responses during acute mastitis induced by *Escherichia coli* infection and endotoxin in dairy cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* 19:223-235.

Bossaert P., Trevisi E., Opsomer G., Bertoni G., (2011). The association between indicators of inflammation and liver variables during the transition period in high-yielding dairy cows: An observational study. *Vet. J.* (Abstract).

Boutet P., Bureau F., Degand G., Lekeux P., (2003). Imbalance between Lipoxin A4 and Leukotriene B4 in chronic mastitis-affected cows. *J. Dairy Sci.* 86:3430-3439.

Buckingham J.C., Loxely H.D., Christian H.C., Philip J.G. (1996). Activation of the HPA axis by immune insults: roles and interactions of cytokines, eicosanoids and glucocorticoids. *Pharmacol. Biochem. Be.* 54 (1): 285-298.

Burvenich C.V., Van Merris J., Mehrzad J., Diez-Fraile A., Duchateau L., (2003). Severity of *E.coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 34: 521-564.

- Calder P.C., Yaqoob P., Thies F., Wallace F.A., Miles E.A., (2002). Fatty acids and lymphocyte functions. *Baroda J. Nutr.* 87:S31-S48.
- Calder P.C., (2006). N-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J. Clin. Nutr.* 83: 1505S-19S.
- Cappa V., Trevisi E., Bertoni G., (1989). Variazioni ematiche e produttive nel primo mese di lattazione in bovine di allevamenti con o senza problemi post-partum. *Zoot. Butr. Anim.* 15: 645-660.
- Caramia G., Fanos V., (2007). Mediatori lipidici, infezioni e infiammazioni: evoluzione delle conoscenze e prospettive terapeutiche. *Giorn. It. Inf. Ped.* 2007. 9: 15-27
- Coussons-Read M.E., Michele L.O., Michele P.S., Scott G., (2005). Prenatal stress alters cytokine levels in a manner that may endanger human pregnancy. *Psychosom Med.* 67: 625-631.
- Dickinson S. Hancock D.P., Petocz P., Ceriello A., Brand-Miller J., (2008). High-glycemic index carbohydrate increases nuclear factor- $\kappa$ B activation in mononuclear cells of young, lean healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 87: 1188-1193.
- Dandona P., Aljada A., Mohanty P., e coll., (2001). Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappa B and stimulates IKappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for anti-inflammatory effect? *J. Clin Endocrinol Metab.* 86: 3257-65.
- Drackley, J.K., (1999). Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest.* 112: 321S-329S.
- Drackley J.K., Dann H.M., Douglas G.N., Guretzky N.A., Litherland N.B., Underwood J.P., Looor J.J., (2005). Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Ital. J. Anim. Sci.* 4:323-344.
- Duffield T.F., Lissemore K.D., McBride B.W., Leslie K.E., (2009). Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J. Dairy Sci.* 92:571-580.



- Elewaut, D., Didonato, J.A., Kim, J.M., O'Neill, D., Truong, F., Eckmann, L. & Kagnoff, M.F., (1999). Nuclear factor-kappa B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria. *J. Immunol.* 163:1457-1466.
- Elsasser T.H., Kahl S., Steele C., Rusmey T.S., (1997). Nutritional modulation of somatotrophic axis-cytokine relationships in cattle: a brief review. *Comp. Biochem. Physiol.* 116A(3):209-221.
- Elsasser T.H., Klasing K.C., Filipov N., Thompson F., (2000). The metabolic consequences of stress: targets for stress and priorities of nutrient use. In: *The biology of animal stress. Basic principles and implications for animals welfare*, edited by G.P. Moberg and J.A Mench, CABI publishing. 77-110.
- Geiger T., Andus T., Klapporth J., Hirano T., Kishimoto T., Heinrich P.C., (1988). Induction of acute phase proteins by IL-6 in vivo. *J. Immunol.* 18: 712-721.
- Goff J.P., Stabel J.R., (1990). Decreased plasma retinol, alpha-tocopherol, and zinc concentration during the periparturient period: effect of milk fever. *J. Dairy Sci.* 73: 3195-3199.
- Goff J.P. e Horst R.L., (1997). Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.* 80: 1260-1268.
- Grummer R.R., (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J. Anim Sci.* 73: 2820-33.
- Hauguel-de Mouzon S., Guerre-Millo M., (2006). The placenta cytokine network and inflammatory signals. *Placenta*, 27: 794-798.
- Heinrich P.C., Castell J. V., Andus Tilo., (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J.* 265: 621-636.
- Herdt T.H., Liesman J.S., Gerloff B.J., Emery R.S., (1983). Reduction of serum triacylglycerol-rich lipoprotein concentrations in cows with hepatic lipidosis. *Am. J. Vet. Res.* 44: 293-296.
- Hiss S., Mielenz M., Bruckmaier R.M., Sauerwein H., (2004). Haptoglobin concentrations in blood and milk after endotoxin challenge and quantification of mammary Hp mRNA Expression. *J. Dairy Sci.* 87: 3778-3784.

- Hong S., Gronert K., Devchand P., Moussignac RL., et al. (2003). Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood and glial cells: autacoids in anti-inflammation. *J. Biol. Chem.* 278: 14677-14687.
- Ingvarlesen K.L., Andersen J.B. (2000). Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *J. Dairy Sci.* 83: 1573-1597.
- Johnson R.W., Arkins S., Dantzer R., and Kelley K.W., (1997). Hormones, lymphohemopoietic cytokines and the neuroimmune axis. *Comp. Biochem. Physiol.* 116A: 183-201.
- Kreipe L., Vernay M.C.M.B., Oppliger O., Wellnitz O., Bruckmaier R.M., van Dorland H.A., (2011). Induced Hypoglycemia for 48 hours indicate differential glucose and insulin effects on the liver metabolism in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 94: 5435-5448.
- Lacetera N., Scalia D., Franci O., Bernabucci U., Ronchi B., Nardone A., (2004). Effects of nonesterified fatty acids on lymphocyte functions in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 87:1012-1014.
- Lacetera, N., Scalia, D., Bernabucci, U., Ronchi, B., Pirazzi, D. & Nardone, A. (2005). Lymphocyte functions in overconditioned cows around parturition. *J. Dairy Sci.* 88: 2010-2016.
- Leblanc S. J., Herdt T.H., Seymour W.M., Duffield T.F., Leslie K.E., (2004). Peripartum serum vitamin E, Retinol, and Beta-Carotene in Dairy Cattle and their Associations with disease. *J. Dairy Sci.* 87:609-619.
- Lindström T.M. e Bennett P.R., (2005). The role of nuclear factor kappa B in human labour. *Reproduction.*130: 569-581.
- Littell R.C., Henry P.R., Ammerman C.B., (1998). Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Dairy Sci.* 67: 1216-1231.
- Mallard, B. A., J. C. Dekkers, M. J. Ireland, K. E. Leslie, S. Sharif, C. Lacey Vankampen, L. Wagter, and B. N. Wilkie., (1998). Alteration in immune responsiveness during the peripartum Period and its ramification on Dairy Cow and Calf Health. *J. Dairy Sci.* 81: 585-595.

- Morimoto T., Tsujinaka T., Yano M., Iijima S., Ebisui C., Kan K., Kishibuchi M., Mori T. (1995). Regulation of albumin synthesis after hepatectomy and in the acute inflammation phase of rat liver. *J. Nutr. Biochem.* 6: 522-527.
- Moshage H., (1997). Cytokines and Hepatic acute response. *J. Pathol.* 181: 257-266
- Moyes K.M., Drackley J.K., Morin D.E., Rodriguez-Zas S.L., Everts R. E., Lewin H. A., Looor J.J., (2010). Mammary gene expression profiles during an intramammary challenge reveal potential mechanisms linking negative energy balance with impaired immune response. *Physiol. Genomics.* 41: 161-170.
- Mudron P., Rehage J., Qualmann K., Sallmann H.P., Sholz H., (1999). A study of lipid peroxidation and vitamin E in dairy cows with hepatic insufficiency. *J. Vet. Med.* 46: 219-224.
- Nakamura K, Mitarai Y., Yoshioka M., Koizumi N., Shibahara T., Nakajima Y., (1997). Serum levels of interleukin-6,  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein, and Corticosterone in Two-Week-Old Chickens Inoculated with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Poultry Sci.* 77: 908-911.
- O' Boyle N., Chris M.C., Jeffery C.G., Sordillo L.M., (2006). Relationship of body condition score and oxidant stress to tumor necrosis factor expression in dairy cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113: 297-304.
- Ohtsuka H., Ohki K., Tanaka T., Tajima M., Yoshino T., Takahashi K., (1997). Circulating Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 after administration of LPS in Adult Cows. *J. Vet. Med. Sci.* 59: 927-929.
- Orsi N.M., Gopichandran N., Ektobe U.V., Walker J.J., (2006). Murine serum cytokines throughout the estrous cycle, pregnancy and post partum period. *Anim. Reprod. Sci.* 96: 54-65.
- Overton T.R., Drackley J.K., Ottemann-Abbamonte C.J., Beaulieu D., Emmert L.S., Clark J.H., (1999). Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand in ruminants. *J. Anim. Sci.* 77: 1940-1951.
- Pedersen B.K., Ostrowski K., Rohde T., Bruunsgaard H., (1998). The cytokine response to strenuous exercise. *CAN. J. Physiol. PHARM.* 76 (5): 505-511.

- Petersen E.W. and Pedersen B.K., (2002). Exercise and immune function – Effect of Nutrition. In “Nutrition and Immune Function” edited by Philip C.Calder, London (UK). 347-355.
- Petersen, H.H., Nielsen, J.P. & Heegaard, P.M. (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.* 35: 163-187.
- Rezamand P., Hoagland T.A., Moyes K.M., Silibart L.K., Andrew S.M., (2007). Energy status, lipid soluble vitamins, and acute phase proteins in periparturient Holstein and Jersey Dairy cows with or without subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 90: 5097-5107.
- Richards C.D. e Gauldie, J. (1995). Role of Cytokines in acute-phase response. In “HumanCytokines: Their Role in Disease and Therapy”, edited by Aggarwal B.B. and Puri K.R., Blackwell Science, Cambridge (USA). 253-263.
- Schreiber G., Aldred A.R., Thomas T., Birch H.E., Dickson D.W., Guo-Fen T., Heinrich P.C., Northmann W., Howlett G.J., Dejong F.A., Mitchell A. (1986). Levels of messenger ribonucleic acids for plasma proteins in rat liver during acute experimental inflammation. *Inflam.* 10: 59-66.
- Schwab J.M. e Serhan C.N. (2006). Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of inflammation. *CURR. OPIN. PHARMACOL.* 6: 414-420
- Serhan C.N. (1997). Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epi-Lipoxins (ATL): A jungle of Cell-cell interactions or a therapeutic Opportunity?. *Prostaglandins* 53: 107-137.
- Serhan CN., Fierro I.M., Chiang N., Pouliot M. (2000). Cutting edge: nociception stimulates neutrophil chemotaxis and recruitment: inhibition by aspirin-triggered-15-epi-lipoxin A<sub>4</sub>. *J Immunol.* 166: 3650-3654.
- Serhan CN., Gotlinger K., Hong S., Arita M. (2004). Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostag. Oth. Lipid M.* 73: 155-172
- Serhan CN., Savill J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *NAT. Immunol.* 12: 1191-1197.

Serhan CN. e coll. (2006). Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes. *J. Immunol.* 176: 1848-1859.

Shurster D.E., Kehrl M.E., Stevens M.G., (1993). Cytokine production during endotoxin-induced mastitis in lactating dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 54: 80-85.

Simpson, K.L., Keelan, J.A. & Mitchell, M.D. (1998). Labor-associated changes in interleukin-10 production and its regulation by immunomodulators in human choriodecidual. *J. Clinical Endocr. Metab.* 83: 4332-4337.

Sordillo L.M., Aitken S.L., (2009). Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128:104-109.

Suriyasathaporn W., Daemen A. J. J. M., Noordhuizen-Stassen E. N., Dieleman S. J., Nielen M., Schukken Y. H., (1999). B-Hydroxybutyrate levels in peripheral blood and ketone bodies supplemented in culture media affect the in vitro chemotaxis of bovine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 68: 177-186.

Suriyasathaporn W., Heuer C., Noordhuizen-Stassen E. N., Schukken Y. H., (2000). Hyperketonemia and the impairment of udder defense: A review. *Vet. Res.* 31: 397-412.

Taylor B.C. Keefe R.G., Dellinger J.D., Nakamura Y., Cullor J.S., Stott J.L., (1997). T cell populations and cytokine expression in milk derived from normal and bacteria- infected bovine mammary glands. *Cell Immunol.* 182: 68-76.

Trevisi E., Calamri L., Bertoni G., (2001). Definition of a liver activity index in the transition dairy cow and its relationship with the reproductive performance. *Proc. X Int. Symp. of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, 4-7 July, Salsomaggiore-Parma, Italy. 118-119

Trevisi E., Ferrari A.R., Archetti I., Bertoni G. (2005). Anti-inflammatory treatments in calving dairy cows: effects on haematological and metabolic profiles. 16° Congresso Nazionale ASPA, Torino. *J. Ital. Anim. Sci.* 4 (suppl.2): 203-205.

Trevisi E. Gubbiotti A. Bertoni G., (2007). Effects of inflammation in peripartum dairy cows on milk yield, Energy balance and efficiency. 2end International Symposium on energy and protein

metabolism and nutrition, Vichy (France), 9-13 Septembre. In “Energy and protein metabolism and nutrition-EAAP 124”, edited by: I. Ortigues-Marty. 395-396.

Trevisi E. e Bertoni G., (2008). Attenuation with Acetylsalicylate Treatments of Inflammatory Conditions in Periparturien Dairy Cows. In: Aspirin and Helath Research Progress Editor: Paul I. Quinn. 22-37.

Trevisi E., Amadori M., Bakudila A., Bertoni G., (2009). Metabolic changes in dairy cows induced by oral, low-dose interferon-alpha trestment. J. Anim. Sci. 87: 3020-3029.

Trevisi E., Amadori M., Cogrossi S., Bertoni G. (2010a). Metabolic stress and interleukin-6 response in high-yielding, periparturient dairy cows. 9th IVIS (International Veterinary Immunology Symposium), August 16-20, 2010, Tokyo, Japan. 138.

Trevisi E, Ferrari A, Piccioli-Cappelli F., Grossi P., Bertoni G., (2010b). An additional study on the relationship between the inflammatory condition at calving time and net Energy efficiency in dairy cows. In: “Energy and protein metabolism and nutrition- EAAP publication No.127”. Wageningen Academic Publishers. 489-490.

Trevisi E., Zecconi A., Bertoni G., Piccinini R., (2010c). Blood and milk immune and inflammatory profiles in periparturient dairy cows showing a different liver activity index. J. Dairy Res. 77: 310-317.

Trevisi E., Amadori M., Archetti I., Lacetera N., Bertoni G., (2011). Inflammatory response and acute phase proteins in the transition period. High-Yielding Dairy Cows. In: “Acute phase proteins ad early non-specific biomarkers of human and veterinary diseases” edited by Francisco Veas INTECH, Rijeka, Croatia. Cap.14. 355-380 (Accepted).

Turnbull A.V. e River C.L., (1999). Regulation of the hypothalamic – pituitary – adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. Physiol. Rev. 79: 1

Van Dyke T.E., Serhan C.N., (2003). Resolution of Inflammation: a New paradigm for the Pathogenesis of periodontal diseases. J. Dent Res. 82: 82-90.

Vernay M.C.M.B., Wellnitz O., Kreipe L., van Dorland H.A., Bruclmaier R.M. (2011). Local and systemic response to intramammary LPS challenge during long-term manipulated plasma glucose and insulin concentrations in dairy cows. *J. Dairy Sci.* (submitted).

Zarrin M., De Matteis L., Vernay M.C.M.B., Morel C., Wellnitz O., Kreipe L., van Dorland H.A., Bruclmaier R.M. (2011). Induced hyperketonemia in dairy cows by long-term (48 h) BHB infusion and effects on milk yield and feed intake. Induced hyperketonemia in dairy cows by long-term (48 h) BHB infusion and effects on milk yield and feed intake. The 7<sup>th</sup> International Conference on Farm Animal Endocrinology, 24-26 Agosto 2011, Svizzera (abstract).

Waldron M.R., Nishida T., Nonnecke B.J., Overton T.R., (2003). Effect of lipopolysaccharide on indices of peripheral and hepatic metabolism in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 86: 3447-3459.

Wallace R.L., McCoy G.C., Overton T.R., and Clark J.H., (1996). Effect of adverse health events on dry matter consumption, milk production, and body weight loss of dairy cows during early lactation. *J. Dairy Sci.* 79 (Suppl. 1): 205. (Abstr.).

Wang J.F., Wang M., Ma J.L., Jiao L.G., Zhou X.Y., Lindberg J.E., (2006). The influence of Intramammary Lipopolysaccharide Infusion on serum Ca, P, Vitamin D, Cytokines and Cortisol Concentrations in lactating Sows. *J. Vet.Med.* 53: 113-118.

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. *Physiol. Genomics.* 39: 1-13.

## **Ringraziamenti**

Desidero esprimere la mia gratitudine alle persone che mi hanno costantemente seguita, consigliata ed affiancata in questo lungo percorso durato 3 anni.

Ringrazio l'Illustrissimo Professore Giuseppe Bertoni che ha potenziato le mie conoscenze in materia di fisiologia animale.

Ringrazio il Professore Erminio Trevisi, la Dottoressa Rosanna Lombardelli e la Dottoressa Annarita Ferrari per i loro saggi consigli e per la costante collaborazione offertami.

Ringrazio il Professore Rupert Bruckmaier per aver contribuito all'arricchimento delle mie esperienze professionali.

Ringrazio tutti i ragazzi del Centro di Fisiologia Veterinaria in Posieux per essermi stati vicino durante i 6 mesi di esperienza all'estero.

Ringrazio l'Illustrissimo Professore Donato Matassino ed la Professoressa Maria Carmela Barone per avermi incoraggiata e sostenuta sempre.

Ringrazio il Dottore Andrea Minuti e il Dottore Paolo Grossi che hanno pazientemente sopportato le mie continue richieste d'aiuto ogni volta che cedevo davanti all'ennesimo mistero del SAS e dell'informatica.

Ringrazio la mia banca personale senza la quale io non avrei mai potuto raggiungere nessun obiettivo, perchè "la mia banca è differente" ed è costituita da mio padre, da mia madre, da Renata ed Alessandro, da Flora, Raffaele ed il piccolo Giuppy, da zia Rosa, Alessandra, Giuseppe e la Nonna Flora.

Ringrazio Paolo, Marco e Valentina con i quali ho condiviso esperienze di vita indimenticabili.

Ringrazio Fiorella, Giorgia e Agness per avermi regalato momenti di svago e di divertimento ed incoraggiata nelle difficoltà.

Ringrazio i ragazzi del FanClub "Napoli Piacenz@zzurra" per aver colorato di azzurro la mia permanenza in questa città.