



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CLINICHE VETERINARIE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE

INDIRIZZO SCIENZE CLINICHE VETERINARIE

XXII° CICLO

**CORRELAZIONE TRA LA RISPOSTA AL TEST DA CARICO DEL
GLUCOSIO E L'INCIDENZA DI ALCUNE PATOLOGIE
METABOLICHE NELLA VACCA DA LATTE**

Direttore Della Scuola: Ch. Mo Prof. Massimo Morgante

Coordinatore d'Indirizzo: Ch.Mo Prof. Maurizio Isola

Supervisore: Ch.Mo Prof. Massimo Morgante

Dottorando: Mauro Casalone

Sommario

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ABSTRACT..... | 1 |
| RIASSUNTO | 3 |
| PREMESSA | 6 |
| INTRODUZIONE..... | 8 |
| Bilancio Energetico Negativo..... | 12 |
| Energia Richiesta | 12 |
| Assunzione di Energia | 13 |
| Concentrazione bassa di insulina..... | 15 |
| Conseguenza sulla Ripartizione del Glucosio..... | 15 |
| Conseguenza sulla Mobilizzazione dei Tessuti..... | 16 |
| Bassa Risposta Insulinica | 18 |
| Definizione | 18 |
| Insulino Resistenza nei Differenti Stati Metabolici | 20 |
| Coinvolgimento dell'Asse Somatotropico | 21 |
| Cambiamenti Endocrini nel Transition Period | 22 |
| Metabolismo dei Lipidi Epatici | 24 |
| Processo Ossidativo | 25 |
| Via della Riesterificazione e Ridistribuzione..... | 25 |
| Disordini Metabolici Correlati ai Lipidi..... | 29 |
| Rapporto del fenomeno dell'insulino resistenza per lo sviluppo della lipidosi epatica e la chetosi. | 33 |
| Complicazione del Transition Period: Processo Infiammatorio..... | 33 |
| Immunodepressione | 35 |
| Scopo della Tesi | 36 |
| MATERIALI E METODI..... | 37 |
| Progetto | 37 |
| Soggetti inclusi nel progetto..... | 37 |
| Procedura Sperimentale | 38 |
| Analisi Ematiche..... | 39 |
| Monitoraggio dati per singole bovine..... | 39 |
| Analisi Statistica | 41 |
| RISULTATI | 43 |

| | |
|--------------------|----|
| DISCUSSIONE..... | 55 |
| CONCLUSIONI | 61 |
| BIBLIOGRAFIA | 63 |

ABSTRACT

Most of the metabolic diseases of dairy cows occur within the transition period and most periparturient abnormalities have some metabolic element as a component of the sufficient cause of clinical disease. In particular, during the transition period, the glucose requirements are considerably high and lipid metabolism is related to insulin secretion and sensibility. The aim of this study was to evaluate cows response to a field glucose tolerance test (FGTT) in order to identify potential differences in energetic metabolism assessment in early lactation and the incidence of principal postpartum diseases. 78 dairy cows in late dry period (10 ± 5 days from predicted calving) have been submitted to a FGTT that consisted in i.v. injection of 0.5g of glucose per kg of body weight. Glycaemia was measured before the glucose infusion (T0) and at 80 minutes (T80) after the infusion and T80/T0 ratio was calculated in order to subdivide animals into 2 groups: $T80/T0 < 1.05$ (group normal), $T80/T0 > 1.05$ (group control). A blood sample was collected during early lactation (5-15 days of lactation) and analyzed for the following parameters: NEFA, B-OHB, cholesterol, insulin, glucose, albumin and urea. Data were analyzed by ANOVA to verify the effect of the group using SIGMA STAT 3.05. The results show a statistical significant difference for B-OHB ($P < 0.05$) between group normal (0.43 ± 0.16 mmol/L), group control (1.66 ± 0.13 mmol/L) and NEFA between group normal (0.29 ± 0.05 mEq/L), group control (0.44 ± 0.05); incidence of Subclinical Ketosis ($P < 0.05$) between group normal (20%) and group control (57%); and BCS at dry period ($P < 0.05$) between group normal (3.32 ± 0.05), and group control (2.89 ± 0.29). These data suggest that this field GTT could be used to assess metabolic risk of dairy cows to develop postpartum diseases as retained placenta and subclinical ketosis. Further investigations need to confirm

these data and to understand the pathogenic factors involved in these correlation.

RIASSUNTO

Le principali patologie metaboliche si verificano nel periodo di transizione per un'alterazione del metabolismo energetico.

Tali patologie sono considerate come fattori limitanti per una bovina in quanto compromettono la carriera produttiva e riproduttiva della bovina stessa.

Sono, inoltre, considerate una perdita economica perché incidono notevolmente sui costi diretti ed indiretti di un'azienda.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare la risposta delle vacche ad un test da campo di tolleranza al glucosio (FGTT), al fine di individuare se esiste una correlazione tra tale risposta e lo stato del metabolismo energetico e soprattutto l'incidenza delle principali patologie metaboliche riscontrate all'inizio della lattazione.

La prova è stata condotta su 78 bovine alle quali è stata somministrata per via endovenosa una soluzione glucosata al 50% a 10 ± 5 giorni prima del parto ed è stato valutato il rapporto della glicemia prima della somministrazione (T0) e dopo 80' (T80).

Gli animali sono stati suddivisi in 2 gruppi: animali che presentavano un rapporto $T80/T0 < 1.05$ gruppo controllo e animali che presentavano un rapporto $T80/T0 > 1.05$ gruppo patologico. Sono stati anche raccolti campioni di sangue prima della somministrazione di glucosio e a 5 giorni dopo il parto e a 15 giorni dopo il parto.

I risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica attraverso l'uso del software SIGMA STAT 3.05 mediante l'analisi della varianza (ANOVA) utilizzando la procedura "GLM" per osservazioni ripetute a due vie al fine di valutare l'effetto del periodo (T0, T80, +5gg, +15gg) e del gruppo (controllo e patologici) sui parametri ematici e sanitari.

I risultati hanno dimostrato una differenza statisticamente significativa tra i seguenti parametri:

Per il B-OHB ($P < 0.05$) tra il gruppo controllo (0.43 ± 0.16 mmol/L), gruppo patologico (1.66 ± 0.13 mmol/L) i NEFA tra il gruppo controllo (0.29 ± 0.05 mEq/L), gruppo patologico (0.44 ± 0.05); l'incidenza di Chetosi Subclinica ($P < 0.05$) tra il gruppo controllo (20%) e il gruppo patologico (57%); e il BCS in asciutta ($P < 0.05$) tra il gruppo controllo (3.32 ± 0.05), e il gruppo patologico (2.89 ± 0.29). questi dati suggeriscono che il test da carico del glucosio (FGTT) potrebbe essere usato per valutare il rischi di patologie metaboliche all'inizio lattazione nelle vacche da latte. Per poter confermare questi dati e capire meglio la correlazione che esiste tra patologie metamoliche e metabolismo energetico sono necessarie ulteriori indagini.

PREMESSA

Le patologie post-partum della bovina da latte rappresentano un grave problema per l'allevamento e sono anche causa di notevoli perdite economiche.

Tali perdite si riferiscono a:

- Diminuzione della produzione lattea,
- Maggior riforma degli animali (vacche e vitelli),
- Aumento delle spese extra per prestazioni veterinarie, terapie e farmaci.

Un programma di prevenzione che permetta di diminuire l'incidenza di queste patologie potrebbe essere un'opportunità professionale per i veterinari pratici, oltre che un vantaggio economico per l'allevatore.

Sebbene questi argomenti abbiano da sempre stimolato l'interesse di molti ricercatori, ancora oggi è difficile poter prevenire alcune situazioni o quanto meno prevederle per attuare delle scelte strategicamente risolutive ed efficaci, anche perché l'idea della prevenzione non è mai entrata a pieno nella mentalità dei veterinari e degli allevatori.

All'inizio della fase produttiva della bovina diversi sono i fattori che incidono sul possibile sviluppo di tali patologie come ad esempio:

- La diminuzione dell'assunzione di sostanza secca,
- Il bilancio energetico negativo,
- Un'asciutta non corretta, dal punto di vista gestionale, sanitario e nutrizionale,
- Sovraffollamento.

Queste patologie possono essere inquadrare in momenti fisiologici del metabolismo ben definiti come ad esempio:

- 1) **Lo stato di ingrassamento** e la funzionalità epatica e pancreatica degli animali con le relative ripercussioni sull'omeostasi del metabolismo energetico e sulla risposta infiammatoria dell'individuo
- 2) **Lo stato delle riserve minerali** e del metabolismo ad esse correlato con particolare riguardo alla regolazione dei livelli della calcemia.
- 3) **Lo stato della funzionalità** e delle fermentazioni ruminanti con particolare riguardo alla:
 - Produzione di acidi grassi volatili,
 - Endotossine,
 - Permeabilità ruminale ed effetti che questo stato comporta sulla salute animale.

INTRODUZIONE

Negli ultimi dieci anni i moderni allevamenti di bovini da latte si sono sviluppati più in modo intensivo che non estensivo. Mentre il numero totale degli allevamenti, in tutta Europa, è in continua diminuzione, la media del numero di vacche per allevamento e la media della produzione hanno subito un notevole aumento.

L'aumento dei livelli di produzione per vacca è il risultato di una selezione genetica, così come un rilevante miglioramento nei sistemi di alimentazione, nel benessere animale (housing) e nella gestione (Pryce et al. 2004).

Tuttavia, i vantaggi economici per le alte produzioni sono spesso offuscati da disordini metabolici, processi infiammatori e da problemi riproduttivi, aumentando, poi, i costi sia primari che secondari e con una conseguenza negativa, anche, sulla curva di lattazione (Cools et al 2008).

Nel giustificare questi problemi si è anche sostenuto che le vacche da latte ad alta produzione sono più soggette ad avere problemi sia riproduttivi che metabolici (Nebel e Mc Gillard, 1993).

Diversi studi sembrano davvero giustificare queste affermazioni.

Infatti, diversi report riproduttivi mettono in risalto gli scarsi indici riproduttivi delle vacche ad alta produzione nei confronti di quelle a bassa produzione (Beam e Butler, 1997).

Tuttavia, l'interazione tra produzione e fertilità non è così netta come spesso si vuole considerare, infatti, in queste valutazioni ci possono essere, anche, dei fattori che inducono a valutazioni non corrette, sovrastimando o sottostimando gli effetti negativi della produzione sulla fertilità (Lucy, 2001).

Simili considerazioni si possono relazionare anche tra produzione e disordini metabolici o problemi infettivi.

Alcuni studi retrospettivi hanno messo in relazione un'elevata incidenza di ritenzioni di placenta, mastiti, chetosi, collasso puerperale e

dislocazione dell'abomaso in vacche con alte produzioni (Fleischer et al. 2001).

Recentemente anche queste supposizioni sono state contestate, perché non hanno trovato correlazione tra vacche con elevato potenziale produttivo e incidenza tra disordini metabolici e infezioni, salvo che per le mastiti inizio lattazione (Ingvartsen et al 2003).

Riassumendo è veramente difficile trovare la giusta causa tra produzione e disfunzioni metaboliche e riproduttive.

La maggior parte delle malattie si verificano durante un arco di tempo che si estende all'incirca da 3 settimane prima del parto a 3 settimane dopo il parto, in letteratura, questo periodo viene definito come "transition period" (Ingvartsen et al 2003, Kelton et al 1998).

L'inizio della lattazione è generalmente caratterizzato da un Bilancio Energetico Negativo (BEN), a causa di una aumentata richiesta di energia per la produzione di latte e una contemporanea diminuzione di Assunzione di Sostanza Secca (DMI).

Quindi, in caso di deficit energetico, la vacca mobilizzerà le proprie riserve di grasso e di proteine per assicurarsi l'energia necessaria per mantenere la produzione di latte.

Negli ultimi anni si è selezionato molto di più sulla produzione, favorendo il consumo di energia verso la mammella a discapito della capacità della reale assunzione di sostanza secca (DMI) (Van Arendonk et al 1991).

Di conseguenza, la selezione genetica per la produzione di latte ha aumentato il divario tra l'energia consumata e quella assunta, obbligando l'animale a utilizzare quasi in maniera aggressiva le proprie riserve energetiche nel transition period (Friggens et al 2007).

Dando origine alla formazione di Acidi Grassi non Esterificati (NEFA) e Corpi Chetonici i quali alterano le normali funzioni fisiologiche dei vari organi intervenendo in modo negativo sul fegato sulla riproduzione e sul sistema immunitario e sono strettamente correlati all'incidenza finale dei

disordini metabolici (Le Blanc et al, 2005) e riproduttivi (Silke et al, 2001) a discapito, comunque della produzione.

L'associazione tra produzione e incidenza alle patologie si potrebbe sintetizzare come una selezione sempre più spinta per la produzione che ha creato una vacca da latte sempre più sensibile alle carenze sia del management che della nutrizione.

Quindi le vacche selezionate soprattutto per la produzione hanno come priorità di utilizzare il maggior apporto di energia per la mammella, anche se questo è considerato un fattore di rischio per il possibile sviluppo delle patologie metaboliche ad inizio lattazione.

Raramente i problemi che si verificano nel transition period sono degli eventi isolati, ma piuttosto come eventi più complessi che coinvolgono il bovino sia sugli aspetti produttivi e riproduttivi.

Perciò, piuttosto che considerare i problemi del periparto come eventi indipendenti sarebbe meglio focalizzare come questi processi metabolici conducano ad un deterioramento dello stato catabolico dell'organismo influenzando diversi organi.

In questo contesto l'insulina sembra assumere un'importanza notevole per i seguenti motivi:

- La riduzione della concentrazione dell'insulina e la risposta periferica all'insulina sopprime il consumo di glucosio ai tessuti periferici, considerati tessuti insulino dipendenti, come i muscoli e il grasso, e migliorando la disponibilità del glucosio per i tessuti insulino dipendenti come la mammella (Bell, 1995). Insulina interviene, anche, nei processi di mobilizzazione dei lipidi e delle proteine.
- La secrezione e la risposta di insulina nell'uomo pare sia un fatto genetico (Bell, 1995) gli effetti collaterali di una intensa selezione per la produzione nella vacca da latte potrebbero aver modificato la secrezione dell'insulina e la risposta periferica della stessa.
- Inoltre, è stata descritta l'interazione diretta tra insulina e follicolo genesi (Spicer and Echterkamp, 1995). Quindi l'insulina potrebbe

essere coinvolta in una correlazione sfavorevole tra produzione e fertilità.

I mediatori metabolici e genetici della secrezione dell'insulina e della risposta nelle bovine sono appena documentati.

La raccolta di informazioni in questo campo è molto importante per poter migliorare la comprensione di ciò che accade a livello metabolico, riproduttivo e infettivo nella vacca da latte, questo è anche uno degli obiettivi della tesi.

Nonostante i costanti progressi nel cercare di capire la biologia e il metabolismo delle vacche da latte, il benefit economico di un'alta produzione è spesso offuscato da un'alta incidenza di patologie.

La maggior parte dei disturbi metabolici si verificano nello spazio che va tra la fine della gravidanza e l'inizio della lattazione (Goff and Horst, 1997).

Una delle principali priorità di tutti i mammiferi è quello di garantire all'inizio della lattazione l'energia attraverso il latte al neonato a discapito di tutte le altre funzioni (Bell, 1995).

Per stabilire questa gerarchia energetica, i tessuti extramammari passano da una riduzione dell'utilizzo del glucosio a una stretta dipendenza, invece, nell'utilizzare le riserve energetiche sia dal tessuto adiposo che da quello muscolare (Van Knegsel et al, 2007).

Il periodo che va dalla fine gravidanza all'inizio della lattazione è il momento di gran lunga più pericoloso nel ciclo della vacca da latte perché l'animale viene sottoposto a numerosi e drastici cambiamenti metabolici.

Il fabbisogno energetico e l'energia necessaria per ciascun organo all'inizio della lattazione differisce notevolmente da quella richiesta nel periodo di asciutta.

Le vacche devono far fronte ad un cambiamento ambientale, di gerarchia e non meno importante anche nutrizionale.

L'epitelio ruminale e la flora si devono adattare ai cambiamenti della dieta con una razione più ricca in energia e povera in struttura.

Il fegato ha bisogno di aumentare la produzione di glucosio e di metabolizzare il flusso delle riserve energetiche (Drackley, 1999). Un insuccesso di entrambe le funzioni, porterebbe ad una soppressione nella fornitura di energia.

In modo particolare nelle vacche ad alta produzione un deficit energetico condurrà ad una alterazione nei processi fisiologici dei vari tessuti per favorire e salvaguardare la fornitura di energia alla mammella.

In una certa misura le vacche possono far fronte a questo deficit energetico mobilizzando dai tessuti di riserva, ma un ulteriore utilizzo dell'energia dai tessuti di riserva aumenterà il rischio di patologie metaboliche, di problemi sulla riproduzione e un rischio maggiore di patologie infettive.

Bilancio Energetico Negativo

Energia Richiesta

L'energia necessaria per le vacche da latte viene espressa come energia netta per la lattazione, consiste principalmente in energia per il mantenimento e per la lattazione. L'energia richiesta per la gestazione diventa necessaria dopo i 190 giorni fidi gravidanza..

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

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

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

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

Assunzione di Energia

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

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

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

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

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

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

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

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

Meccanismi di Adattamento

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

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

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

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

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

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

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

Concentrazione bassa di insulina

Conseguenza sulla Ripartizione del Glucosio

L'assorbimento del glucosio all'interno delle cellule avviene mediante dei trasportatori di glucosio (GLUT). Sono stati identificati 12 tipi di GLUT. Per mezzo di questi trasportatori l'insulina riesce a controllare la ripartizione del glucosio nell'intero organismo (Zhao and Keating, 2007). Nei muscoli striati e nel tessuto adiposo, sono predominanti i GLUT4 insulino dipendenti.

Mentre nella mammella nei tessuti fetali e nel fegato si trovano principalmente i GLUT1, 2 e 3 che agiscono in maniera indipendente dall'insulina (Zhao et al, 2006; Zhao and Keating, 2007).

Il periparto è caratterizzato da una forte diminuzione della concentrazione basale dell'insulina e del rilascio dell'insulina pancreatico glucosio indotta (Bell, 1995 Holtenius, 2003).

Sebbene non abbia effetti diretti sulla lattogenesi, una bassa concentrazione di insulina riduce fortemente l'azione dei GLUT4 e quindi l'assorbimento del glucosio nei muscoli scheletrici e nel tessuto adiposo, aumentando la disponibilità di glucosio per i tessuti insulino indipendenti. Questi meccanismi permettono di aver un maggior assorbimento di glucosio a livello della mammella.

L'assorbimento del glucosio è costante e la mammella può consumare il 97% di tutta l'energia disponibile, energia fornita attraverso l'alimentazione (Drackley, 1999). La mammella può, inoltre, utilizzare l'85% di tutto il glucosio ematico (Knight et al, 1994 Zhao et al, 1996).

Conseguenza sulla Mobilizzazione dei Tessuti

Proporzionalmente al fabbisogno energetico che si ha all'inizio della lattazione, le vacche, per far fronte al deficit energetico, mobilizzano l'energia dalle proprie riserve corporee.

Questa mobilizzazione e quindi questa perdita di peso è possibile e misurabile mediante il Body Condition Score (BCS).

La perdita di BCS tra il parto e il picco di lattazione normalmente va da 0,5 a 1 punto, su una scala di 5 punti (Edmondson et al, 1989).

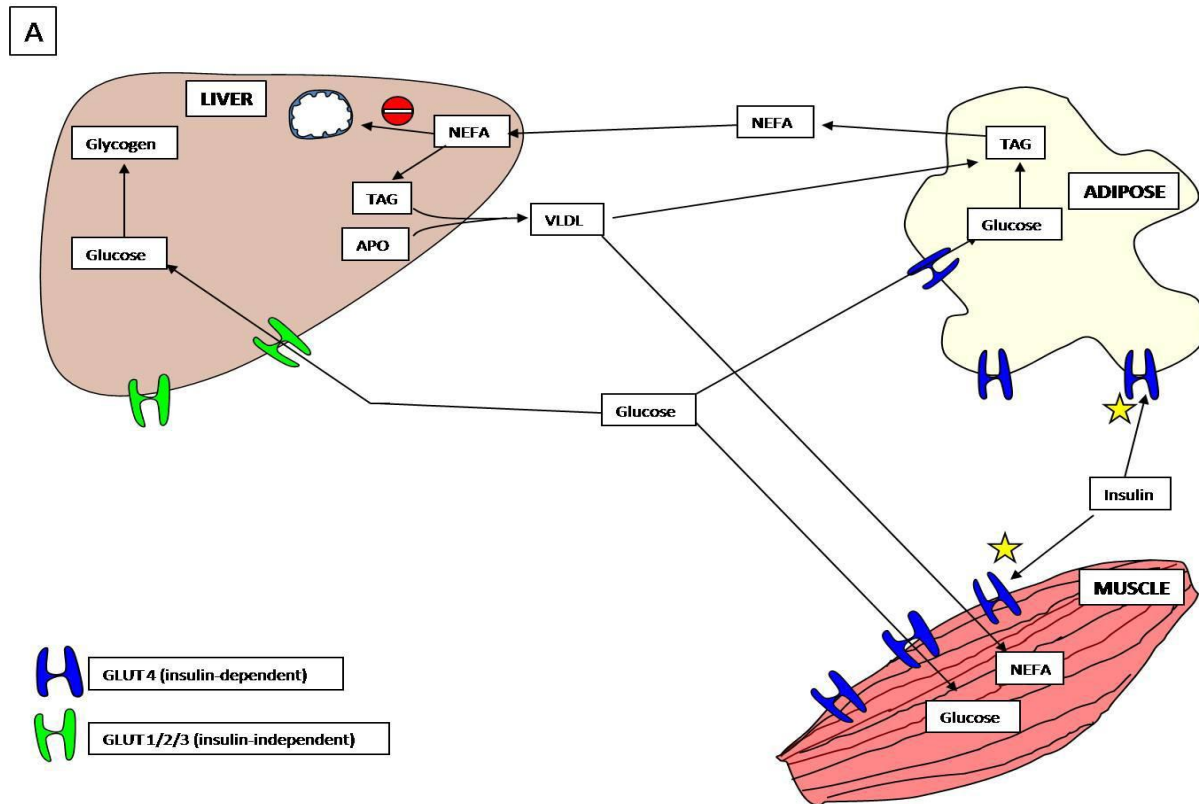
La perdita di 1 punto di BCS si riferisce a una diminuzione del 7-8% del peso corporeo (circa 60 Kg) e fornisce approssimativamente 417 MCal di energia netta (Oikawa and Otzel, 2006).

Il tessuto adiposo è in particolare un deposito di energia estremamente dinamico e flessibile (Tamminga et al 1997), infatti il grasso corporeo può essere facilmente immagazzinato e mobilizzato, in una lattazione una vacca può immagazzinare e mobilizzare fino a 100 Kg di grasso corporeo (Mc Namara, 1997). La concentrazione di acidi grassi non esterificati (NEFA) aumenta notevolmente in prossimità del parto e può anche raggiungere una concentrazione di $1000 \mu\text{mol/L}$ per diverse settimane (Herzog, 2001; Holtenius et al, 2003). L'insulina è il mediatore principale di questi processi di mobilizzazione. Una bassa concentrazione di insulina inibisce l'assorbimento di NEFA, di glicerolo e di glucosio attraverso la via degli adipociti per la diminuita attività delle lipoproteine lipasi e dell'espressione dei GLUT4 (Mc Namara, 1997).

L'insulina non influenza direttamente la proteolisi, ma una bassa concentrazione di insulina inibisce fortemente la sintesi delle proteine, spostando l'equilibrio tra accrescimento e mobilizzazione delle proteine del muscolo scheletrico a favore del catabolismo (Bell and Bauman, 1997). Si favorisce anche il rilascio di aminoacidi migliorando la disponibilità del glucosio, perché sono principalmente utilizzati per la gluconeogenesi a livello epatico. La diminuita concentrazione di insulina e l'aumentata concentrazione di glucagone all'inizio della lattazione

servono per attivare direttamente gli enzimi per la gluconeogenesi a livello epatico (Greenfield et al, 2000).

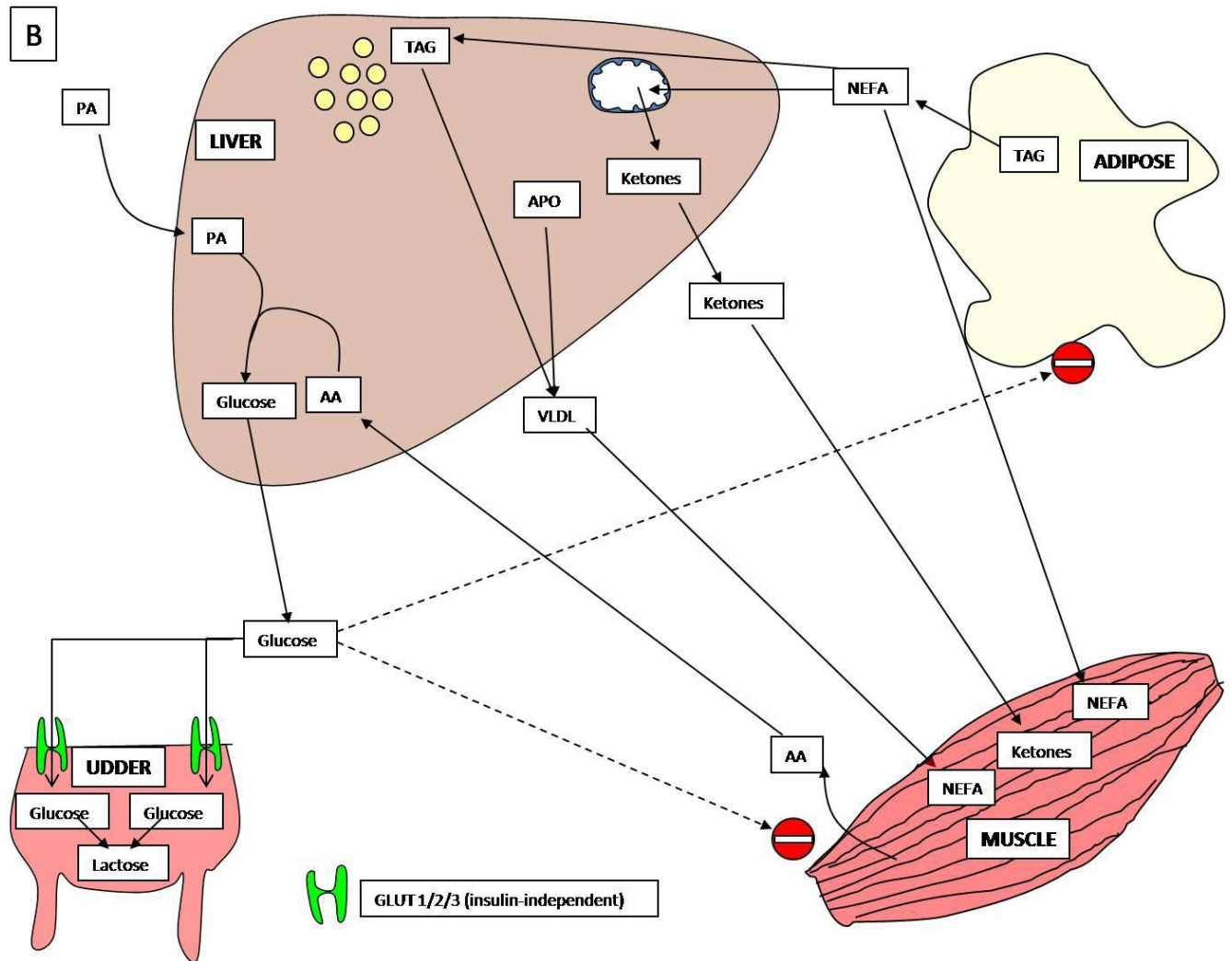
Figura 1. Suddivisione dell'energia durante il periodo di asciutta



Durante il periodo di asciutta il fabbisogno energetico viene facilmente soddisfatto. Alti livelli di insulina permettono ai grassi e ai muscoli striati di favorire l'assorbimento di glucosio attraverso i GLUT4 insulino dipendenti.

Inoltre, a causa di un'alta concentrazione di insulina, la lipolisi avviene a una velocità bassa; i NEFA depositati nel fegato sono trasformati in grassi di deposito come VLDL anziché seguire la via di β -ossidazione all'interno dei mitocondri.

Figura 2. Suddivisione dell'energia durante il periodo di lattazione



Bassa Risposta Insulinica

Definizione

Il normale segnale di trasferimento dell'insulina si verifica secondo la seguente modalità: l'insulina si lega ai suoi recettori, con conseguente fosforilazione dei recettori dell'insulina.

Questo a volte attiva dei messaggeri secondari, inclusa la fosfatidilinositol-3 kinase, i quali possono innescare o inibire una varietà di enzimi e proteine in un'ampia gamma di organi bersaglio.

Nei muscoli scheletrici e nel grasso, per esempio, un importante effetto di queste kinasi è l'attivazione e l'esteriorizzazione dei GLUT4 (Avruch 1998).

L'Insulino resistenza è definita come una condizione nella quale una certa concentrazione di insulina produce una risposta minore rispetto alla normale risposta biologica, questa può essere causata da una diminuzione dell'efficacia massima dell'insulina (diminuita risposta all'insulina), un aumento dell'efficacia della metà della concentrazione massima dell'insulina (diminuita insulino sensibilità) o una combinazione di entrambe.

Quando diminuisce l'insulino sensibilità i recettori dell'insulina, generalmente, diminuiscono la loro densità e affinità, mentre una diminuzione della risposta insulinica è associata ad una alterazione a livello di post-recettori (Herzog, 2001).

Insulino Resistenza nei Differenti Stati Metabolici

Una moderata insulino resistenza durante la gravidanza è stata osservata in diverse specie di mammiferi (Pere et al., 2000; Johnson, 2008).

Una diminuzione nell'assunzione di alimenti può peggiorare la forma di insulino resistenza, causando perdita di peso nell'animale senza che il feto ne risenta e perda peso. L'obiettivo dell'insulino resistenza è quello di favorire comunque l'energia al feto, anche se ci sono notevoli cambiamenti dello stato energetico nella madre (Peterson et al.1993).

L'insulino resistenza oltre che durante la gestazione può anche verificarsi durante la lattazione.

Per esempio, in un esperimento fatto in vitro si è notato su campioni di tessuto adiposo di animali in lattazione che l'insulina ha ridotto notevolmente l'assorbimento del glucosio rispetto ad uno stesso campione ma di animali non in lattazione (Vernon and Taylor, 1988).

Tuttavia, le difficoltà sorgono nella valutazione in vivo dell'insulino resistenza. L'interpretazione di un comune test per l'insulino resistenza è complicato per il semplice fatto che il consumo di glucosio è insulino indipendente per più dell'80% durante la lattazione (Holtenius and Holtenius, 2007).

Manifestazioni tipiche di insulino resistenza, così come iperinsulinemia e iperglicemia nell'uomo (Petersen and Shulman, 2006), sono nella vacca in lattazione di difficile interpretazione per via dei bassi valori ematici sia per il glucosio che per l'insulina associati a un BEN.

Sono stati eseguiti diversi test in vacche negli ultimi quindici giorni di asciutta, i metodi utilizzati sono stati o iperinsulinemia euglicemic clamp, glucosio intravenoso (GTT) o insulina challenges.

Coinvolgimento dell'Asse Somatotropico

Un importante fattore che altera la risposta dei tessuti all'insulina e l'ormone della crescita (GH).

L'ormone della crescita anche conosciuto come somatotropina è uno dei più importanti ormoni nel controllo della crescita e del metabolismo negli animali.

Uno dei principali effetti, anche nei bovini, è la stimolazione nella produzione del latte e della crescita muscolare inibendo il deposito dei grassi.

Un'altra importante azione di questo ormone è quella di stimolare la concentrazione serica di insulin-like growth factor-I (IGF-I) e si pensa che l'IGF-I possa mediare alcuni degli effetti del GH sia sulla crescita che sulla lattazione.

L'azione del GH sul IGF-I nel fegato e anche sulla concentrazione ematica dipende dallo stato nutrizionale dell'animale.

Il GH stimola meno o non aumenta la concentrazione serica di IGF-I in animali sottoalimentati o a digiuno, questo perché si crea a livello epatico una resistenza al GH e una ridotta stabilità dell'IGF-I nel siero.

In umana il GH sembra stimolare, anche, la concentrazione serica di insulina (Feng et al., 2009).

Il GH migliora la gittata cardiaca e, quindi, il flusso di sangue diretto alla mammella (Davis et al., 1988).

Il GH aumenta la produzione di energia per mantenere la produzione di latte, senza aumentare in concomitanza l'assunzione di sostanza secca (Bauman et al 1988).

Invece, uno dei principali effetti extra-mammari del GH è la stimolazione del consumo dei tessuti corporei attraverso l'alterazione della risposta all'insulina e alle catecolamine (Bell, 1995).

Negli adipociti, il GH amplifica la risposta allo stimolo lipolitico così come alle catecolamine (Sechen et al.,1990) e riduce la risposta

all'insulina (Bauman and Vernon, 1993), con un marcato aumento della lipolisi.

Nel muscolo e nel tessuto adiposo il GH diminuisce l'azione dei GLUT4 (Zhao and Keating,2007), che corrisponde ad una diminuzione dell'ossidazione del glucosio in favore dell'assorbimento del glucosio mammario (Bauman et al 1998).

Nel fegato, il GH diminuisce l'insulina-mediata con inibizione degli enzimi della gluconeogenesi, aumentando la produzione di glucosio epatico (Dunshae et al.,1992).

Nel complesso, questi dati supportano il concetto che il GH contribuisca, nell'alterazione dei tessuti, nella risposta all'insulina. Ciò avviene con una moderata produzione di glucosio e con una diminuzione della gluconeogenesi, il tutto favorisce una lipolisi all'inizio lattazione.

Cambiamenti Endocrini nel Transition Period

La concentrazione di acidi grassi liberi nel sangue inizia ad aumentare prima del parto e il picco si ha immediatamente dopo il parto, mentre il glucosio e l'insulina raggiungono i loro valori più bassi alcuni giorni dopo il parto (Grummer, 2008).

L'insulino resistenza si manifesta verso fine gravidanza, quando il bilancio energetico, generalmente, incomincia ad essere negativo e il GH è basso (Rhoads et al., 2004).

Questo implica il coinvolgimento dei mediatori lipolitici oltre quelli dell'insulina e il coinvolgimento degli induttori dell'insulino resistenza e quelli anche del Growth Hormone.

Si avrà anche un drastico cambio nella concentrazione dell'estradiolo, del progesterone e della prolattina prima del parto. Questi cambiamenti alterano la risposta degli adipociti agli stimoli dell'insulina e delle catecolamine (Mc Namara, 1997, Hayrli, 2006).

Le catecolamine e i glucocorticoidi aumentano in prossimità del parto.

Le catecolamine stimolano l'azione della triacil glicerol lipasi mentre i glucocorticoidi aumentano la risposta del tessuto adiposo agli stimoli adrenergici. Entrambi gli ormoni aumentano i livelli di glucosio nel sangue attraverso la glicogenolisi e la gluconeogenesi (Lay et al, 1992).

I cambiamenti dei composti elencanti sopra sono di breve durata rispetto al GH e all'insulina e il loro contributo all'assestamento metabolico è probabilmente limitato. Tuttavia, l'inizio dell'insulino resistenza e della lipolisi si ritiene che inizi tra l'ultimo periodo di gravidanza e l'inizio della lattazione (Bell and Bauman, 1997).

Adattamento del metabolismo epatico

I carboidrati della razione sono degradati dalla flora ruminale ad acidi grassi volatili.

I ruminanti hanno una limitata offerta diretta di glucosio, circa il 90% di tutto il glucosio viene sintetizzato direttamente dal fegato (Young,1977).

La richiesta giornaliera di glucosio può essere di 4Kg durante il picco di lattazione, questo spiega l'elevata gluconeogenesi epatica dovuta proprio all'elevata richiesta di glucosio.

Inoltre, il fegato deve adattare il suo metabolismo ai cambiamenti drastici e veloci degli alti livelli ematici dei lipidi.

Si può considerare il fegato come un punto di incrocio dei vari cambiamenti metabolici che avvengono durante il transition period.

Metabolismo dei Carboidrati nel Fegato

Nelle prime settimane di lattazione la produzione di glucosio epatico aumenta più del doppio rispetto al periodo dell'asciutta (Reynolds et al., 2003).

Gli enzimi della gluconeogenesi, piruvato carbossilasi e fosfoenol piruvato carbossilasi, aumentano fortemente la loro attività. A livello ormonale ci sono dei forti cambiamenti. Questi processi metabolici sono prevalentemente rivolti a garantire un risparmio energetico e di

conseguenza una minor distribuzione di glucosio agli organi periferici, favorendo così la ghiandola mammaria per la produzione di latte (Greenfield et al, 2000; Drackley et al, 2001).

A livello ruminale si deve garantire una produzione sufficiente di propionato, il quale è considerato il principale substrato glucogenico (dal 32 al 70% della gluconeogenesi totale), altre molecole che contribuiscono in minima parte alla gluconeogenesi sono il lattato, gli aminonoacidi e il glicerolo (Greenfield et al.2000; Reynolds et al, 2003). Quando la quantità di propionato è insufficiente a soddisfare la domanda di glucosio, come ad esempio all'inizio di lattazione, l'organismo si affida agli aminoacidi glucogenici e chetogenici, con un consumo graduale dei muscoli (Tamminga et al, 1997; Overton et al, 1998; Overton and Waldron, 2004).

Metabolismo dei Lipidi Epatici

Il lipidi contenuti nel plasma sono principalmente l'acetato e il butirrato, sono due acidi grassi volatili, i quali hanno origine dalla fermentazione ruminale e in particolare dalle fibre non digeribili. Vengono mobilizzati come acidi grassi non esterificati (Van Knegsel et al.,2005).

La composizione dei lipidi dopo il parto cambia completamente sia in qualità che in quantità, questo è dovuto principalmente a una notevole mobilizzazione dei grassi dal tessuto adiposo.

Una frazione di lipidi viene usata direttamente dalla mammella per la sintesi dei grassi oppure come fonte energetica per i tessuti periferici, ma una quota rilevante, proporzionale al flusso sanguigno epatico, arriva al fegato (Reynolds et al, 2003).

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

- Penetrano nei mitocondri e completano il processo biochimico dell'ossidazione

- Subiscono una riesterificazione e rientrano nel torrente circolatorio sottoforma di lipoproteine.

Processo Ossidativo

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

Quest'ultimo è un composto intermedio del metabolismo del propionato e dei grassi e viene anche considerato un "termometro" dell'energia (Grummer 1992).

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

All'interno dei mitocondri gli acidi grassi seguono la via della β ossidazione.

In questo processo durante la fase di BEN l'ossalacetato diventa un fattore limitante nel ciclo di Krebs, perché viene quasi totalmente utilizzato nella gluconeogenesi e di conseguenza nella formazione di corpi chetonici che sono la principale fonte energetica (Grummer, 1992, Van Knegsel et al, 2005).

Via della Riesterificazione e Ridistribuzione

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

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

Dato che il grasso contenuto nella razione del bovino è estremamente basso, una delle principali fonti per la lipogenesi del grasso è il tessuto adiposo anziché il fegato.

Tuttavia il fegato non è fisiologicamente organizzato per poter distribuire una così grande quantità di grassi. Questo potrebbe spiegare il motivo per il quale nei ruminanti a dispetto degli altri mammiferi le apolipoproteine e la secrezione di lipoproteine sono così basse da non sostenere l'approvvigionamento dei NEFA all'inizio lattazione. (Kato, 2002; Overton and altro, 2004).

Il contenuto medio di grasso a livello del fegato aumenta dallo 0,35% durante l'asciutta al 4,5%, per raggiungere anche il 10% nelle prime due settimane di lattazione. Durante il periodo di lattazione è possibile trovare animali che presentano gradi diversi di steatosi (Jorritsma et al, 2001).

Collegamento tra meccanismi di adattamento nel "transition cow" e alta incidenza di malattie

Le patologie del periparto non dovrebbero essere considerate come delle entità isolate, bensì sono strettamente correlate tra di loro interagendo in diversi processi metabolici.

Ad esempio animali che si presentano al parto con un BCS elevato hanno maggior probabilità di mettere a rischio la propria salute e di conseguenza l'intera lattazione rispetto ad animali con un BCS nella norma.

Le vacche obese hanno generalmente scarso appetito vicino al parto e sono più inclini a una maggior mobilizzazione dai tessuti corporei per sopperire al deficit energetico rispetto alle vacche più magre (Garnsworthy and Topps, 1992).

Inoltre, una razione ricca in amidi nel periodo dell'asciutta pare che possa favorire il fenomeno dell'insulino resistenza e scatenare una serie di

patologie metaboliche quali: la steatosi epatica, la chetosi (Holtenius et al, 2003) e l' ipocalcemia (Horst et al, 1990).

Le vacche con un BCS superiore al 4 sono anche più suscettibili ad avere parti distocici con conseguente ritenzione di placenta e problemi di immunodepressione (Lecetera et al, 2004).

Quindi, per riassumere, nel periodo di transizione l'animale si trova in un momento di deficit energetico. Per far fronte a questo si trova in uno stato catabolico dove vengono alterate le normali funzioni fisiologiche, si può avere una diminuzione o soppressione della secrezione dell'insulina a livello del pancreas, una riduzione della risposta insulinica nei tessuti periferici, una scarsa funzionalità epatica.

Ipoinsulinemia

Durante la lattazione la risposta insulinica al glucosio e al propionato, principale insulinogenico nelle vacche, è ridotta rispetto al periodo dell'asciutta.

La riduzione della concentrazione periferica all'insulina può risultare importante per una buona omeoresi. La soppressione cronica di insulina risulta ,invece, particolarmente dannosa in quanto favorisce un aumento della lipolisi, aumentando il rischio di patologie metaboliche (Holtenius and Traven, 1990).

Perciò l'identificazione dei fattori che regolano il rilascio di insulina nelle vacche da latte è di notevole importanza.

Studi fatti in umana e anche sui ratti hanno dimostrato che in tempi relativamente corti elevate concentrazioni di NEFA scatenano il rilascio di insulina.

Al contrario, una concentrazione elevata di NEFA, perdurante nel tempo, porta a un danneggiamento delle cellule β del pancreas con una riduzione di insulina e anche una riduzione della sua attività.

Questa esposizione elevata del pancreas ai NEFA gioca un ruolo centrale nello sviluppo del diabete di tipo II nell'uomo (Gravena 2002).

Un meccanismo simile a quello dell'uomo e del ratto sembra possibile anche nella vacca da latte, con concentrazioni di NEFA a livello ematico e con una diminuzione della secrezione dell'insulina. Tuttavia, è stata osservata una risposta minore delle cellule- β anche alla somministrazione di glucosio in soggetti con iperchetonemia e defedati, rispetto a soggetti normali (Hove, 1978).

I mediatori del rilascio dell'insulina e l'interazione tra NEFA e funzioni pancreatiche sono scarsamente documentate nelle vacche da latte.

Insulino resistenza

L'insulino resistenza descrive lo stato nel quale un livello fisiologico di insulina produce una risposta biologica ridotta rispetto a quella normale (Kahn, 1978)

Berson and Yalow (1970) hanno descritto l'insulino resistenza come una condizione nella quale una quantità maggiore di insulina è richiesta per produrre una risposta normale, ciò implica che l'insulino resistenza può essere alterata dall'insulina esogena.

Questo può essere vero quando l'insulino resistenza è dovuta al difetto localizzato a livello dei pre-recettori.

Tuttavia, l'insulina esogena può non alterare l'insulino resistenza quando i difetti sono localizzati a livello dei post-recettori.

L'insulino resistenza è un termine generico che può essere valutato dall'insulino-risposta (insulino risposta al glucosio), dall'insulino-sensibilità (risposta dei tessuti all'insulina).

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

- Prima dell'interazione dell'insulina con i recettori (a livello dei pre-recettori), il quale include una diminuita produzione di insulina, una aumentata degradazione dell'insulina o entrambi;

- Alterata interazione dell'insulina con i suoi recettori (a livello dei recettori), che includono un diminuito numero di recettori e un diminuita affinità di legame;
- Difetti associati con alterazione dell'azione dell'insulina a livello dei post-recettori, con conseguente danneggiamento del segnale intracellulare e la traslocazione dei GLUT.

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

Esistono dei test per determinare l'insulino resistenza o la intolleranza al glucosio, questi consistono nella tecnica per la valutazione della normoglicemia o nella valutazione della tolleranza al glucosio (GTT).

Disordini Metabolici Correlati ai Lipidi

La lipidosi epatica e la chetosi sono comuni patologie metaboliche riferite ai lipidi. Sono il risultato di incapacità di seguire i cambi omeoretici durante il parto (Herdt et al, 1983; Drackley et al, 1992).

L'eziologia della lipidosi epatica e della chetosi sono simili e le funzioni epatiche sono danneggiate in entrambi i casi.

Sono state predisposte diverse strategie nutrizionali per cercare di diminuire la gravità della lipidosi epatica e della chetosi (Hayirli et al, 2001).

La lipidosi epatica si riferisce ad un accumulo di lipidi negli epatociti (Pearson and Maas, 1990).

I trigliceridi sono i principali composti dei lipidi i quali si accumulano nel fegato sia di soggetti normali (Colin and Reid, 1980) che di soggetti obesi (Fronk et al., 1980).

Molte vacche nel periodo del periparto possono andare incontro ad una lipidosi o chetosi di diverso grado e severità (Grummer, 1993).

L'incidenza di una lipidosi epatica è di circa il 66% nelle Holstein (Reid, 1980) e la gravità della lipidosi epatica è in relazione al grado di mobilizzazione dei grassi di riserva contenuti nel tessuto adiposo (Roberts et al., 1981).

La lipidosi epatica è in grado di compromettere la produzione, il sistema immunitario, la fertilità, aumentando anche il rischio della chetosi (Drackley et al., 1992).

Elevate concentrazioni di NEFA nel sangue e di trigliceridi nel fegato nei primi giorni dopo il parto sono associate, anche, ad un graduale diminuzione dell'assunzione di sostanza secca (Grummer, 1995).

In associazione ad una maggiore assunzione di sostanza secca un'attività mitocondriale più bassa devia gli acidi grassi dal processo di esterificazione a quello di β ossidazione per proteggere gli epatociti da un ulteriore accumulo di trigliceridi (Bruss, 1993).

Gli acidi grassi non esterificati sono o trasportati direttamente alla mammella o sono assorbiti dal fegato in rapporto al flusso ematico e alla loro concentrazione plasmatica.

Nel fegato gli acidi grassi sono reesterificati a trigliceridi e possono accumularsi nel fegato o essere trasportati come lipoproteine a bassa densità (VLDL) oppure essere ossidati completamente e entrare nel ciclo dell'acido tricarbossilico o, ancora, essere ossidati in modo incompleto a corpi chetonici.

La lipidosi diventa un problema clinico quando c'è un aumentato assorbimento dei NEFA e il fegato non riesce a produrre sufficienti lipoproteine per detossificarsi.

Diversi fattori che causano la lipidosi epatica includono una aumentata quantità di acidi grassi a lunga catena, compromettendo la formazione di VLDL.

Per diminuire l'incidenza di lipidosi epatica bisognerebbe migliorare la capacità di rimuovere i trigliceridi dal fegato e di limitare la mobilizzazione degli acidi grassi dal tessuto adiposo (Grummer, 1993).

La concentrazione dei trigliceridi nel fegato è negativamente correlata con la concentrazione del glucosio ematico e la concentrazione di insulina e positivamente correlata con la concentrazione dei NEFA e del BHBA (Studer et al., 1993).

Quindi, aumentando l'assunzione di sostanza secca e il bilancio energetico mediante una maggior quantità di carboidrati fermentescibili nella dieta nel periodo di transizione, si favorisce aumento dei precursori gluconeogenici. Tutto ciò è associato ad un aumento della concentrazione del glucosio ematico e a una diminuzione della concentrazione dei NEFA e del BHBA, aumentando, anche, la concentrazione di glicogeno nel fegato e diminuendo la concentrazione di trigliceridi (Minor et al., 1998, Rabelo et al., 2003).

La chetosi si manifesta dopo la lipidosi epatica nelle vacche ad alta produzione (Reid, 1980) ed è caratterizzata da una diminuzione dell'appetito, da una diminuita produzione di latte e da una perdita di BCS, ipoglicemia, ipoinsulinemia, iperchetonemia, iperlipidemia ed è possibile avere o depressione del sensorio o addirittura ipereccitabilità (chetosi nervosa) con una deplezione del glicogeno epatico (Drackley et al., 1992).

La chetosi, generalmente, si manifesta dai 21 ai 28 giorni dopo il parto e aumenta il rischio per altre patologie metaboliche quali la dislocazione dell'abomaso (54,5 fold), ritenzione di placenta (16,4 fold), metrite (15,3 fold), e collasso puerperale (23,6 fold) (Correa et al., 1990).

Inoltre, una concentrazione di corpi chetonici nel sangue è anche in grado di diminuire l'attività del sistema immunitario attraverso una soppressione dell'azione dei linfociti (Sato et al., 1994).

I fattori nutrizionali, come ad esempio i carboidrati fermentescibili, utilizzati per cercare di contrastare la gravità della lipidosi epatica,

influenzano anche la chetogenesi (Hayirli and Grummer, 2004) sono mediati attraverso il potenziale effetto chetogenico dell'insulina (Schultz, 1971).

Gli effetti antichetogenici diretti e indiretti dell'insulina che includono una diminuzione dell'assorbimento dei NEFA al fegato stimolano la lipogenesi e inibiscono la lipolisi nel tessuto adiposo, aumentano a livello dei tessuti periferici l'utilizzo dei corpi chetonici, alterando le attività enzimatiche e la disponibilità dei substrati che sono coinvolti nella chetogenesi a livello epatico.

L'insulina diminuisce l'attività della CPT-1 e aumenta l'affinità della CPT-1 per il malonil CoA.

L'effetto inibitore dell'insulina sulla chetogenesi è anche riferito al suo effetto stimolatorio sull'attività del'Acetil CoA carbossilasi e la formazione di malonil CoA il quale inibisce l'attività della CPT-1 (Zammit, 1996).

Rapporto del fenomeno dell'insulino resistenza per lo sviluppo della lipidosi epatica e la chetosi.

L'insulino sensibilità diminuisce durante l'ultimo periodo di gravidanza (Samo et al., 1991).

I cambiamenti metabolici durante il periodo del parto sono controllati attraverso l'omeoresi. L'omeoresi si riferisce ad un meccanismo di controllo che coinvolge il coordinamento del metabolismo di tutti i tessuti necessari a favorire lo stato fisiologico.

Durante l'ultimo periodo di gestazione e l'inizio della lattazione sia il feto che la mammella hanno una priorità elevata nel ricevere una quantità di energia utile per le proprie funzioni fisiologiche.

Questa priorità coincide ad una diminuzione della risposta e della sensibilità dei tessuti extraepatici all'insulina, i quali, presumibilmente giocano un ruolo chiave nello sviluppo della lipidosi epatica e della chetosi (Holtenius, 1993).

Le vacche in chetosi hanno una risposta minore all'insulina e la chetoacidosi è una delle ragioni dell'insulino resistenza (Holtenius, 1993).

Complicazione del Transition Period: Processo Infiammatorio

I processi infiammatori nel parto, come ad esempio la ritenzione di placenta e la mastite, possono favorire un peggioramento dello stato di salute dell'animale, in modo particolare diminuendo la capacità funzionale del fegato.

Le malattie metaboliche all'inizio della lattazione influenzano lo stato energetico riducendo l'assunzione di sostanza secca, favorendo la lipolisi e aumentando l'attività del sistema nervoso simpatico (Mc Namara, 1997; Urton et al., 2005).

Il processo infiammatorio è caratterizzato dal rilascio delle citochine pro-infiammatorie e in particolar modo dal tumor necrosis factor- α e l'interleuchina 1 e 6 dai leucociti.

Le citochine aumentano la richiesta di energia attraverso il processo infiammatorio e mediante la risposta del sistema immunitario (Johnson and Finck, 2001).

Il fegato sintetizza le proteine positive della fase acuta principalmente l'aptoglobina, siero amiloide-A e la cerulo plasmina, mentre diminuiscono l'albumina, l'apolipoproteine, la transferrina (Bionaz et al., 2007; Bertoni et al., 2008).

Lo scatenarsi di questi eventi p considerato come un effetto protettivo dell'organismo (Petersen et al., 2004), ma può, anche, essere considerato un effetto negativo nel transition period.

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

Basse concentrazioni delle proteine negative della fase acuta (-AP) sono state, recentemente, associate a una ridotta funzionalità epatica (clearance della bilirubina), ad una diminuzione della produzione e anche a basse performance riproduttive (Bertoni et al., 2008).

Immunodepressione

L'inizio della lattazione è caratterizzato da una diminuzione delle funzioni del sistema immunitario. Le patologie metaboliche contribuiscono in modo considerevole a deprimere le funzioni immunitarie.

Una elevata concentrazione di estrogeni, di catecolamine e di glucocorticoidi al parto alterano le funzioni del sistema immunitario (Lacetera et al., 2005).

In animali con steatosi si è osservato anche una diminuzione dei leucociti (Wentink et al., 1997).

La secrezione di immunoglobuline e di interferone può essere influenzata dal BEN, da animali obesi e dalla steatosi (Wentink et al., 1997; Lacetera et al., 2005).

Una diminuzione della clearance delle endotossine nella steatosi (Breukink and Wensing, 1997) contribuisce ad una aumentata severità delle infezioni e dell'infiammazione.

Scopo della Tesi

Lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare la risposta delle vacche ad un test da campo di tolleranza al glucosio (FGTT), al fine di individuare se esiste una correlazione tra tale risposta e lo stato del metabolismo energetico e soprattutto l'incidenza delle principali patologie metaboliche riscontrate all'inizio della lattazione.

Nello specifico gli obiettivi di questo studio sono stati:

- Valutare l'applicabilità in campo di un test da carico del glucosio nella bovina da latte:
- Valutare il potere discriminante del test al fine di individuare bovine insulino sensibili (glucosio intolleranti).
- Individuare alcuni parametri ematici, produttivi e riproduttivi facilmente monitorabili in campo che permettano di evidenziare animali maggiormente soggetti a rischio di patologie metaboliche.

MATERIALI E METODI

Progetto

Lo studio oggetto della presente tesi è stato condotto da Luglio del 2008 a Settembre del 2009 in quattro Aziende da Latte della Provincia di Torino. Queste Aziende sono Iscritte all'Associazione Allevatori e sottoposte mensilmente ai controlli funzionali.

Il numero di animali medio per azienda è di circa 150, gli animali sono tutti di Razza Frisona Italiana con una produzione media di circa 90 q.li e con una percentuale di grasso e proteine di circa 3,64% e di 3,42% in 305 giorni di lattazione.

Il numero di lattazione medio per animale è di 2,8, le vacche sono stabulate in cuccette con paddock all'esterno e vengono regolarmente munte due volte al giorno.

L'alimentazione viene distribuita due volte al giorno con carro unifeed, sia per le vacche in lattazione che per le vacche in asciutta.

Gli alimenti utilizzati nella razione sono: insilato di mais, fieno di loietto, cotone, farina di mais, soia estrusa e integratori per coprire il fabbisogno. In due aziende è utilizzato anche il melasso.

Soggetti inclusi nel progetto

Sono state incluse 78 vacche pluripare provenienti da quattro allevamenti (circa 20 vacche per allevamento). Gli animali scelti erano in asciutta e precisamente nel periodo del close up a 10 ± 3 giorni dal parto.

Gli animali riscontrati in buone condizioni di salute in seguito ad accurata visita clinica sono entrati nel progetto. Il BCS non è stato considerato come fattore di esclusione, gli animali che dopo il test da carico e prima del parto hanno manifestato un qualsiasi tipo di patologia sono stati esclusi dalla prova e sostituiti da altri animali per raggiungere il numero totale di 78 animali.

Procedura Sperimentale

Test da Carico di Glucosio

La tecnica per la somministrazione del glucosio è la seguente:

Prelievo di un campione di sangue dalla vena giugulare per titolare la glicemia basale degli animali (T0), mediante un test rapido.

- somministrazione per via endovenosa (vena giugulare), con un deflussore a imbuto, di una soluzione di glucosio al 50% alla dose di 0,25mg/Kg p.v.
- prelievi di sangue dopo 80 minuti (T80) dalla somministrazione del glucosio.

Lo strumento utilizzato per la determinazione della glicemia è l'Accu-Chek® strumento in uso in umana per pazienti diabetici.

L'Accu-Chek® è di facile utilizzo e semplice consultazione, le caratteristiche di questo strumento sono:

- Principio di misura goccia di sangue e dopo pochi secondi viene visualizzato il valore della glicemia. è elettrochimico;
- Il range di misura va da un minimo di 0,6 mmol/l a un massimo di 33,3 mmol/l;
- Tempo di misura in circa 5 secondi;
- Range di Temperatura di utilizzo da +6°C a +44°C;

La modalità di lettura consiste nell'inserire una striscia reattiva che possiede una zona reattiva di colore giallo, sulla quale viene posta una goccia di sangue e dopo pochi secondi viene visualizzato il valore della glicemia

Analisi Ematiche

Alle bovine sottoposte alla prova sono stati eseguiti prelievi ematici secondo il seguente protocollo:

- contemporaneamente al prelievo della glicemia a T0 è stato prelevato un campione di sangue con provette con litio eparina;
- un secondo campione è stato prelevato dopo il GTT;
- altri campioni di sangue sono stati prelevati a 5 e 15 giorni dopo il parto.

Tutti i campioni di sangue sono stati centrifugati, il modello di centrifuga è la Ultra 8V centrifuga da banco a 8 posti, la velocità di centrifugazione è stata di 3000 giri per 15 minuti, il plasma ottenuto è stato stoccato e congelato a -18°C.

I parametri ematici analizzati in questa prova sono: NEFA (mEq/l), insulina (pmol/l), albumina (g/l), urea (mmol/l), glucosio (mmol/l), colesterolo (mmol/l), B.OHB (mmol/l).

Tutte le analisi sono state eseguite presso il Laboratorio di Analisi di Clinica Medica dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie mediante l'analizzatore biochimico automatizzato Boehringer Mannheim/HITACHI 911 (Roche, Basel, Svizzera).

Monitoraggio dati per singole bovine

Sono stati raccolti i dati delle singole bovine relativi alla situazione riproduttiva, produttiva e patologica.

I parametri rilevati sono:

- *BCS (Body Condition Score)*, secondo la procedura di Edmonson et al., (1989); si tratta di un metodo di valutazione visiva e tattile che dà la possibilità di valutare la condizione corporea di un animale, basandosi su una scala da 1 a 5: il punteggio 1 corrisponde ad un soggetto sottopeso, emaciato, mentre 5 indica una bovina obesa. Sono previsti anche punteggi intermedi di quarto di punto. I

rilevamenti sono stati effettuati sempre dallo stesso punteggiatore.

Il BCS è stato rilevato ad inizio asciutta ed al parto;

- Intervallo parto primo servizio;
- Intervallo parto concepimento;
- Dati produttivi (latte, grasso, proteine, cellule);
- Curve di lattazione (tipiche/atipiche);
- Patologie al parto: distocie, gemelli, ritenzione di placenta, metrite, chetosi, mastiti al parto, dislocazione dell'abomaso, zoppie): per tali valutazioni si è indicato presenza (1) o assenza (0).

La presenza di metrite e chetosi è stata rilevata tra i 5-12 giorni dopo il parto su tutti gli animali. La valutazione fatta in questo momento dopo il parto ci permette di valutare uno stato subclinico e non clinico.

Tutti gli animali che sono positivi a questi parametri verranno sottoposti a terapia.

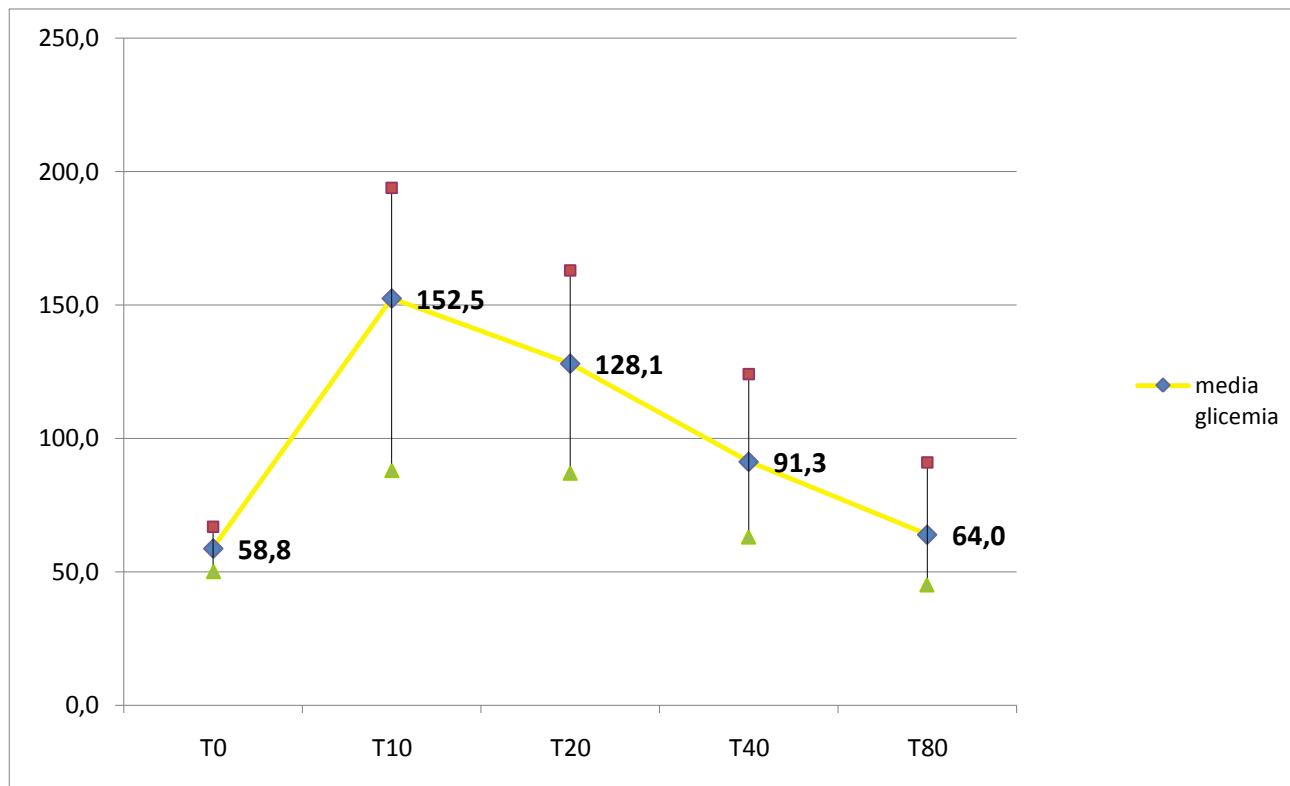
Per la chetosi si è utilizzato un test rapido mediante prelievo ematico per la valutazione del B-OHB in mmol/l, lo strumento utilizzato è l'Optium Xceed®. La valutazione dei corpi chetonici viene fatta mediante strisce reattive su sangue intero e la misurazione è di tipo quantitativo.

La valutazione delle metrite viene fatta osservando l'aspetto e l'odore delle lochiazioni. Si considera metrite quando le lochiazioni si presentano di color grigio-bruno e maleodoranti.

Analisi Statistica

Sulla base dei risultati di una prova precedente (Gianesella et al., 2009) effettuata su 18 animali che presentavano le stesse caratteristiche della prova in oggetto, si era creata una curva glicemica (grafico n.1) che aveva permesso di individuare sia il tempo necessario per ottenere la concentrazione massima di glucosio ematico sia quello necessario per il ritorno del glucosio ematico ai valori basali.

Grafico n.1. Andamento della glicemia in un gruppo di 18 animali di una prova preliminare sottoposti a test da carico del glucosio.



Come si può osservare dal grafico il ritorno della concentrazione del glucosio al valore basale si è raggiunto a T80.

Sulla base di queste osservazioni si è proceduto quindi alla suddivisione degli animali oggetto del presente studio in due gruppi in funzione del rapporto tra T80 e T0.

In particolare, si è deciso di usare come discriminante il valore 1.05 come rapporto T80/T0, in quanto questo valore, sempre sulla base della prova preliminare sui 18 animali, rappresenta il valore che statisticamente ($P < 0.01$) differenzia gli animali dal punto di vista della risposta al test da carico del glucosio.

Sulla base di tale evidenza, gli animali oggetto del presente studio che presentavano un rapporto $T80/T0 \leq 1.05$ sono stati inseriti nel gruppo degli animali potenzialmente sani (“controllo”), invece, gli animali con un rapporto $T80/T0 > 1.05$ sono stati inseriti nel gruppo degli animali con una risposta considerata alterata all’infusione di glucosio (“patologici”). (Gianesella et al., 2009)

I risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica attraverso l’uso del software SIGMA STAT 3.05 mediante l’analisi della varianza (ANOVA) utilizzando la procedura “GLM” per osservazioni ripetute a due vie al fine di valutare l’effetto del periodo (T0, T80, +5gg, +15gg) e del gruppo (controllo e patologici) sui parametri ematici e sanitari.

RISULTATI

In totale sono stati controllati 78 animali, di cui 53 con rapporto T80/T0 ≤ 1.05, definiti “controllo” e 25 con rapporto T80/T0 > 1.05 definiti “patologici”. I risultati dei parametri ematici sono indicati in tabella 1, suddivisi tra animali controllo ed animali patologici.

Tabella n. 1: Media ± SEM (media dell'errore standard) dei risultati ematici riscontrati nei 4 prelievi (T0, T80, +5 gg, +15 gg) distinti nei 2 gruppi (controllo, patologici)

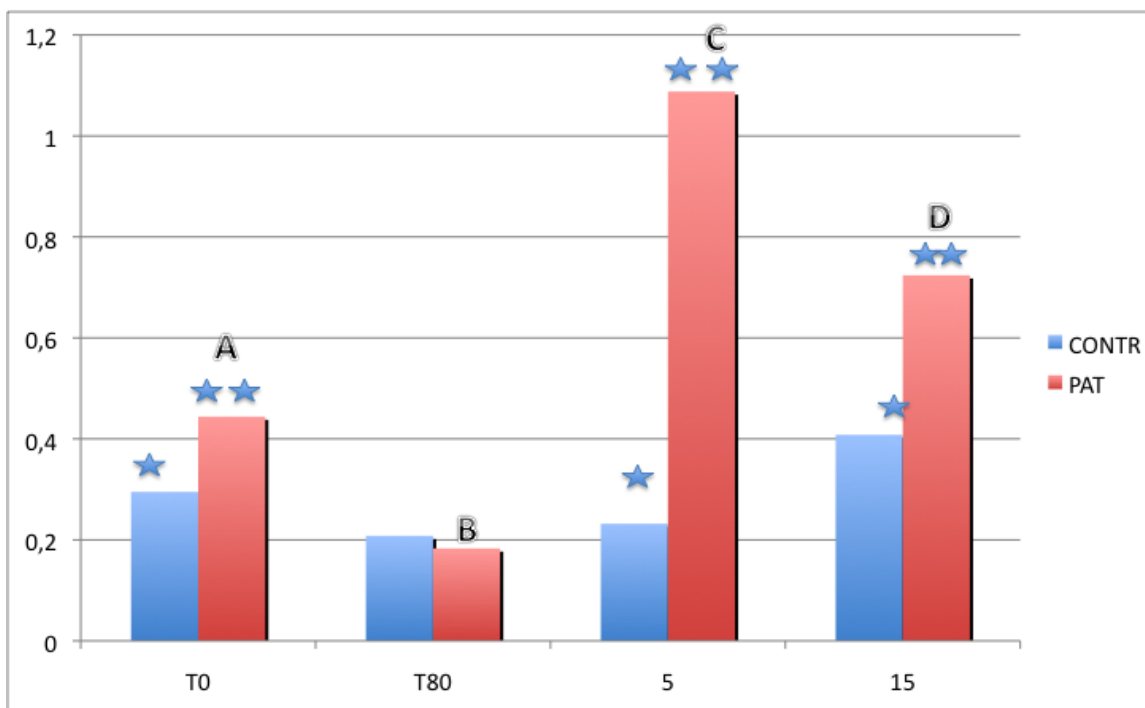
| | | VALORI NORMALI (§) | T0 | T80 | +5 GG PP | +15 GG PP |
|---------------------------|------------|-----------------------|--------------|-------------|--------------|------------------|
| NEFA mEq/l | CONTROLLO | 0.2-2 | 0.29±0.05* | 0.20±0.12 | 0.23±0.07* | 0.41±0.08* |
| | PATOLOGICI | | 0.44±0.05A** | 0.18±0.07B | 1.09±0.05C** | 0.72±0.06D* * |
| INSULINA pmol/l | CONTROLLO | 40-180 | 104.7±21.24 | 127.9±46.55 | 101.2±32.91 | 66.3±30.05 |
| | PATOLOGICI | | 114.2±20.03 | 166.6±27.81 | 53.5±21.24 | 83.5±22.19 |
| ALBUMI NA g/dl | CONTROLLO | 30-36 | 33.42±0.61 | 34.20±1.11 | 33.93±0.61 | |
| | PATOLOGICI | | 32.96±0.81 | 33.43±0.89 | 27.25±0.79 | 28.14±1.05 |
| UREA mmol/l | CONTROLLO | 2.00-7.50 | 3.24±0.18** | 4.18±0.45 | 3.56±0.26 | 3.82±0.29 |
| | PATOLOGICI | | 4.07±0.19AB* | 4.69±0.27A | 4.07±0.20AB | 3.40±0.21B |
| GLUCOSI O mmol/l | CONTROLLO | 2.70-4.12 | 2.98±0.19 | 2.64±0.46 | 3.13±0.28 | 2.73±0.31 |
| | PATOLOGICI | | 2.57±0.20 | 3.30±0.28 | 2.24±0.21 | 2.19±0.22 |
| COLESTE ROLO mmol/l | CONTROLLO | 2.08-3.12 | 2.38±0.11 | 2.50±0.29 | 2.70±0.17* | 2.52±0.18 |
| | PATOLOGICI | | 2.18±0.12A | 2.43±0.17A | 1.55±0.13B** | 2.21±0.14A |
| B.OHB mmol/l | CONTROLLO | 0.00-0.86 | 0.38±0.11 | 0.41±0.28 | 0.43±0.16** | 0.53±0.18 |
| | PATOLOGICI | | 0.43±0.12B | 0.47±0.16B | 1.60±0.13A* | 0.63±0.13B |

§ dati da Radostis et al., 2007

A,B,C: lettere diverse sulla stessa riga indicano differenze statisticamente significative (P<0.05)*,**: asterischi diversi sulla stessa colonna indicano differenze statisticamente significative (P<0.05).

Nei grafici 1-7 si possono inoltre notare i valori medi e le significatività tra i vari gruppi e nei vari periodi oggetto di studio.

Grafico n. 1: Valori medi dei NEFA (mEq/l) riscontrati nei 4 prelievi (T0, T80, +5 gg, +15 gg) distinti nei 2 gruppi (controllo, patologici).



*,** : asterischi diversi indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi all'interno del singolo periodo ($P < 0.05$)

A,B,C : lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i tempi all'interno del singolo gruppo ($P < 0.05$)

Grafico n. 2: Valori medi di Insulina (pmol/l) riscontrati nei 4 prelievi (T0, T80, +5 gg, +15 gg) distinti nei 2 gruppi (controllo, patologici).

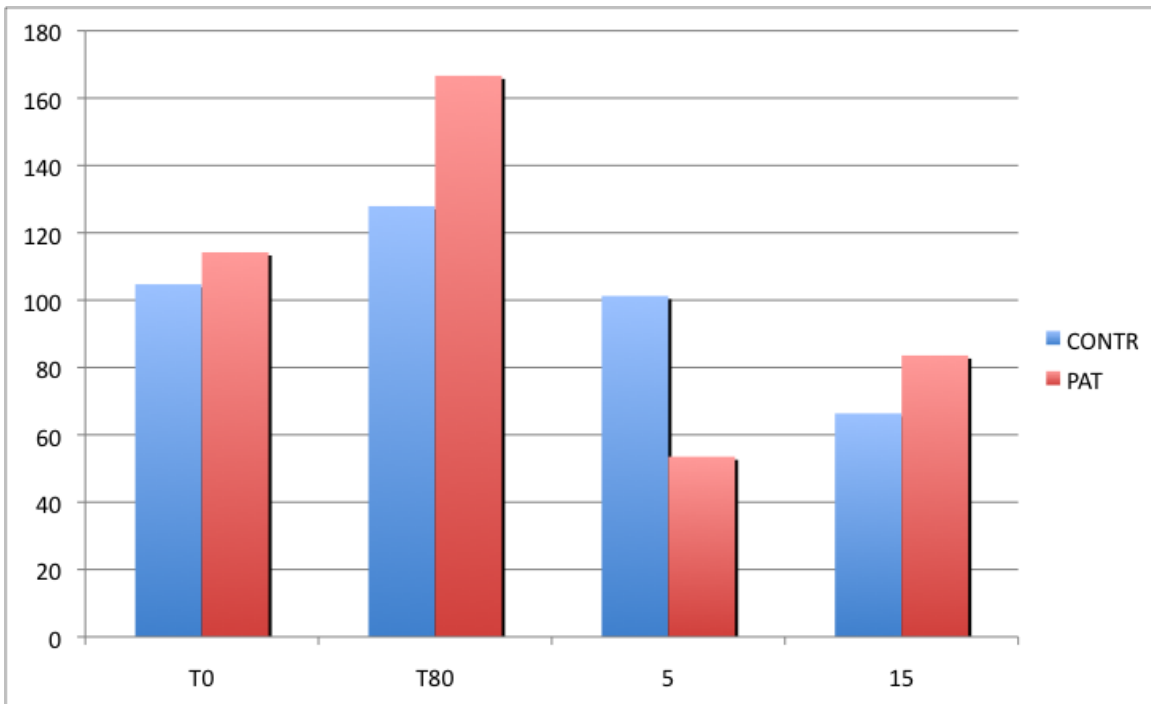


Grafico n. 3: Valori medi di Albumina (mmol/l) riscontrati nei 4 prelievi (T0, T80, +5 gg, +15 gg) distinti nei 2 gruppi (controllo, patologici).

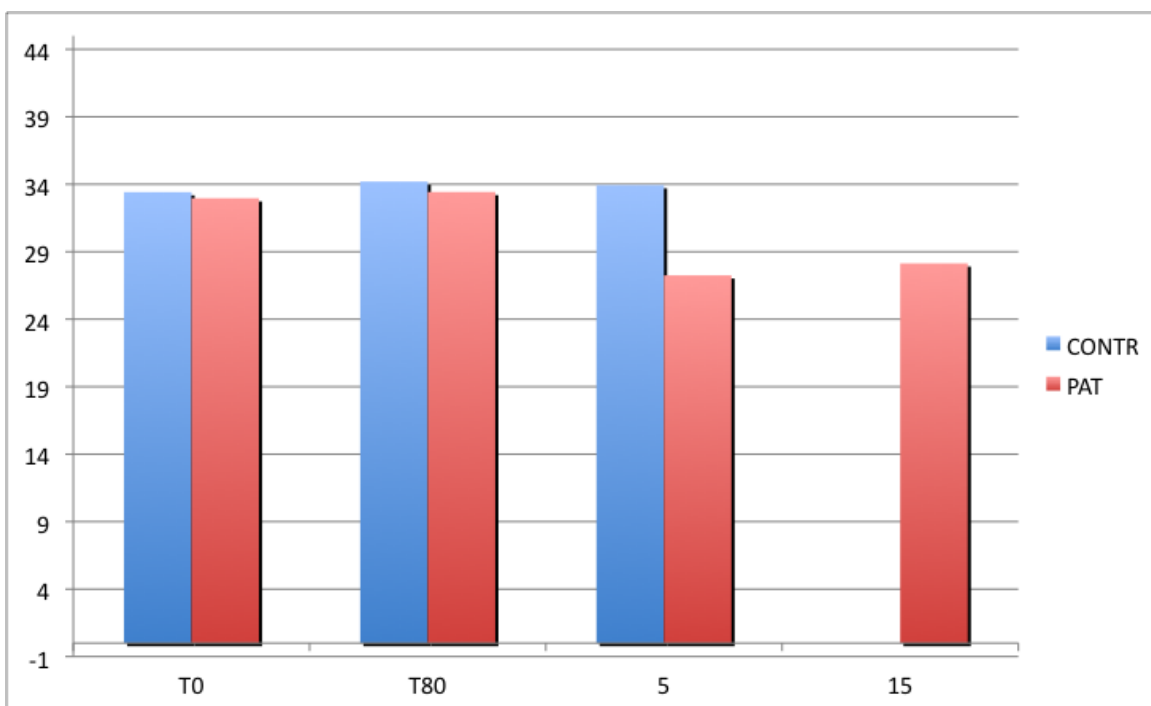
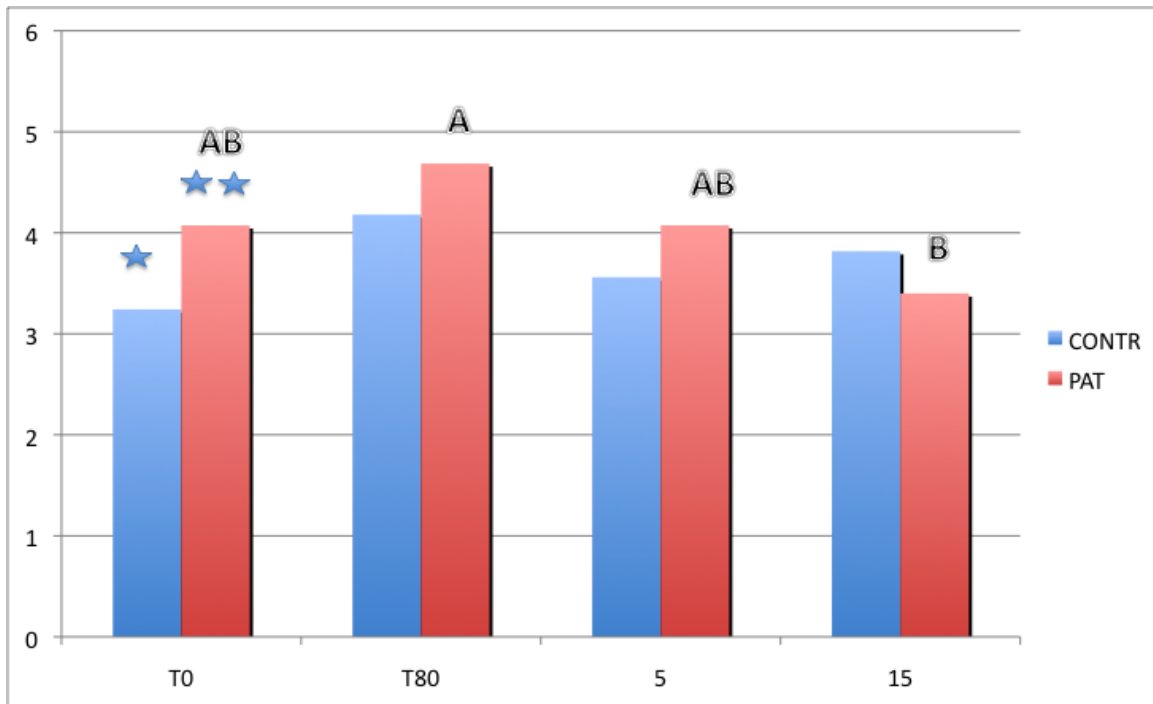


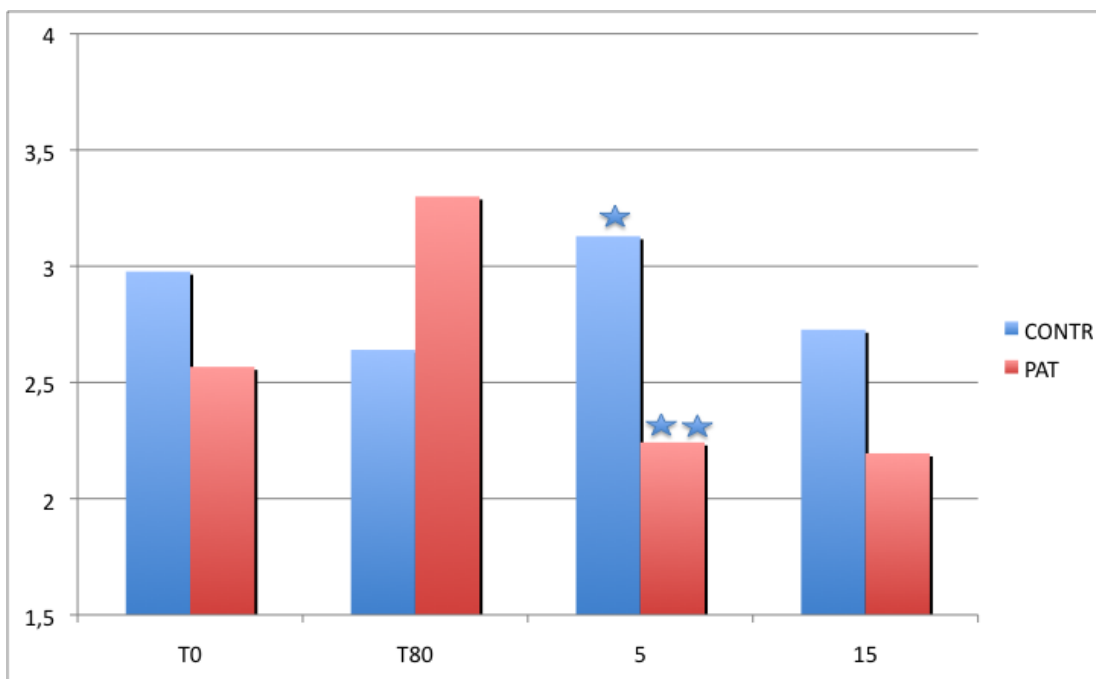
Grafico n. 4: Valori medi di Urea (mmol/l) riscontrati nei 4 prelievi (T0, T80, +5 gg, +15 gg) distinti nei 2 gruppi (controllo, patologici).



*,** : asterischi diversi indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi all'interno del singolo periodo ($P < 0.05$)

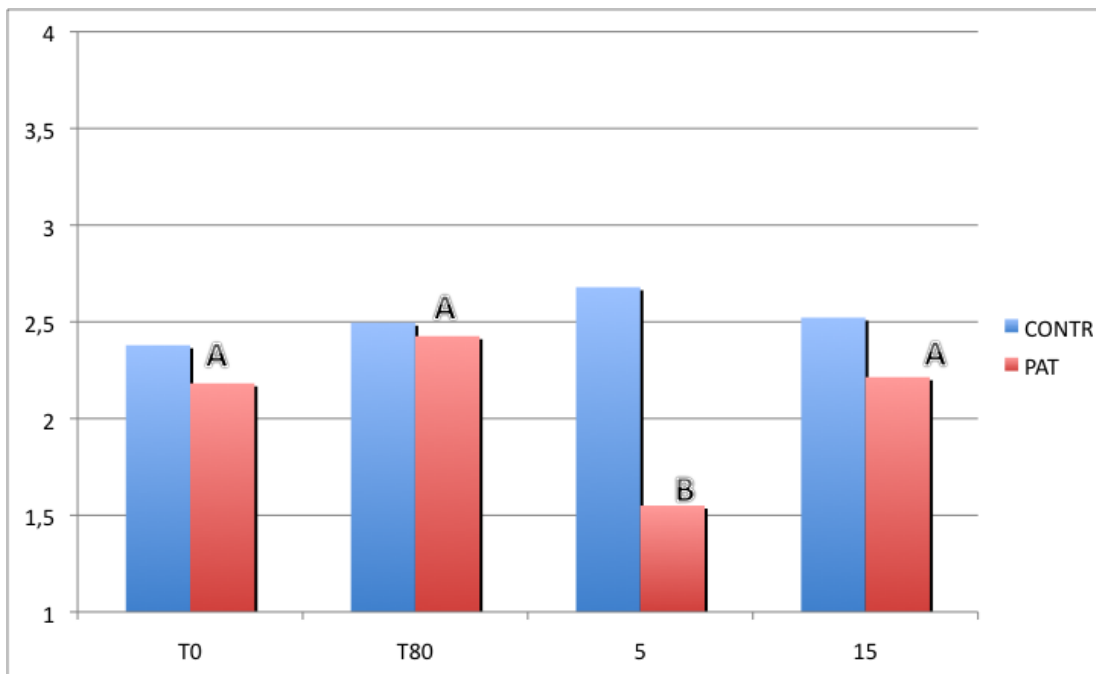
A,B,C : lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i tempi all'interno del singolo gruppo ($P < 0.05$)

Grafico n. 5: Valori medi di Glucosio (mmol/l) riscontrati nei 4 prelievi (T0, T80, +5 gg, +15 gg) distinti nei 2 gruppi (controllo, patologici).



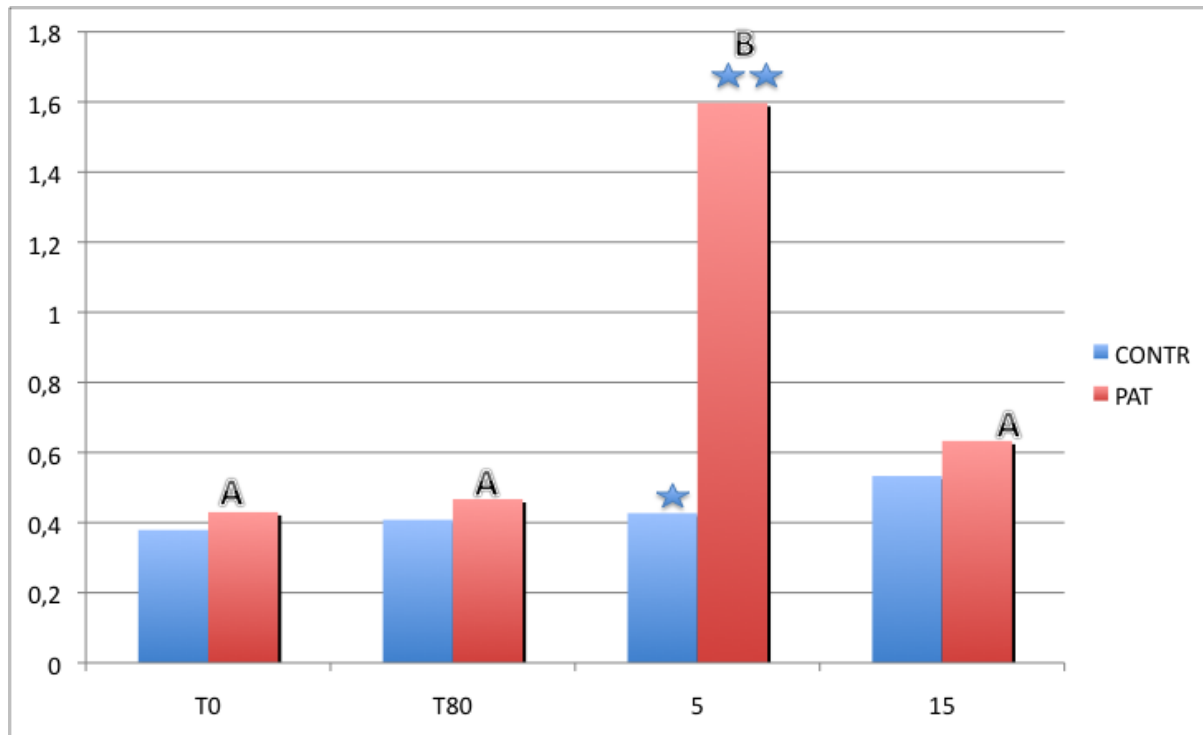
*,** : asterischi diversi indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi all'interno del singolo periodo (P<0.05)

Grafico n. 6: Valori medi di Colesterolo (mmol/l) riscontrati nei 4 prelievi (T0, T80, +5 gg, +15 gg) distinti nei 2 gruppi (controllo, patologici).



A,B,C: lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i tempi all'interno del singolo gruppo ($P < 0.05$)

Grafico n. 7: Valori medi di B.OHB (mmol/l) riscontrati nei 4 prelievi (T0, T80, +5 gg, +15 gg) distinti nei 2 gruppi (controllo, patologici).



*,** : asterischi diversi indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi all'interno del singolo periodo ($P < 0.05$)

A,B,C : lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i tempi all'interno del singolo gruppo ($P < 0.05$)

I risultati dei parametri sanitari sono indicati in tabella 2, suddividisi tra animali controllo ed animali patologici.

Tabella n. 2: Media \pm SEM (media dell'errore standard) dei parametri sanitari riscontrati nei 2 gruppi (controllo, patologici).

| | CONTROLLO | PATOLOGICI |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|
| BCS asciutta | 3.32 \pm 0.05* | 2.89 \pm 0.20** |
| BCS parto | 2.97 \pm 0.06 | 2.95 \pm 0.70 |
| Ritenzioni Placenta § | 0.11 \pm 0.04 | 0.29 \pm 0.10 |
| Metriti § | 0.28 \pm 0.06 | 0.48 \pm 0.11 |
| Chetosi § | 0.20 \pm 0.05 | 0.57 \pm 0.11** |
| N fecondazioni | 3.04 \pm 0.05 | 2.65 \pm 0.33 |
| Diagnosi di Gravidanza § | 0.74 \pm 0.09 | 0.74 \pm 0.10 |
| gg Parto-Primo servizio | 72.27 \pm 7.35 | 65.00 \pm 3.55 |
| gg Parto-Concepimento | 185.42 \pm 14.49 | 150.60 \pm 15.93 |

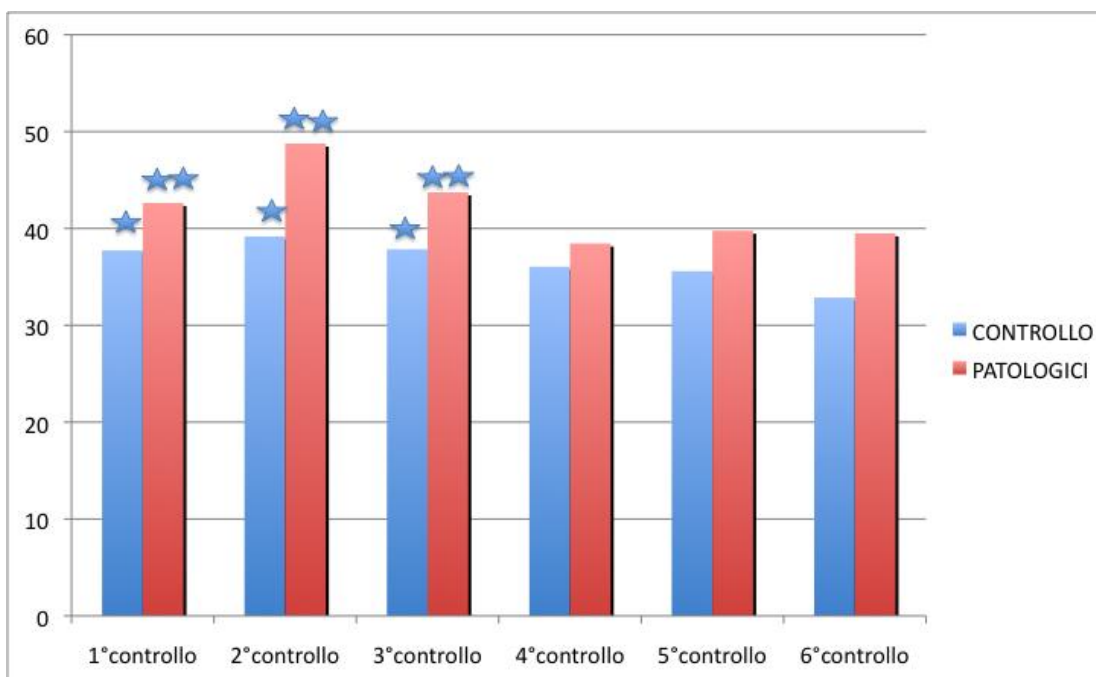
§: i valori vanno da 0 (assente) a 1 (presente)

*,** : asterischi diversi sulla stessa riga indicano differenze statisticamente significative (P<0.05)

Nei grafici 8-11 vengono riportati i risultati dei dati produttivi (produzione, % grasso, % proteine, cellule somatiche) nei primi sei

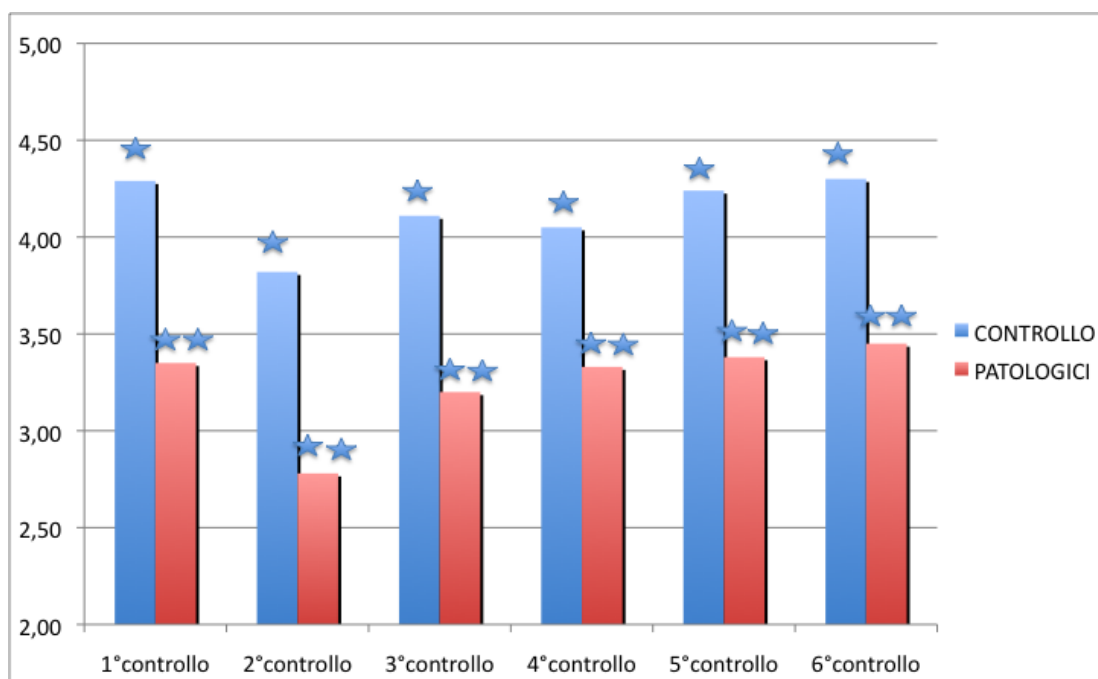
controlli della lattazione, distinti tra animali controllo e animali patologici.

Grafico n. 8: Valori medi di Produzione di latte (Kg/gg) riscontrati nei primi sei controlli produttivi, distinti nei 2 gruppi (controllo, patologici).



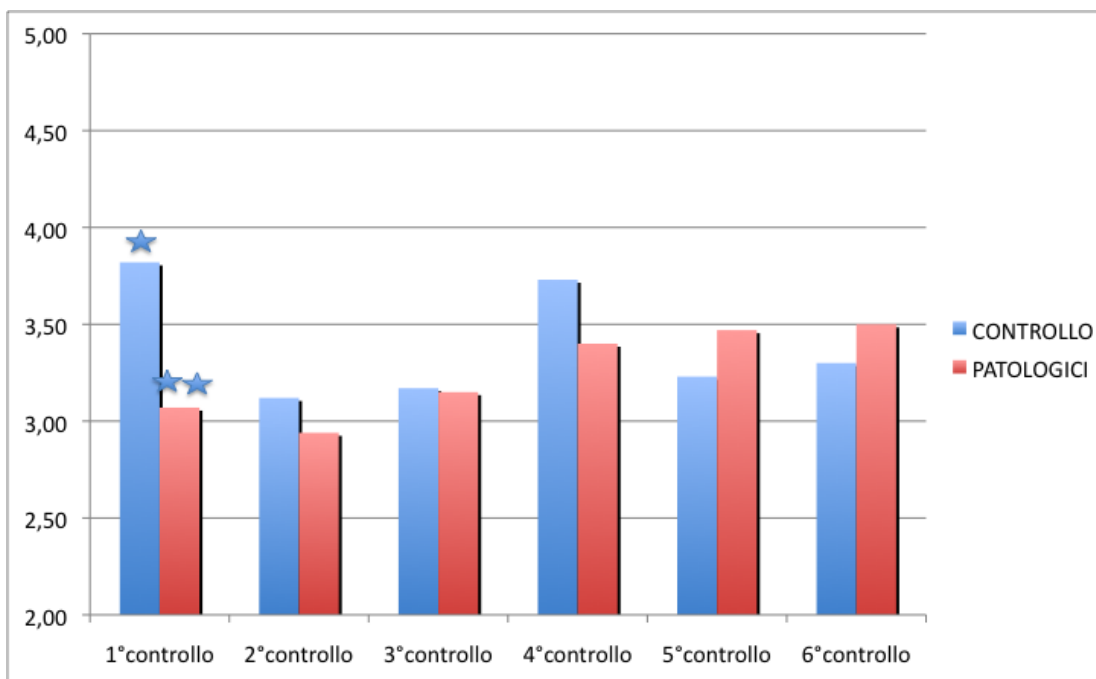
*,** : asterischi diversi indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi all'interno del singolo controllo ($P < 0.05$)

Grafico n. 9: Valori medi di grasso sul latte (%) riscontrati nei primi sei controlli produttivi, distinti nei 2 gruppi (controllo, patologici).



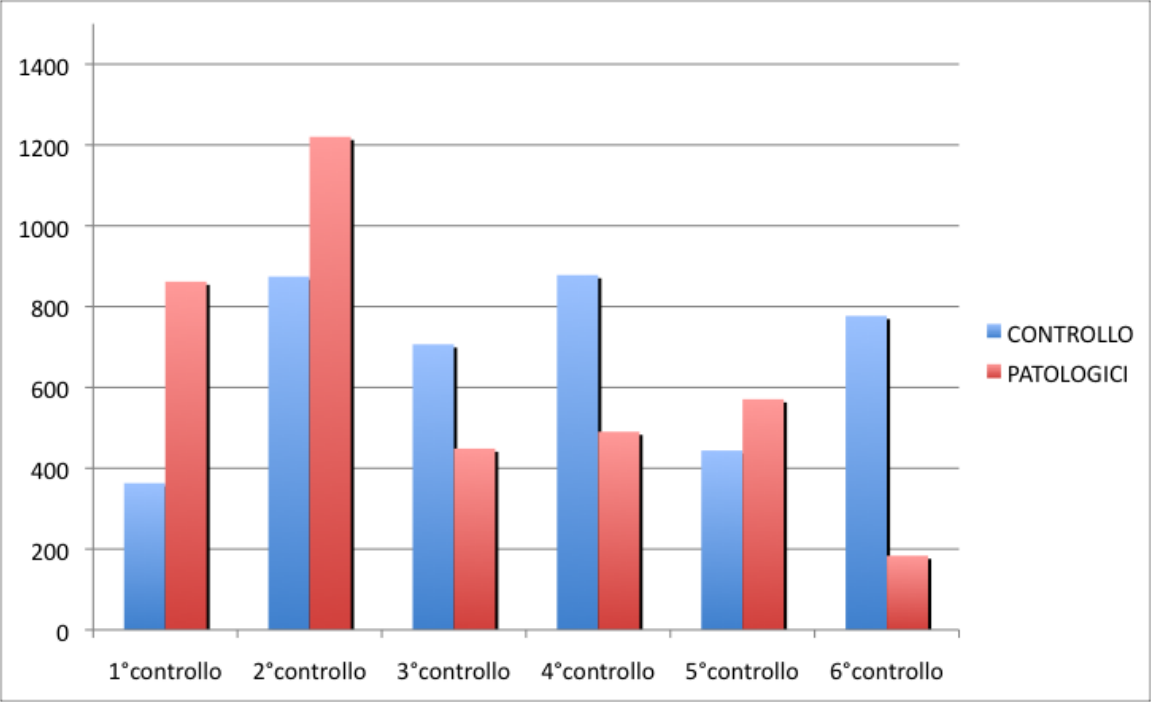
*,** : asterischi diversi indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi all'interno del singolo controllo ($P < 0.05$)

Grafico n. 10: Valori medi di proteine sul latte (%) riscontrati nei primi sei controlli produttivi, distinti nei 2 gruppi (controllo, patologici).



*,** : asterischi diversi indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi all'interno del singolo controllo ($P < 0.05$)

Grafico n. 11: Valori medi delle cellule somatiche sul latte (x 1000) riscontrati nei primi sei controlli produttivi, distinti nei 2 gruppi (controllo, patologici).



DISCUSSIONE

Il “transition period” è considerato uno dei momenti più importanti nella carriera produttiva della vacca da latte.

È in questa fase che si decide il destino produttivo e riproduttivo della vacca da latte. È già stato detto che tra la fine della gravidanza e l’inizio della lattazione la bovine vanno incontro ad una serie di cambiamenti metabolici così repentini e drastici in modo tale da pregiudicare una ripresa fisiologica normale.

L’obiettivo di questo lavoro è stato anche quello di individuare alcuni parametri ematici, produttivi e riproduttivi di facile utilizzo in campo, come indicatori di maggior rischio per alcune patologie metaboliche nei bovini possiamo considerare quanto segue:

Analisi dei dati clinici produttivi e riproduttivi

In letterature viene confermato che bovini con un BCS superiore a 3,75 potrebbero essere più a rischio di patologie metaboliche che non bovini con un BCS inferiore. Osservando i dati ottenuti non è possibile confermare quanto viene descritto in letteratura.

Infatti, nella descrizione dei grafici che riportano i valori del BCS sia in asciutta che al parto i bovini patologici presentano un BCS inferiore rispetto al BCS dei soggetti sani.

Il valore del BCS nei soggetti patologici nei confronti dei soggetti sani nel periodo dell’asciutta ha anche una significatività statistica ($P < 0.05$).

Per questo lavoro tutti i parametri sanitari che si manifestano nei giorni successivi al parto sono stati registrati, ma solamente la ritenzione di placenta, la metrite e la chetosi hanno avuto un interesse clinico.

I bovini patologici hanno avuto una percentuale maggiore di ritenzione di placenta, di metrite e di chetosi rispetto i bovini sani.

La chetosi conferma quello che è stato detto per le concentrazioni ematiche di glucosio e di BHOB, inoltre la chetosi è l'unico parametro che ha anche una significatività statistica ($P < 0.05$).

Il grafico riferito alla produzione di latte nei primi sei mesi di lattazione evidenzia una produzione maggiore nei soggetti patologici rispetto a i soggetti sani.

L'interpretazione di questo dato risulta difficile ed è probabilmente influenzata dal fatto che gli animali patologici sono stati trattati per le diverse patologie che hanno evidenziato. Si può ipotizzare che tale trattamento abbia favorito una maggior produzione di latte.

Analizzando il grafico relativo alla percentuale di grasso si osserva una percentuale minore nei soggetti patologici.

Le considerazioni che possono essere effettuate sono le seguenti:

- Il primo controllo funzionale viene fatto dopo 15 giorni dal parto non permettendo di valutare la percentuale di grasso subito dopo il parto, momento in cui si potrebbe avere una percentuale più alta di grasso conseguente a una maggiore eliminazione di grassi attraverso la mammella.
- Gli animali patologici come osservato precedentemente sono più produttivi e si potrebbe assistere ad un "effetto diluizione" che porta ad una minor concentrazione di grasso.

Analizzando il grafico delle proteine possiamo anche in questo caso evidenziare una percentuale più bassa nei soggetti patologici.

In questo caso la spiegazione potrebbe essere ricercata in un maggior catabolismo nel metabolismo proteico, questa ipotesi potrebbe essere confermata dalla concentrazione ematica di urea più elevata.

Anche i dati riproduttivi non rispecchiano le attese risultando migliori per il gruppo patologico rispetto a quello sano. Bisogna sottolineare però le patologie evidenziate nel post parto sono fortemente legate all'apparato

riproduttore e di conseguenza i soggetti patologici sono stati seguiti con maggior attenzione nella ripresa della funzionalità riproduttiva.

L'analisi dei dati produttivi e riproduttivi risulta, in una prova di campo, di difficile interpretazione in quanto i soggetti patologici vengono inevitabilmente sottoposti a terapia.

Metabolismo Energetico

La concentrazione dei NEFA prima e dopo la somministrazione del glucosio confermerebbe l'ipotesi che in condizioni di Bilancio Energetico Positivo diminuisce la mobilizzazione dal tessuto adiposo di acidi grassi. Questa condizione viene evidenziata dalla concentrazione dei NEFA prima dell'infusione di glucosio; essa è infatti più elevata nei soggetti patologici rispetto ai soggetti sani e il dato è statisticamente significativo ($P < 0.05$). Inoltre dopo la somministrazione di glucosio al 50% si può osservare che i NEFA diminuiscono in entrambi i gruppi, probabilmente a causa del fatto che in condizioni di bilancio energetico positivo vi è una diminuzione della mobilizzazione dei grassi dal tessuto adiposo. Nel gruppo degli animali patologici la concentrazione ematica dei NEFA è più bassa del gruppo sano, ma il dato non è statisticamente significativo.

I risultati che si sono ottenuti con i campioni ematici eseguiti dopo il parto, confermerebbero invece l'ipotesi che il BEN sia un fattore importante nel favorire la lipomobilizzazione.

Osservando il grafico si evidenzia che la concentrazione ematica dei NEFA è nettamente più elevata nei soggetti patologici rispetto ai sani, sia a 5 giorni che a 15 giorni dopo il parto. Infatti, gli animali a inizio lattazione devono coprire il fabbisogno energetico necessario alla ghiandola mammaria per la produzione di latte predisponendo l'animale ad una aumentata lipomobilizzazione, anche questo dato ha una significatività statistica ($P < 0.05$).

L'insulina nel metabolismo energetico gioca un ruolo molto importante. Una bassa concentrazione di insulina riduce notevolmente l'assorbimento

del glucosio nei tessuti, inibisce fortemente la sintesi delle proteine e, inoltre, alte concentrazioni di NEFA diminuiscono la secrezione dell'insulina.

Queste considerazioni potrebbero trovare una conferma, anche se non è evidenziabile una significatività statistica, dai risultati ottenuti nello studio.

Confrontando sia il grafico dei NEFA che quello dell'insulina è possibile evidenziare che dopo l'infusione di glucosio la concentrazione ematica dei NEFA diminuisce sia nei soggetti sani che patologici e la concentrazione ematica dell'insulina aumenta soprattutto nei soggetti patologici. La conferma di quanto viene sostenuto in letteratura si può evidenziare maggiormente con i risultati ematici riferiti al prelievo eseguito a 5 giorni dopo il parto. Infatti i soggetti patologici presentano una concentrazione ematica dell'insulina minore rispetto ai soggetti sani e questo potrebbe essere determinato dal fatto che i soggetti patologici hanno concentrazioni più elevate di NEFA.

Proseguendo nella valutazione dei parametri ematici è possibile osservare che la concentrazione ematica del glucosio a 5 giorni dopo il parto è nettamente inferiore nei soggetti patologici rispetto ai sani e la differenza è statisticamente significativa ($P < 0.05$). Analogamente la concentrazione del BOHB relativa allo stesso prelievo è maggiore nei soggetti patologici rispetto a quelli sani. In questi due grafici si può evidenziare quello che in letteratura viene riportato come “diagnosi clinica di chetosi” con una evidente ipoglicemia e iperchetonemia .

Dopo la somministrazione endovenosa di glucosio si osserva nei soggetti patologici una glicemia più elevata rispetto ai soggetti sani: questo dato potrebbe indicare un'alterazione nella funzionalità epatica (lipidosi epatica).

L'ipotesi di lipidosi epatica potrebbe essere sostenuta osservando anche i valori ematici dell'albumina e del colesterolo a 5 giorni dopo il parto. Infatti le concentrazioni ematiche di entrambi i parametri sono inferiori

nei soggetti patologici rispetto ai soggetti sani. Questa condizione potrebbe anche essere indicativa di un processo infiammatorio a carico del fegato e quindi di una diminuzione della produzione delle VLDL e una diminuzione dell'albumina intesa come proteina della fase acuta negativa. L'aumentata concentrazione dell'urea nei soggetti patologici a discapito dei sani nel periodo del parto potrebbe essere dovuto ad un aumentato catabolismo delle proteine a favore degli aminoacidi gluconeogenici.

Efficacia del test da carico

Dai dati ottenuti dai parametri ematici e sanitari si può evidenziare che il test da carico riesce ad individuare due gruppi di animali. Questo tipo di approccio non permette però di considerare gli animali positivi al test come insulino resistenti, ma probabilmente come intolleranti al carico di glucosio.

Questo è comunque indicativo di un particolare stato metabolico degli animali i quali rispondono in maniera differente all'innalzamento della glicemia.

Applicabilità del test in campo (FGTT)

L'utilizzo di questo test si è dimostrato di facile applicabilità in quanto non richiede una particolare strumentazione ed è anche economicamente sostenibile.

Gli strumenti necessari sono:

- Siringhe per i prelievi;
- Deflussore monouso;
- Una glucosata al 50%
- Glucometro e strisce reattive;

Lo svantaggio principale di questo test è il lungo tempo di attesa in quanto bisogna aspettare 80' per completare la prova. Questi tempi

possono a volte non essere compatibili con l'attività del veterinario libero professionista.

Un ulteriore svantaggio è legato al fatto che, al fine di rispettare le condizioni di benessere delle bovine, si rende necessario catturare due volte lo stesso animale.

CONCLUSIONI

Il monitoraggio del periodo di transizione e delle patologie post parto (cliniche ma soprattutto subcliniche) è una sfida costante per il veterinario e rappresenta la chiave di volta per una corretta gestione della mandria di vacche da latte.

Infatti queste patologie incidono notevolmente sia sul reddito dell'allevamento che sulla carriera produttiva e riproduttiva della bovina. L'incidenza economica è quantificabile considerando sia i costi diretti che indiretti, ossia i costi legati alle terapie e quelli derivanti da una scarsa produzione oppure da problemi di fertilità.

In questo quadro è molto importante riuscire ad individuare un test rapido economico, applicabile in campo e di facile interpretazione, allo scopo di individuare i soggetti maggiormente a rischio di sviluppare le patologie tipiche del post parto.

Considerato che queste patologie sono in stretta correlazione con il metabolismo energetico la nostra attenzione si è rivolta a cercare un test che permettesse di valutare prima del parto la capacità della bovina di far fronte alle richieste energetiche necessarie in questo periodo.

Da una ricerca bibliografica si è potuto constatare che i test utilizzati per valutare la capacità di risposta della bovina alle esigenze energetiche prendevano in considerazione prevalentemente le concentrazioni ematiche di glucosio e insulina. È noto infatti che l'ultimo periodo di gravidanza può essere influenzato da una condizione di insulino resistenza.

I test descritti erano sviluppati in condizioni sperimentali e di difficile applicazione in campo ed inoltre richiedevano conoscenza specifiche per l'interpretazione.

Il nostro lavoro di ricerca si è quindi concentrato sulla valutazione dell'andamento della glicemia, in quanto è un parametro facilmente misurabile in campo e anche di facile interpretazione, pur sapendo che in questo modo si andava a misurare più la tolleranza al glucosio che non l'insulino resistenza.

La glicemia è un importante indicatore della capacità dell'animale di far fronte alle richieste energetiche attraverso il processo di gluconeogenesi e quindi della corretta funzionalità epatica e ruminale.

È possibile mettere in evidenza questo processo inducendo un improvviso rialzo della glicemia mediante un carico di glucosio e osservando la curva da carico e il tempo impiegato dalla bovina per rientrare nei valori basali. Questo test ci ha permesso di individuare due categorie di animali una tollerante al carico di glucosio e l'altra intollerante (in quanto incapace di ritornare ai valori basali nel tempo stabilito).

Inoltre i risultati hanno confermato che i due gruppi individuati con questo test si comportavano in modo diverso nel post parto, come confermato dai parametri clinici e sanitari rilevati. Questo è comunque indicativo di un particolare stato metabolico degli animali i quali rispondono in maniera differente all'innalzamento della glicemia

L'utilizzo di questo test si è dimostrato, quindi, di facile applicabilità in quanto non richiede una particolare strumentazione ed è anche economicamente sostenibile.

Dai dati ottenuti in questa tesi possiamo dire che questo test da campo potrebbe essere utilizzato dai veterinari liberi professionisti come supporto per indagini cliniche, poiché risulta di facile consultazione.

Per poter confermare questi dati e capire meglio la correlazione che esiste tra patologie metaboliche e metabolismo energetico sono necessarie ulteriori indagini

BIBLIOGRAFIA

- Armstrong, D. G., T. G. McEvoy, G. Baxter, J. J. Robinson, C. O. Hogg, K. J. Woad, R. Webb, and K. D. Sinclair. 2001. Effect of Dietary Energy and Protein on Bovine Follicular Dynamics and Embryo Production In Vitro: Associations with the Ovarian Insulin-Like Growth Factor System. *Biology of Reproduction* 64:1624-1632.
- Avruch, J. 1998. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Molecular and cellular biochemistry* 182:31-48.
- Bauchart, D., D. Durand, P. M. Laplaud, P. Forgez, S. Goulinet, and M. J. Chapman. 1989. Plasma lipoproteins and apolipoproteins in the preruminant calf, *Bos spp*: density distribution, physicochemical properties, and the in vivo evaluation of the contribution of the liver to lipoprotein homeostasis. *Journal of Lipid Research* 30:1499-1514.
- Bauman, D. E., and R. G. Vernon. 1993. Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation. *Annual Review of Nutrition* 13:437-461.
- Bauman, D. E., and W. B. Currie. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science* 63:1514-1529.
- Bauman, D. E., C. J. Peel, W. D. Steinhour, P. J. Reynolds, H. F. Tyrrell, A.C.G. Brown, and G. L. Haaland. 1988. Effect of bovine somatotropin on metabolism of lactating dairy cows: Influence on rates of irreversible loss and oxidation of glucose and nonesterified fatty acids. *The Journal of Nutrition* 118:1031-1040.
- Beam S. W., and W. R. Butler. 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biology of Reproduction* 56:133-142.
- Bell, A. W. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science* 73:2804-2819.

- Bertoni, G., E. Trevisi, X. Han, and M. Bionaz. 2008. Effects of Inflammatory Conditions on Liver Activity in Puerperium Period and Consequences for Performance in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 91:3300-3310.
- Bionaz, M., E. Trevisi, L. Calamari, F. Librandi, A. Ferrari, and G. Bertoni. 2007. Plasma Paraoxonase, Health, Inflammatory Conditions, and Liver Function in Transition Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 90:1740-1750.
- Butler S. T., A. L. Marr, S. H. Pelton, R. P. Radcliff, M. C. Lucy, and W. R. Butler. 2003. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *Journal of Endocrinology* 176:205-217.
- Butler, S. T., S. H. Pelton, and W. R. Butler. 2004. Insulin increases 17 β -estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. *Reproduction* 127:537-545.
- Butler, W. R. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Animal Reproduction Science* 60-61:449-457.
- Butler, W. R., and R. D. Smith. 1989. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 72:767-783.
- Butler, W. R., R. W. Everett, and C. E. Coppock. 1981. The relationship between energy balance, milk production and ovulation in postpartum Holstein cows. *Journal of Animal Science* 53:742-748.
- Canfield, R. W., and W. R. Butler. 1990. Energy balance and pulsatile LH secretion in early postpartum dairy cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 7:323-330.
- Cools S., P. Bossaert, T. Caluwaerts, M. Hostens, G. Opsomer, and A. de Kruif. 2008. De economische gevolgen van een verlenging van de tussenkalftijd bij hoogproductief melkvee. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 77:402-409.

- Doepel, L., H. Lapierre, and J. J. Kennelly. 2002. Peripartum Performance and Metabolism of Dairy Cows in Response to Prepartum Energy and Protein Intake. *Journal of Dairy Science* 85:2315-2334.
- Drackley J. K., T. R. Overton, and G. N. Douglas. 2001. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science* 84:100-112.
- Drackley, J. K., D. C. Beitz, and J. W. Young. 1991. Regulation of in vitro metabolism of palmitate by carnitine and propionate in liver from dairy cows. *Journal of Dairy Science* 74:3014-3024.
- Drackley, J. K., H. M. Dann, G. N. Douglas, N. A. Janovick Guretzky, N. B. Litherland, J. P. Underwood, and J. J. Looor. 2005. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders (invited review). *Italian Journal of Animal Science* 4:323.344.
- Drackley. J. K. 1999. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *Journal of Dairy Science* 82:2259-2273.
- Duffield, T. F., K. D. Lissemore, B. McBride, and K. E. Leslie. 2009. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *Journal of Dairy Science* 92:571.580.
- Edmondson, A. J., D. Lean, I. D. Weaver, T. Farver, and G. Webster. 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 72:68.78.
- Friggens, N. C., C. Ridder, and P. Lovendahl. 2007. On the use of milk composition measures to predict the energy balance of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90:5453.5467.
- Friggens, N. C., P. Berg, P. Theilgaard, I. R. Korsgaard, K. L. Ingvarsten, P. L. L^avendahl, and J. Jensen. 2007. Breed and parity effects on energy balance profiles through lactation: Evidence for genetically driven body reserve change. *Journal of Dairy Science* 90:5291.5305.

- Garnsworthy, P. C., and J. H. Topps. 1982. The effect of body condition of dairy cows at calving on their food intake and performance when given complete diets. *Animal Production* 35:113-119.
- Giancesella M, Cannizzo C, Casalone M, Morgante M, 2009. Cows response to glucose tolerance test (GTT) and periparturient diseases: preliminary study. *J. Anim. Sci.* Vol. 87, E-Suppl. 2/*J. Dairy Sci.* Vol. 92, E-Suppl. 1, pg 385
- Goff J. P., and R. L. Horst R.L. 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *Journal of Dairy Science* 80: 1260-1268.
- Gravena, C., P. C. Mathias, and S. J. Ashcroft. 2002. Acute effects of fatty acids on insulin secretion from rat and human islets of Langerhans. *Journal of Endocrinology* 173:73-80.
- Greenfield, R. B., M. J. Cecava, and S. S. Donkin. 2000. Changes in mRNA Expression for Gluconeogenic Enzymes in Liver of Dairy Cattle During the Transition to Lactation. *Journal of Dairy Science* 83:1228-1236.
- Grummer, R. R. 1992. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* 76:3882-3896.
- Grummer, R. R. 2008. Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *The Veterinary Journal* 176:10-20.
- Grummer, R. R., D. G. Mashek, and A. Hayirli. 2004. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice* 20:447-470.
- Hammon, D. S., I. M. Evjen, T. R. Dhiman, J. P. Goff, and J. L. Walters. 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 113:21-29.
- Hammon, H. M., O. Bellmann, J. Voigt, F. Schneider, and C. Kuhn. 2007. Glucose-dependent Insulin Response and Milk Production in Heifers Within a Segregating Resource Family Population. *Journal of Dairy Science* 90:3247-3254.

- Hayirli, A. 2006. The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. *Veterinary Research Communications* 30:749-774.
- Herzog, K. 2001. Versuche zur pankreatischen Insulin-Response von trockenstehenden und laktierenden Kuehen sowie Kuehen mit Leberverfettung mittels intravenosem Glucose-toleranztest und hyperglykamischer Clamp-Technik. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Veterinarmedizin (Dr. Med. Vet.) durch die Tierarztliche Hochschule Hannover.
- Holtenius, K., S. Agenas, C. Delavaud, and Y. Chilliard. 2003. Effects of Feeding Intensity during the Dry Period. 2. Metabolic and Hormonal Responses. *Journal of Dairy Science* 86:883-891.
- Holtenius, P., and K. Holtenius. 2007. A model to estimate insulin sensitivity in dairy cows. *Acta Veterinaria Scandinavica* 49:29-31.
- Holtenius, P., and M. Traven. 1990. Impaired glucose tolerance and heterogeneity of insulin responses in cows with abomasal displacement. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe A* 37:445.451.
- Ingvarlsen K. L., and J. B. Andersen. 2000. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *Journal of Dairy Science* 83:1573-1597.
- Ingvarlsen, K. L., J. B. Andersen, M. Vestergaard, and T. Larsen. 2001. Effects of a four-day hyperinsulinemic-euglycemic clamp in early and mid-lactation dairy cows on plasma concentrations of metabolites, hormones, and binding proteins. *Domestic Animal Endocrinology* 21:169-185.
- Ingvarlsen, K. L., R. J. Dewhurst, and N. C. Friggens. 2003. On the relationship between lactational performance and health: Is it yield or metabolic imbalance that causes production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livestock Production Science* 83:277.308.

- Johnson, R. W., and B. N. Finck, 2001. Tumor necrosis factor- α and leptin: Two players in an animal's metabolic and immunologic responses to infection. *Journal of Animal Science* 79:118-127.
- Jorritsma, R., T. Wensing, T. A. M. Kruip, P. L. A. M. Vos, and J. P. T. M. Noordhuizen. 2003. Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Veterinary Research* 34:11-26.
- Kaneko, J. J. 2008. Chapter 3: Carbohydrate Metabolism and its Diseases. Pages 45-80 in: in "Clinical Biochemistry of Domestic Animals". Sixth Edition, Elsevier, London, UK..
- Knight, C. H., P. A. Fowler, and C. J. Wilde. 1990. Galactopoietic and mammogenic effects of long-term treatment with bovine growth hormone and thrice daily milking in goats. *Journal of Endocrinology* 127:129-138.
- Knight, C.H., J. France, and D. E. Beever. 1994. Nutrient metabolism and utilization in the mammary gland. *Livestock Production Science* 39:129-137.
- Lacetera, N., D. Scalia, U. Bernabucci, B. Ronchi, D. Pirazzi, and A. Nardone. 2005. Lymphocyte functions in overconditioned cows around parturition. *Journal of Dairy Science* 88:2010-2016.
- Lay, D. C. Jr., T. H. Friend, R. D. Randel, C. L. Bowers, K. K. Grissom, and O. C. Jenkins. 1992. Behavioral and physiological effects of freeze or hot-iron branding on crossbred cattle. *Journal of Animal Science* 70:330-336.
- Lucy, M. C. 2001. Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will It End? *Journal of Dairy Science* 84:1277-1293.
- Lucy, M. C. 2008. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: Implications for postpartum nutrition and reproduction. *Reproduction in Domestic Animals* 43:31-39.
- Lucy, M. C., G. A. Verkerk, B. E. Whyte, K. A. Macdonald, L. Burton, R. T. Cursons, J. R. Roche, and C. W. Holmes. 2009. Somatotropic axis components and nutrient partitioning in genetically diverse dairy cows

managed under different feed allowances in a pasture system. *Journal of Dairy Science* 92:526-539.

- McNamara, J. P. 1997. Adipose tissue metabolism during lactation: where do we go from here? *Proceedings of the Nutrition Society* 56:149-167.
- Murondoti, A., R. Jorritsma, A. C. Beynen, T. Wensing, and M. J. Geelen. 2004. Activities of the enzymes of hepatic gluconeogenesis in periparturient dairy cows with induced fatty liver. *Journal of Dairy Science* 71:129-134.
- Oikawa, S., and G. R. Oetzel. 2006. Decreased insulin response in dairy cows following a four-day fast to induce hepatic lipidosis. *Journal of Dairy Science* 89:2999-3005.
- Overton, T. R., and M. R. Waldron. 2004. Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. *Journal of Dairy Science* 87:105-119.
- Overton, T. R., J. K. Drackley, C. J. Ottemann-Abbamonte, A. D. Beaulieu, and J. H. Clark. 1998. Metabolic adaptation to experimentally increased glucose demand in ruminants. *Journal of Animal Science* 76:2938-2946.
- Petersen, H. H., J. P. Nielsen, and P. M. H. Heegaard. 2004. Application of acute phase protein measurement in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research* 35:163-187.
- Petterson, J. A., F. R. Dunshea, R. A. Ehrhardt, and A. W. Bell. 1993. Pregnancy and undernutrition alter glucose metabolic responses to insulin in sheep. *Journal of Nutrition* 123:1286-1295.
- Petterson, J. A., R. Slepetis, R. A. Ehrhardt, F. R. Dunshea, and A. W. Bell. 1994. Pregnancy but not moderate undernutrition attenuates insulin suppression of fat mobilization in sheep. *Journal of Nutrition* 124:2431-2436.
- Pires, J. A. A., A. H. Souza, and R. R. Grummer. 2007. Induction of Hyperlipidemia by Intravenous Infusion of Tallow Emulsion Causes

- Insulin Resistance in Holstein Cows. *Journal of Dairy Science* 90:2735-2744.
- Pryce J. E., Royal M. D., Garnsworthy P. C., and Mao, I. L. 2004. Fertility in the high-producing dairy cow. *Livestock Production Science* 86:125-135.
 - Puppione, D. L. 1978. Implications of unique features of blood lipid transport in the lactating cow. *Journal of Dairy Science* 61:651-659.
 - Reynolds, C. K., P. C. Aikman, B. Lupoli, D. J. Humphries, and D. E. Beever. 2003. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *Journal of Dairy Science* 86:1201-1217.
 - Roche, J. F. 2006. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Animal Reproduction Science* 96:282-296.
 - Rukkwamsuk T., T. Wensing, and M. J. H. Geelen. 1999b. Effect of fatty liver on hepatic gluconeogenesis in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* 82:500-505.
 - Rukkwamsuk, T., T. Wensing, and M. J. Geelen. 1999a. Effect of overfeeding during the dry period on the rate of esterification in adipose tissue of dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science* 82:1164-1169.
 - Sartin, J. L., K. A. Cummins, R. J. Kemppainen, D. N. Marple, C. H. Rahe, and J. C. Williams. 1985. Glucagon, insulin and growth hormone responses to glucose infusion in lactating dairy cows. *The American Journal of Physiology* 248:108.114.
 - Sechen, S. J., D. E. Bauman, H. F. Tyrrell, and P. J. Reynolds. 1989. Effect of somatotropin on kinetics of nonesterified fatty acids and partition of energy, carbon and nitrogen in lactating cows. *Journal of Dairy Science* 72:59-67.

- Sechen, S. J., F. R. Dunshea, and D. E. Bauman. 1990. Somatotropin in lactating cows: effect on response to epinephrine and insulin. *American Journal of Physiology* 258:582-588.
- Shaver, R. D. 1997. Nutritional risk factors in the etiology of left displaced abomasum in dairy cows: A review. *Journal of Dairy Science* 80:2449-2453
- Spicer, L. J., and S. E. Echternkamp. 1995. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology* 12:223-245.
- Stanley, K., R. Fraser, and C. Bruce. 1998. Physiological changes in insulin resistance in human pregnancy: longitudinal study with the hyperinsulinaemic euglycaemic clamp test. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 105:756-759
- Suriyasathaporn, W., C. Heuer, E. N. Noordhuizen-Stassen, and Y. H. Schukken. 2000. Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review. *Veterinary Research* 31:397-412.
- Tamminga, S., P. A. Luteijn, and R. G. M. Meijer. 1997. Changes in composition and energy content of liveweight loss in dairy cows with time after parturition. *Livestock Production Science* 52:31-38.
- Van Arendonk J. A. M., and Liinamo, A. 2003. Dairy cattle production in Europe. *Theriogenology* 59:563-569.
- Van Den Top, A. M., T. Wensing, M. J. H. Geelen, G. H. Wentink, A. T. Van .t Klooster, and A. C. Beynen. 1995. Time trends of plasma lipids and enzymes synthesizing hepatic triacylglycerol during postpartum development of fatty liver in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 78:2208-2220.
- Van Knegsel, A. T. M., H. van den Brand, E. A. M. Graat, J. Dijkstra, R. Jorritsma, E. Decuyper, S. Tamminga, and B. Kemp. 2007. Dietary energy source in dairy cows in early lactation: metabolites and metabolic hormones. *Journal of Dairy Science* 90:1477-1485.

- Van Meirhaeghe, H., P. Deprez, C. Van Den Hende, and E. Muylle. 1988. Plasma glucose clearance and insulin response in cows with abomasal displacement. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A* 21:221-228.
- Van Winden, S. C. L., R. Jorritsma, K. E. Muller, and J. P. T. M. Noordhuizen. 2003. Feed intake, milk yield, and metabolic parameters prior to left displaced abomasum in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86:1465-1471.
- Veenhuizen, J. J., J. K. Drackley, M. J. Richard, T. P. Sanderson, L. D. Miller, and J. W. Young. 1991. Metabolic changes in blood and liver during development and early treatment of experimental fatty liver and ketosis in cows. *Journal of Dairy Science* 74:4238-4253.
- Veerkamp, R. F., and E. P. C. Koenen. 1999. Genetics of food intake, live weight, condition score and energy balance. *Occasional Publications of the British Society of Animal Science* 24:63-7
- Waltner, S., J. P. McNamara, and J. K. Hillers. 1993. Relationships of Body Condition Score to Production Variables in High Producing Holstein Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science* 76:3410-3419.
- Zhao, F. Q., and A. F. Keating. 2007. Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland. *Journal of Dairy science* 90:76-86.
- Zhao, F. Q., W. M. Moseley, H. A. Tucker, and J. J. Kennelly. 2006. Regulation of glucose transporter gene expression in mammary gland, muscle, and fat of lactating cows by administration of bovine growth hormone and bovine growth hormone-releasing factor. *Journal of Animal Science* 74:183-189.
- Zhu, L. H., L. E. Armentano, D. R. Bremmer, R. R. Grummer, and S. J. Bertics. 2000. Plasma concentration of urea, ammonia, and glutamine around calving, and the relation of hepatic triglyceride, to plasma ammonia removal and blood acid-base balance. *Journal of Dairy Science* 83:734-740.

