



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in Medicina Veterinaria

TESI DI LAUREA

**PROFILO DEI MARKERS DI STRESS OSSIDATIVO SU  
MATRICE LATTE EQUINO NEI 60 GIORNI POST-PARTO**

Relatore

Prof. Maria Elena Falomo

Laureanda

Giorgia Comin

Matricola n.

1191213

Anno accademico 2023/2024



## Sommario

RIASSUNTO.....	5
1. FISILOGIA DELLA LATTAZIONE .....	7
1.1 CONTROLLO ORMONALE DELLA LATTOGENESI.....	8
1.2 PRODUZIONE DEL LATTE .....	11
1.3 METABOLISMO DURANTE LA LATTAZIONE .....	16
1.4 COMPOSIZIONE DEL LATTE EQUINO.....	18
1.5 ATTIVITA' ANTIMICROBICA .....	21
2. STRESS OSSIDATIVO .....	23
2.1 DEFINIZIONE DI STRESS OSSIDATIVO.....	23
2.2 OSSIDAZIONE DELLE PROTEINE.....	26
2.3 PEROSSIDAZIONE LIPIDICA .....	28
2.4 OSSIDAZIONE DEL DNA .....	30
3. MARKERS CORRELATI ALLO STRESS OSSIDATIVO .....	33
3.1 AOPP.....	33
3.2 TIOLI.....	34
3.3 CARBONILI .....	35
3.4 MDA.....	36
3.5 GLUCOSIO E LATTATI.....	37
4. EVENTI STRESSANTI NEL POST PARTUM.....	39
4.1 PERIPARTO .....	39
4.2 OXINFLAMMATION .....	40
4.3 INVOLUZIONE UTERINA .....	41
4.4 FOAL HEAT .....	43
4.5 TEMPERATURA.....	44
4.6 MASTITE.....	46

5. MATERIALI E METODI .....	49
5.1 RACCOLTA DEI CAMPIONI .....	49
5.2 DOSAGGIO DI GLUCOSIO E LATTATI.....	51
5.3 DOSAGGIO DELLE PROTEINE TOTALI CON METODO BCA .....	51
5.4 DOSAGGIO DELLE AOPP .....	53
5.5 DOSAGGIO DEI CARBONILI.....	54
5.6 DOSAGGIO DEI TIOLI .....	55
5.7 DOSAGGIO MDA – ANALISI CON ACIDO TIOBARBITURICO .....	57
5.8 RISULTATI .....	59
6. RISULTATI E DISCUSSIONE .....	61
CONCLUSIONI.....	71
BIBLIOGRAFIA.....	73

## RIASSUNTO

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'andamento e le possibili correlazioni tra i markers di stress ossidativo rilevabili nel latte equino ed i primi due mesi post-parto. Sono state prese in considerazione dodici fattrici dello stesso allevamento dalle quali sono stati prelevati campioni di latte una volta a settimana dal terzo giorno post-parto all'ottava settimana di lattazione.

La valutazione dei livelli di stress ossidativo è stata eseguita tramite il dosaggio di AOPP, carbonili, tioli, tBARS, glucosio e lattati rapportati al livello delle proteine totali presenti nei campioni. I risultati hanno evidenziato un picco di AOPP, tioli e carbonili nella prima settimana post-parto ed un lieve calo dei valori nelle successive settimane. Le proteine totali sono risultate significativamente correlate alle temperature ambientali stagionali dimostrando però una possibile correlazione spuria.

È stata quindi confermata l'ipotesi della presenza di stress ossidativo nei primi due mesi di lattazione con una maggiore incidenza del fenomeno nella prima settimana post-parto. L'implementazione di strategie nutrizionali mirate, come l'integrazione di antiossidanti, potrebbe migliorare significativamente il benessere delle fattrici e la qualità del latte, riducendo i rischi associati allo stress ossidativo. Queste strategie potrebbero inoltre favorire un migliore recupero post-parto e una più rapida ripresa della fertilità, migliorando così anche gli aspetti riproduttivi e produttivi delle cavalle.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate possible correlations between oxidative stress markers and the first two months postpartum. Twelve mares from the same breeding farm were considered, and milk samples were collected weekly from the third day postpartum until the eighth week of lactation. The evaluation of oxidative stress levels was carried out by measuring AOPP, carbonyls, thiols, tBARS, glucose, and lactates relative to the total protein levels present in the samples. The results showed a peak in AOPP, thiols, and carbonyls during the first week postpartum, followed by a slight decrease in the following weeks. Total proteins were significantly correlated with ambient temperatures,

suggesting a possible spurious correlation. The hypothesis of oxidative stress during the first two months of lactation was thus confirmed, with a higher incidence of the phenomenon in the first week postpartum. The implementation of targeted nutritional strategies, such as antioxidant supplementation, could significantly improve the well-being of mares and milk quality by reducing the risks associated with oxidative stress. These strategies could also promote better postpartum recovery and a quicker return to fertility, thereby enhancing the reproductive and productive aspects of the mares.

# 1. FISILOGIA DELLA LATTAZIONE

Lo sviluppo della ghiandola mammaria e l'inizio dell'allattamento sono processi molto complessi controllati dall'asse ipotalamo-ipofisi, ovaie e placenta; nello specifico questi fenomeni sono influenzati da steroidi ovarici e surrenalici e dagli ormoni prolattina, ossitocina, progesterone, ormone della crescita, insulina e ormoni tiroidei. Si ritiene che i fattori scatenanti che avviano la lattogenesi siano il calo del progesterone e l'aumento della prolattina che si verificano alla fine della gestazione (Davies Morel, 2021; McKinnon A. et al., 2010).

Il latte è sintetizzato nelle cellule epiteliali lattifere (lattociti) di ogni alveolo, i precursori ed i componenti che andranno a formare il latte vengono ricavati dal sangue che irrorava la ghiandola mammaria. Questi componenti attraversano la membrana basale per arrivare ai lattociti: ci sono tuttavia poche informazioni su come queste molecole passino questa membrana, essendo però di piccola entità, la maggior parte passa per diffusione (Davies Morel, 2021).

Le proteine vengono costruite dagli amminoacidi nei lattociti, l'azoto totale che attraversa la membrana basale è uguale a quello che si trova nel latte ma cambiano gli amminoacidi. Gli amminoacidi essenziali passano senza modificarsi la membrana basale della cellula lattifera e vengono incorporati in proteine insieme ai non essenziali che vengono direttamente sintetizzati nel lattocita da parte dei ribosomi del reticolo endoplasmatico rugoso (RER). Le proteine costruite vengono accumulate in granuli nell'apparato di Golgi che migra verso la membrana apicale e viene rilasciato nel lume alveolare tramite il processo di pinocitosi inversa. Durante la formazione del colostro nelle ultime settimane di gravidanza, gli alveoli accolgono un'alta concentrazione di proteine, tra cui le immunoglobuline. Le immunoglobuline si aggregano in corpuscoli chiamati corpi di Donne tramite un meccanismo tutt'ora non chiaro. Le ipotesi sono: un meccanismo di trasporto attivo oppure la rottura di alcune giunzioni nelle membrane basali delle cellule epiteliali lattifere che permetterebbe il passaggio senza modifiche strutturali delle immunoglobuline sieriche (Davies Morel, 2021).

Il glucosio presente nel sangue è il precursore del lattosio ma contribuiscono anche glicerolo, acetato e amminoacidi. La quantità di glucosio assorbito dalla ghiandola è molto maggiore rispetto a quello necessario per la conversione in lattosio: la differenza è usata

come energia per il metabolismo cellulare. La conversione da glucosio lattosio coinvolge cinque enzimi di cui l'ultimo è la lattosio sintetasi formata da due componenti A e B, il componente B è la maggior proteina presente nel latte ovvero  $\alpha$ -lattoalbumina. Sembra che il lattosio sia secreto nell'alveolo come le proteine per pinocitosi inversa (Davies Morel, 2021).

I globuli di grasso presenti nel latte si formano da acidi grassi liberi e glicerolo esterificato ovvero glicerolo unito ad acidi grassi, questi componenti poi si aggregano e formano un'emulsione di gocce di grasso all'interno del latte. Gli acidi grassi derivano da glucosio, trigliceridi e acidi grassi liberi, il glucosio C è un'importante precursore degli acidi grassi liberi nei non ruminanti come ad esempio il cavallo. Il glucosio viene assorbito dalla membrana basale e convertito ad Acetil-coenzima A e in Malonil-coenzima A nel citosol della cellula, il Malonil-CoA viene trasformato poi ad acidi grassi a corta catena (< 16 C) da un complesso multi-enzimatico. I trigliceridi nel sangue costituiscono un'ulteriore risorsa di acidi grassi liberi per le cellule epiteliali lattifere, vengono scomposti in glicerolo e acidi grassi liberi formando acidi grassi a lunga catena (16-18 atomi di carbonio). I grassi presenti nel lattocita vengono trasferiti nell'alveolo mammario grazie al processo di pinocitosi (Davies Morel, 2021).

## 1.1 CONTROLLO ORMONALE DELLA LATTOGENESI

### PROGESTERONE

Il progesterone è l'ormone essenziale per instaurare e mantenere la gestazione. Questo ormone viene prodotto dal corpo luteo, e supporta la gravidanza nei primi 50-70 giorni; successivamente, le coppe endometriali, che appaiono dal 38°-40° giorno, contribuiscono alla produzione di progesterone attraverso il rilascio della gonadotropina corionica equina (eCG) (Conley, 2016).

L'eCG, con un picco tra i 55 e i 70 giorni e una diminuzione fino alla scomparsa tra i 100 e i 140 giorni (Allen et al., 2002), ha attività FSH- e LH-simile, promuovendo la luteinizzazione e l'ovulazione di follicoli ovarici e la formazione di corpi lutei accessori incrementando i livelli di progesterone e dei suoi metaboliti nel sangue materno. La placenta, intorno ai 100 giorni di gestazione, diventa autonoma nella produzione di progesterone (Conley & Ball, 2019).



Il progesterone stimola la crescita lobulo-alveolare della mammella inibendo allo stesso tempo la lattogenesi, si pensa che l'inizio della produzione di latte sia dovuta al calo del progesterone e all'aumento della prolattina (Davies Morel, 2021; Mepham TB, 1987).

## ESTROGENI

La gonadotropina corionica equina è di fondamentale importanza anche per la produzione di estrogeni: provoca la sintesi di estrone solfato da parte del corpo luteo (Reed, 2018) e la secrezione ovarica di estrogeni a partire dal 45° giorno di gravidanza (Conley, 2016). Dal 70° giorno, si presenta un notevole aumento della concentrazione di estrogeni, con un particolare picco tra 210 e 240 giorni di gestazione. Una parte importante degli estrogeni, inoltre, viene prodotta a partire dagli androgeni sintetizzati dalle gonadi fetali, le quali tendono ad essere notevolmente sviluppate fino al 220° giorno, per poi regredire successivamente (Allen WR, 2002; Reed, 2018).

Questo fenomeno di conversione avviene grazie all'unità feto-placentare che descrivere il fenomeno per cui gli androgeni sintetizzati dai tessuti fetali vengono convertiti in estrogeni da questa (Conley, 2016).

Gli estrogeni permettono l'instaurarsi della produzione cervicale di PGE<sub>2</sub>, che induce il rilassamento della cervice, PGF<sub>2α</sub>, oltre che promuovere l'azione del calcio intracellulare innescando le contrazioni uterine a livello di miometrio (Reed, 2018).

Gli estrogeni aiutano a sviluppare il sistema dei dotti mammari durante la gravidanza e le ghiandole mammarie per la produzione di latte (Davies Morel, 2021).

Uno studio effettuato nel 2016 su bovine Holstein ha dimostrato come la somministrazione esogena di estrogeni, come l'estradiolo, hanno stimolato la proliferazione cellulare nel tessuto mammario, migliorando così la preparazione per la futura produzione di latte. Gli interventi ormonali e oltre ad una nutrizione strategica, hanno ottimizzato lo sviluppo mammario e la produttività lattifera delle bovine (Geiger et al., 2016).

## PROLATTINA

La prolattina è un ormone prodotto dalla ghiandola pituitaria, viene regolata da secrezioni ipotalamiche di dopamina (Forsyth et al., 1975; McKinnon A. et al., 2010) ed è fondamentale per l'inizio ed il mantenimento della lattogenesi nella fattrice. La

concentrazione di questo ormone inizia ad accrescersi nel primo mese di gestazione (Nett TM et al., 1975), si registrano i più alti livelli pochi giorni prima del parto e nei primi 2-3 giorni post-parto (Krakowski et al., 2020). Successivamente la prolattina torna a livelli basali 1-2 mesi dopo il parto (Davies Morel, 2021; Worthy et al., 1986) raggiungendo livelli minimi nel calore del puledro e 9 giorni post ovulazione (Krakowski et al., 2020). Queste variazioni sono strettamente legate alla riduzione dei livelli di progesterone (P4) ed estrogeni (E) e all'aumento della prostaglandina F2 $\alpha$ . La prolattina gioca un ruolo cruciale nello sviluppo della ghiandola mammaria, in particolare nello stato di coagulazione del latte all'interno delle vescicole mammarie, dove stimola la produzione e il rilascio di latte. La carenza di secrezione di PRL dall'ipofisi o la sua bassa concentrazione nel sangue prima del parto possono ostacolare lo sviluppo della ghiandola mammaria, portando a difficoltà nell'allattamento. Ricerche precedenti suggeriscono che un aumento dei livelli di PRL dopo il parto possa ritardare l'avvio del ciclo estrale e influenzare l'incidenza della morte embrionale precoce (Krakowski et al., 2020). Un ulteriore studio ha dimostrato come nel post-parto, se il puledro viene separato dalla madre per alcune ore, la concentrazione di prolattina sierica cala; quando al puledro torna ad essere concesso l'allattamento sono stati osservati aumenti rapidi di questo ormone nel sangue (Wiest JJ, 1987).

## OSSITOCINA

L'ossitocina è un ormone sintetizzato dal nucleo sopra ottico e paraventricolare dell'ipotalamo, oltre che dall'ovaio, a livello del quale svolge un ruolo di regolazione del ciclo estrale (McKinnon A. et al., 2010; Sjaastad O., 2010).

Nell'ultimo trimestre di gravidanza, gli estrogeni provocano l'aumento dell'espressione di recettori per l'ossitocina e di *gap junctions* del miometrio, le quali sono necessarie per permettere all'utero di compiere contrazioni coordinate durante le fasi di parto, aumentando forza e frequenza di queste. Le contrazioni causate dall'ossitocina aiutano inoltre l'espulsione delle membrane fetali (Reed, 2018; Sjaastad O., 2010).

Il rilascio di questo ormone è determinato dal riflesso di suzione, ovvero un riflesso neuroendocrino, da parte del puledro al momento dell'allattamento. La cute della mammella e del capezzolo contengono terminazioni nervose che sono sensibili al tatto, queste informazioni raggiungono il sistema nervoso centrale tramite fibre nervose e

spinali che raggiungono l'ipotalamo, il quale segnala all'ipofisi posteriore di produrre ossitocina. Il riflesso di suzione stimola quindi le cellule mioepiteliali che contraendosi causano l'espulsione di latte dagli alveoli, dai dotti lattiferi e quindi dalla cisterna del capezzolo (McKinnon A. et al., 2010).

L'effetto dell'ossitocina sulla mammella è quello di aumentare la pressione nel lume alveolare e ridurre la resistenza nei dotti escretori e nel canale del capezzolo. Sono necessari 45-60 secondi dalla stimolazione tattile allo sviluppo della massima pressione nel sistema escretore (Reed, 2018; Sjaastad O., 2010)

## ORMONE DELLA CRESCITA

L'ormone della crescita (growth hormone) stimola la secrezione di IGF-1 da parte del fegato riducendo il tasso di apoptosi mantenendo così una maggior quantità di tessuto secretorio attivo nella ghiandola mammaria. Il GH stimola la produzione di latte a scapito della deposizione di grasso e della crescita corporea. In alcuni paesi viene somministrato per via parenterale alle bovine per aumentare la quantità di latte prodotto mentre nella specie equina questo trattamento non è previsto. Senza somministrazione esogena di ormone della crescita l'effetto appena descritto si verifica lievemente (Sjaastad O., 2010).

## 1.2 PRODUZIONE DEL LATTE

Durante le ultime settimane di gravidanza, sotto l'influenza ormonale, viene prodotto il colostro, latte più giallo e viscoso, ricco di nutrienti essenziali ed anticorpi fondamentali per il sistema immunitario del puledro. La placenta epitelio-coriale della cavalla impedisce il trasferimento degli anticorpi materni al feto in utero, il puledro dipende quindi interamente dal trasferimento passivo di anticorpi grazie al colostro per proteggersi nel periodo neonatale (McKinnon A. et al., 2010).

Il colostro contiene immunoglobuline (IgG), complemento, lattoferrina, lisozima e linfociti che sono essenziali per migliorare il sistema immunitario del puledro. La gamma di anticorpi trasferiti al puledro dipende dagli antigeni a cui la cavalla è stata vaccinata o esposta, le immunoglobuline si concentrano negli alveoli mammari sotto influenza di estrogeni e progesterone nelle ultime settimane di gravidanza. La maggior parte dei puledri assume il primo colostro entro le 2 ore di vita, dopo le 3 ore la quantità di anticorpi che può essere assorbita dall'intestino cala esponenzialmente fino alle 24 ore post nascita.

Nelle cavalle pluripare il tasso medio di secrezione di colostro è di 300 ml/h con una media di colostro prodotto di 2-5 litri al giorno; nello specifico le fattrici purosangue producono un totale di 1-2 litri/giorno. Al momento del parto, la concentrazione media di IgG nel colostro è di 7000 mg/dL con un intervallo fisiologico di 3000-12000 mg/dL, come mostrato in Fig. 2.2.1; l'immunizzazione delle cavalle 4-6 settimane prima del parto aumenta la concentrazione di IgG nel colostro (McKinnon A. et al., 2010).

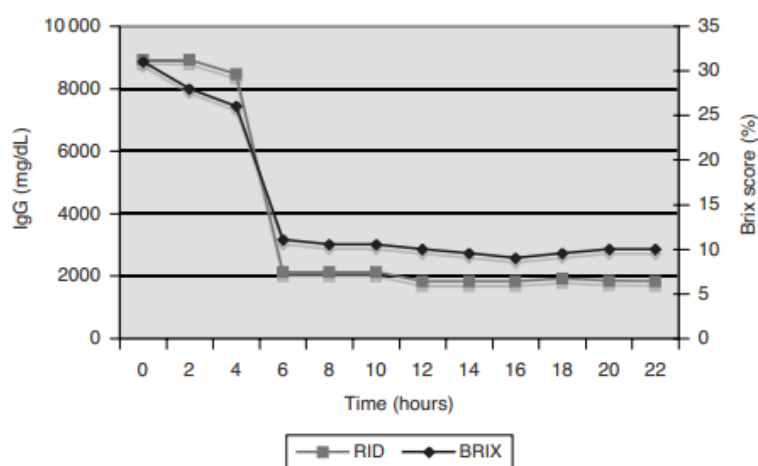


Fig. 1.2.1 Livello di immunoglobulina IgG nel latte equino nelle ore port parto e durante l'allattamento del puledro, misurati mediante immunodiffusione radiale singola (RID) e stimati utilizzando un rifrattometro Brix (per zuccheri) (McKinnon A. et al., 2010).

Nella prima settimana di vita, il puledro assume latte dalle 5 alle 7 volte all'ora per circa 2 minuti, riducendo ad una volta all'ora entro la decima settimana di vita (Davies Morel, 2021). La frequenza di suzione cala durante le ore notturne quando il puledro dorme per periodi di maggiore durata. Il puledro spinge bruscamente la mammella per stimolare il rilascio di latte e cambia capezzolo ad ogni suzione. Entro il secondo giorno il puledro assume circa il 23% del suo peso in latte (McKinnon A. et al., 2010).

La composizione del colostro differisce da quella del latte per maggiori concentrazioni di proteine e grassi e minori concentrazioni di lattosio. L'elevato contenuto di proteine è caratterizzato dalla presenza delle immunoglobuline, specialmente le IgG, che si concentrano nell'alveolo grazie all'influenza degli estrogeni e del progesterone nella tarda gravidanza. Le IgG forniscono protezione immediata dai patogeni ambientali e stimolano lo sviluppo del sistema immunitario del puledro (McKinnon A. et al., 2010).

La concentrazione proteica nel colostro è dell'ordine del 13,5% rispetto al 2-4% presente nel latte (Davies Morel, 2021).

Dopo le prime 12-24 ore la produzione di colostro viene gradualmente sostituita dalla produzione di latte, in quantità crescente nei primi 2-3 mesi di vita del puledro. L'elevata concentrazione proteica presente nel colostro cala, mentre aumenta la quantità di grasso nel latte (Davies Morel, 2021). I livelli di produzione da parte della fattrice nelle prime due settimane sono nell'ordine del 3% del peso corporeo, 4-8 litri al giorno per i purosangue e 2-4 litri al giorno nei pony (Gibbs et al., 1982; Oftedal & Jenness, 1988).

La produzione di latte riflette la domanda che a sua volta riflette la taglia del puledro, la quantità di latte prodotta al picco della lattazione arriva ad un massimo di 10-18 litri al giorno nei purosangue, 14-17 litri in razze pesanti e 8-12 litri nei pony (Davies Morel, 2021). Nei primi tre mesi la fattrice produce una media di latte al giorno corrispondente al 2.1 -5.4% del proprio peso, che comporta un'assunzione di latte da parte del puledro corrispondente al 21 – 25% del proprio peso corporeo (Gibbs et al., 1982; McKinnon A. et al., 2010). Dopo tre mesi, la richiesta di nutrimento da parte del puledro decresce in quanto questo inizia a consumare erba di prato, fieno o alimenti solidi destinati alla madre. (Davies Morel, 2021).

La lattazione naturalmente durerebbe un intero anno con la madre che interrompe la produzione di latte qualche settimana prima del seguente parto; svezzando i puledri a circa sei mesi di vita viene interrotta la curva di lattazione in modo precoce. La produzione totale di latte di una fattrice è di 2000-3000 kg di latte per lattazione, con una media giornaliera di 2-3 kg di latte per 100 kg di peso (Davies Morel, 2021).

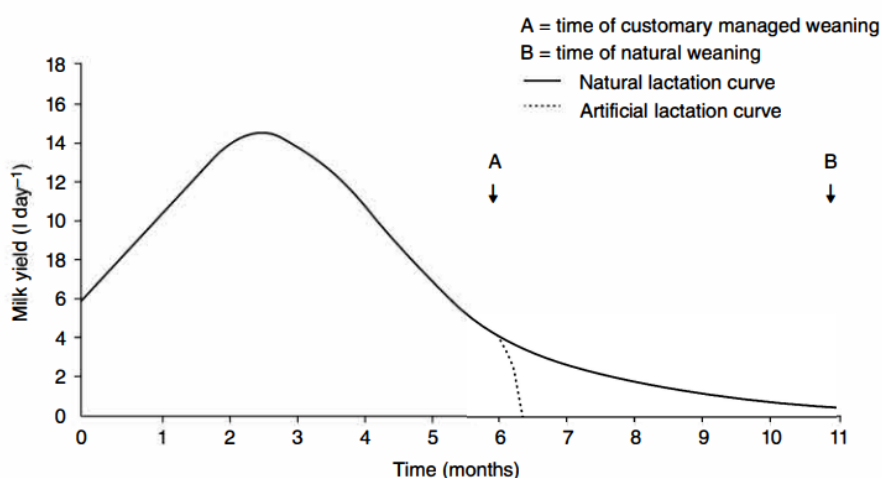


Fig. 1.2.2 Curva di lattazione media nella cavalla, confronto tra lattazione in natura e lattazione imposta dall'uomo con svezzamento intorno ai 6 mesi (Davies Morel, 2021)

Studi hanno dimostrato che cavalle in allattamento raggiungono il massimo della produzione di latte in età compresa tra 8 e 11 anni (Doreau & Martuzzi, 2023). Altri studi hanno dimostrato differenze nella quantità di latte prodotta in base al numero di parti con le primipare che producono meno latte (10.4 kg/giorno) rispetto alle multipare (11.7 kg/giorno) (Gibbs et al., 1982). Anche in altre specie, come i bovini, è stato dimostrato che la produzione di latte delle primipare è inferiore a quelle delle multipare, nello specifico si verifica un aumento della produzione di latte fino ad un'età compresa tra i 6 e gli 8 anni e una successiva diminuzione con l'invecchiamento dell'animale (Lubritz et al., 1989).

Altri fattori quali condizione corporea al parto e dieta, risultano importanti per la produzione di latte. Nel particolare, cavalle molto magre con un BCS (body condition score) inferiore a 1,5 (scala da 1 a 5) producono meno latte rispetto a cavalle con BCS superiore a 3,5. L'effetto della nutrizione sulla produzione di latte rimane incerto: alcuni autori non hanno riscontrato effetti sul supplemento dietetico (MARTIN et al., 1992) mentre altri hanno dimostrato il contrario (Auclair-Ronzaud et al., 2022; Gibbs et al., 1982).

L'efficienza energetica nella produzione di latte da parte della fattrice è del 60%, questo comporta una richiesta di aumento dell'apporto nutrizionale della cavalla del 70-75% all'inizio della lattazione, che cala ad un 50% con l'avanzare di questa (McKinnon A. et al., 2010). Viene consigliato un aumento nell'apporto energetico per migliorare le possibilità di concepimento nel primo calore e aumentare la sopravvivenza dell'embrione (Davies Morel, 2021).

Se le proteine nella dieta della fattrice sono insufficienti, calerà la produzione di latte ed il BCS dell'animale in quanto verranno mobilizzate le riserve corporee pur di mantenere la produzione latte. Un minimo calo di massa corporea durante la lattazione è da considerarsi fisiologico; tuttavia, deve essere minimizzato grazie ad una dieta appropriata. È stato dimostrato che l'energia digeribile ovvero la quantità di energia che un organismo può assorbire ed utilizzare dagli alimenti dopo la digestione, può crescere fino al 100% durante la lattazione, quindi una perdita di peso nella fattrice indica deficienza energetica (Davies Morel, 2021). La perdita di peso può essere accompagnata da cambiamenti del

profilo endocrino risultando voi in un basso tasso riproduttivo nel primo calore post-parto (Shepherd, 2015).

Una deficienza proteica nella dieta può risultare in una perdita di peso della fattrice ma solitamente non coinvolge il peso del puledro se la carenza proteica è prolungata (Cavinder, 2007).

Per una fattrice di 500 chili l'energia digeribile richiesta corrisponde a 31.7 Mcal al giorno nel primo mese di lattazione di cui 1535 grammi di proteina grezza per una massima produzione di latte (National Research Council, 2007).

Durante la lattazione le richieste di calcio e fosforo richiedono un incremento di oltre il 300%: per una fattrice di 500 chili sono necessari 59.1 grammi al giorno di Calcio e 38.3 grammi al giorno di Fosforo nel primo mese di dilatazione. L'aumento del calcio nella dieta è necessario per la crescita e lo sviluppo osseo e tendineo del puledro, carenze in calcio e fosforo sono state riportate essere associate con demineralizzazione scheletrica sistemica della madre per soddisfare le richieste nutrizionali del puledro. Il rapporto calcio-fosforo deve essere bilanciato: eccessivi livelli di fosforo possono portare ad un riassorbimento di calcio dalle ossa della madre per ribilanciare l'equilibrio (Davies Morel, 2021).

Per soddisfare la richiesta di nutrienti necessari alla produzione di latte è richiesto concentrato oltre a foraggio di buona qualità nella dieta della madre, il concentrato però non deve essere maggiore del 50% della dieta totale. Nella dieta post-parto è richiesta una maggiore quantità anche di vitamine: la carenza di queste comporta la presenza di un pelo opaco, una crescita scorretta ed un inefficiente utilizzo dei nutrienti. L'esercizio è un ulteriore fattore di rilevante importanza nel post-parto: è stato correlato ad un'accelerata involuzione uterina con conseguenti migliori tassi di concepimento nel calore del puledro (Davies Morel, 2021; McKinnon A. et al., 2010).

Il foraggio fresco generalmente apporta un adeguato livello di vitamine A ed E nella fattrice mentre il contenuto di queste nel fieno dipende dalla sua qualità: se il fieno appare di colore tendente al verde probabilmente il livello di beta-carotene e alfa-tocoferolo sarà sufficiente a soddisfare i bisogni dell'animale. I caroteni sono gradualmente distrutti dalla luce e dal calore, questo comporta la loro presenza essere maggiore nell'erba fresca rispetto al fieno ed ai concentrati. Fattrici senza l'accesso al pascolo richiedono quindi integrazioni di queste sostanze. Le richieste di vitamina A raddoppiano al momento del parto a causa dell'elevata concentrazione di questa vitamina nel colostro (235 IU/mL) che

successivamente si stabilizza durante la lattazione (7–25 IU/mL). I foraggi freschi contengono anche un'elevata quantità di vitamina E (100–600 IU/kg di sostanza secca), circa dieci volte superiore ai foraggi essiccati: la concentrazione di questa vitamina va a calare con il maturare della pianta. La quantità di vitamina E raccomandata durante la lattazione è di 200 IU ogni 100 kg di peso dell'animale. La quantità di Selenio raccomandata nella dieta della fattrice è di 0.1 mg/kg di sostanza secca, ovvero la stessa quantità richiesta per una cavalla non in lattazione; sufficienti quantità di selenio si possono trovare nel foraggio fresco. Lasciare alle fattrici in lattazione libero accesso al pascolo può essere quindi un'ottima risorsa di energia e nutrienti essenziali come proteine, calcio, fosforo, selenio, vitamina A ed E rispetto alla sola somministrazione di fieno (Remillard, 2023).

### 1.3 METABOLISMO DURANTE LA LATTAZIONE

Durante le fasi di gravidanza e lattazione si verificano cambiamenti del metabolismo: per organi come mammella e utero sono prioritari l'assorbimento di aminoacidi e glucosio dal plasma. Questi organi utilizzano fonti di energia immagazzinata anche in altri tessuti come muscolare e adiposo; l'organismo quindi ridireziona l'utilizzo dei nutrienti tramite il processo di *omeoresi* che riorganizza le risorse metaboliche: è un processo regolato da ormoni (Sjaastad O., 2010).

Cavalle in lattazione presentano minori concentrazioni sieriche di leptina nei primi 2 mesi post-parto, promuovendo la sensazione di fame e quindi un maggiore apporto energetico da parte dell'animale evitando carenze nutrizionali (Deichsel & Aurich, 2005).

Durante la lattazione avviene una riduzione della sintesi dei lipidi ed un aumento della loro degradazione nel tessuto adiposo quando la sintesi del grasso nel latte è elevata (Sjaastad O., 2010). La lipolisi è stimolata dalla presenza dell'ormone della crescita (GH) e da una maggiore risposta e sensibilità alle catecolamine a causa di un maggior numero di  $\beta$ -recettori (Chaves et al., 2013).

Durante la lattazione, la ghiandola mammaria richiede elevate quantità di glucosio per la produzione latte, riducendone la sua concentrazione che a sua volta abbassa il livello di insulina nel sangue. Con minori concentrazioni di insulina nel sangue vengono compromessi lo stimolo della lipogenesi e l'inibizione della lipolisi. Si sviluppa la resistenza all'insulina post-parto come adattamento fisiologico per il risparmio di



glucosio destinato alla produzione di latte riducendo l'effetto inibitorio dell'insulina sulla mobilizzazione dei lipidi. L'ormone della crescita ha un effetto lipolitico che riduce ulteriormente l'effetto dell'insulina, promuovendo la mobilizzazione dei lipidi per fornire energia (Martens, 2020).

Nei periodi di intensa produzione di latte viene ridotto l'assorbimento del glucosio da parte di muscoli e tessuto adiposo e diminuita l'ossidazione mentre aumenta l'utilizzo di questo da parte delle ghiandole mammarie (Sjaastad O., 2010). Queste modifiche nel metabolismo del glucosio sono causate da un'alterata concentrazione ormonale e segnali omeostatici: nello specifico si nota un aumento di ormone della crescita (GH) nel post-parto che causa insulino resistenza nel muscolo e nel tessuto adiposo (Martens, 2020).

Numerose evidenze suggeriscono che l'infiammazione sia coinvolta nella resistenza all'insulina post-parto come risposta adattativa nei confronti dell'omeoresi durante la prima fase di lattazione (Martens, 2020).

Per sintetizzare le proteine del latte viene utilizzata un'elevata quota di amminoacidi derivanti dal sangue, se questi sono assorbiti in via insufficiente dal tratto intestinale, vengono scisse e utilizzate le proteine muscolari delle cellule epiteliali mammarie (Sjaastad O., 2010).

I bassi livelli di IGF-1 (Insulin-Like Growth Factor 1) favoriscono in modo indiretto la proteolisi poiché l'effetto stimolante dell'IGF-1 sulla sintesi proteica e l'inibizione della degradazione sono ridotti. L'IGF-1 è un promotore di crescita muscolare e si correla con la crescita del muscolo striato grazie alle sue proprietà anaboliche (Martens, 2020).

I cambiamenti endocrini che provocano queste alterazioni del metabolismo non sono ancora totalmente chiari anche se la prolattina e l'ormone della crescita partecipano al coordinamento dell'utilizzo dei substrati di muscoli, fegato, tessuto adiposo e mammella durante la lattazione (Sjaastad O., 2010).

L'innalzamento dei livelli di ormone della crescita (GH) e l'abbassamento dei livelli di insulina e IGF-1 sono le alterazioni ormonali predominanti in questa fase e l'insulino resistenza rappresenta un cambio metabolico che si verifica nel post-parto. L'azione dell'ormone della crescita (GH) è mediata dai propri recettori (GHR) che si trovano in molti tessuti soprattutto in fegato e tessuto adiposo. Il legame tra ormone e recettore attiva una cascata di segnali: nel fegato stimola la sintesi di IGF-1 ed il suo rilascio nel torrente circolatorio. IGF-1 Inibisce con un meccanismo di feedback il rilascio di ormone della

crescita (GH) da parte dell'ipofisi; L'espressione dei recettori dell'ormone della crescita (GHR) nel fegato viene aumentato da parte dell'insulina possibilmente spiegando la correlazione tra insulina e IGF-1(Martens, 2020).

#### 1.4 COMPOSIZIONE DEL LATTE EQUINO

Il latte rappresenta l'essenziale risorsa di nutrimento per il puledro soprattutto nel primo mese di vita. Il latte di cavalla si distingue per un profilo nutrizionale unico, caratterizzato da un elevato contenuto di lattosio, acidi grassi insaturi, vitamine, minerali e proteine (Potočnik et al., 2011). La composizione del latte di cavalla cambia con lo stadio di lattazione. Il colostro è significativamente più ricco di proteine e più povero di lattosio rispetto al latte. Rispetto ad altre specie, il passaggio dal colostro al latte avviene più rapidamente nelle fattrici ed è caratterizzato da un calo significativo del contenuto proteico entro le prime 12 ore dopo il parto (Pyles et al., 2023). Il contenuto di acqua si aggira tra 88,7% e 90,2% secondo uno studio effettuato su cavalle di razza Palomino e Percheron (Holmes et al., 1947).

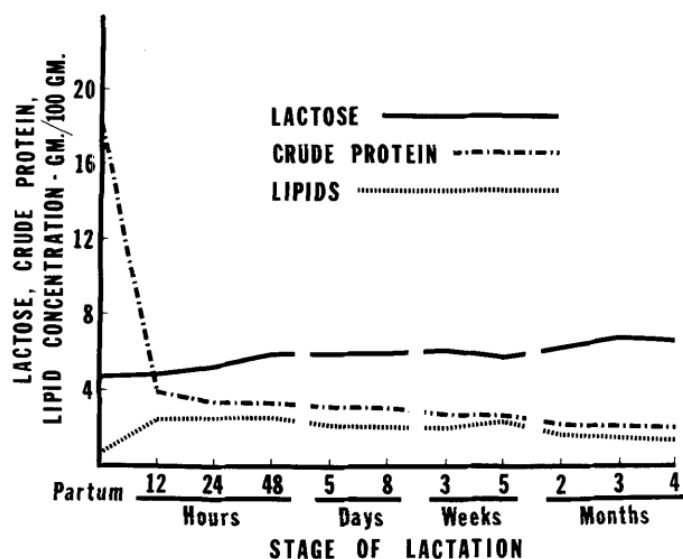


Fig. 1.4.1 Variazioni nella concentrazione di lattosio, proteina grezza e lipidi del latte equino nei vari stadi di lattazione (Ullrev et al., n.d.)

La quantità di grassi nel latte equino risulta essere minore rispetto al latte vaccino ed umano, come mostrato nel grafico 1.4.2 anche se questi dati potrebbero essere incorretti in quanto la concentrazione di grasso tende ad aumentare nell'ultimo latte munto, il quale

risulta difficile da raccogliere completamente. Il grasso è presente nel latte sotto forma di globuli di grassi saturi, acidi grassi liberi, colesterolo e trigliceridi (Davies Morel, 2021). Nel latte gli acidi grassi a media catena hanno un rapporto grassi insaturi a saturi di 1:3; il latte equino è un'ottima risorsa di acido linoleico e acido  $\alpha$ -linoleico, fondamentali per lo sviluppo del sistema nervoso. Il contenuto di trigliceridi è minore rispetto al latte bovino ed umano ma più ricco di acidi grassi liberi (free fatty acids) e fosfolipidi necessari per le membrane cellulari (Musaev et al., 2021).

La composizione proteica è simile a quella ritrovata nel latte umano: 8.30% e 7.60% rispettivamente. Le proteine del siero del latte (whey proteins) risultano essere 20% più elevate rispetto al latte bovino: circa un 40% delle proteine totali. Mentre il latte bovino è definito caseinico, il latte equino è di tipo albuminico (Musaev et al., 2021). Le caseine presenti nel latte equino, sotto l'influenza del pH gastrico formano degli agglomerati insieme all'enzima rennina, insieme facilitano la digestione degli enzimi da parte degli enzimi proteolitici del tratto digestivo. Le caseine contengono amminoacidi essenziali e sono coinvolte nel trasporto di minerali dalla madre al puledro: si associano a ioni Calcio, Fosforo e Magnesio formando micelle e permettendo così un maggior trasporto di queste sostanze (Davies Morel, 2021).

Species	Total solids %	Fat %	Casein protein %	Whey protein %	Lactose %
Human	12,4	3,8	0,4	0,6	7
Cow	12,7	3,7	2,8	0,6	4,8
Goat	13,2	4,5	2,5	0,4	4,1
Sheep	19,3	7,4	4,6	0,9	4,8
Horse	11,2	1,9	1,3	1,2	6,2

Fig 1.4.2 Composizione del latte comparata tra specie espressa in percentuali (Davies Morel, 2021)

Le proteine del siero del latte sono la  $\beta$ -lattoglobulina (28-60% delle whey proteins) e  $\alpha$ -lattoalbumina (26-50% delle whey proteins). L'  $\alpha$ -lattoalbumina è un'ottima risorsa di amminoacidi essenziali come il triptofano. Sono presenti, inoltre, proteine del siero del latte presenti anche nel sangue: albumina sierica (2-15% delle whey proteins) e la globulina sierica (11-21 % delle whey proteins) (Gibbs et al., 1982).

L'albumina sierica è direttamente trasferita dal sangue, alla cellula lattifera al lume alveolare e si trova in minime quantità nel latte; la globulina sierica invece è la frazione immunologica del latte quindi la sua concentrazione è molto elevata nel colostro (Davies Morel, 2021).

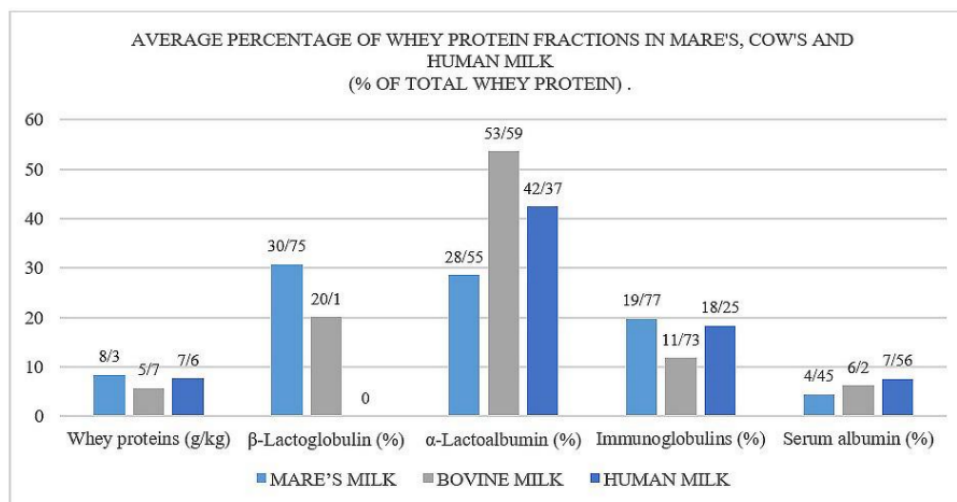


Tabella 1.4.3 Percentuali medie delle proteine del siero del latte (whey proteins) nel latte equino, umano e bovino (% sul totale di whey proteins) (Musaev et al., 2021)

Il latte equino contiene livelli dell'amminoacido glutammina tre volte maggiori rispetto al latte bovino e di asparagina, treonina, serotonina, prolina, leucina, e lisina sei volte maggiori (Musaev et al., 2021).

I carboidrati sono presenti soprattutto in forma di oligosaccaridi che compongono la superficie dello strato esterno di globuli lipidici. Formano una struttura ramificata simile al latte umano che non si trova nel latte vaccino (Musaev et al., 2021).

La principale fonte di carboidrati è costituita da lattosio (5.9-6.9%), ogni molecola di lattosio viene scissa in glucosio e galattosio quando raggiunge l'intestino del puledro. Il lattosio permette di aiutare l'attività intestinale del puledro regolando la flora batterica, stabilizzando il pH e favorendo l'assorbimento dei minerali (Davies Morel, 2021).

Il latte di equide contiene vitamine A, D3, E, K2, C, B1, B2, B3, B6, B12. La quantità di vitamina C (1280-8100 µg/l) presente è maggiore rispetto al latte bovino (300-2300 µg/l): ha un elevato valore nutrizionale grazie alle sue proprietà antinfiammatorie e alla sua resistenza ai processi ossidativi. Anche la vitamina D è presente in maggiori quantità nel latte equino (4.93 µg/l) rispetto a quello umano (0.03-0.12 µg/l) (Musaev et al., 2021).

Il latte è generalmente un'ottima risorsa di calcio e fosforo necessari per la crescita ossea oltre al magnesio utile per la mineralizzazione. Il latte di cavalla contiene pochi minerali rispetto a quello bovino; il rapporto calcio fosforo è tuttavia maggiore (1.6-1.8:1 rispetto a 1.4:1) (Musaev et al., 2021).

La concentrazione del Potassio e del Sodio nel colostro tendono ad essere elevate, rispettivamente 1200 e 500 mg kg<sup>-1</sup>, calano a 700 e 225 mg kg<sup>-1</sup> entro la prima settimana e poi ulteriormente a 500 and 150 mg kg<sup>-1</sup> nelle settimane 9-21 post-parto. Il Calcio è elevato nel colostro, successivamente cala e poi risale con un picco di 1200 mg kg<sup>-1</sup> durante la terza settimana post-parto. Anche Magnesio e Fosforo sono maggiormente concentrati nel colostro e vanno a diminuire la loro presenza nel latte (Davies Morel, 2021).

È visibile una tendenza in tutte le componenti del latte che porta le concentrazioni dei nutrienti a diminuire con l'avanzamento della lattazione, è il modo fisiologico con cui la fattrice incoraggia il puledro a cercare nutrimento presso altre fonti (Davies Morel, 2021).

Component	Concentration
Water (%)	89.0
Protein (g kg <sup>-1</sup> )(%)	19–40 (1.9–4)
Lactose (g kg <sup>-1</sup> )(%)	51–69 (5.1–6.9)
Fat (g kg <sup>-1</sup> )(%)	6–20 (0.6–2.0)
Energy (kcal 100 g <sup>-1</sup> )	46–60
Ash (minerals, vitamins, etc.; g kg <sup>-1</sup> )(%)	6–3.0 (0.06–0.3)
Ca (mg kg <sup>-1</sup> )(%)	600–1200 (0.06–0.12)
P (mg kg <sup>-1</sup> )(%)	230–800 (0.023–0.08)
Mg (mg kg <sup>-1</sup> )(%)	30–100 (0.003–0.01)
K (mg kg <sup>-1</sup> )(%)	400–700 (0.04–0.07)
Na (mg kg <sup>-1</sup> )(%)	160–246 (0.016–0.025)
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )(%)	200–450 (2×10 <sup>-5</sup> –4.5×10 <sup>-5</sup> )
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )(%)	1800–2500 (1.8×10 <sup>-4</sup> –2.5×10 <sup>-4</sup> )

Fig. 1.4.4 Composizione media del latte equino durante la lattazione della fattrice (Davies Morel, 2021)

## 1.5 ATTIVITA' ANTIMICROBICA

Il latte equino risulta avere ottime proprietà antibatteriche grazie alla presenza di lisozima e lattoferrina. Il lisozima, noto anche come N-acetilmuramidasi, è un enzima di tipo idrolasi che catalizza i polimeri di peptidoglicano della parete cellulare batterica, provocando così la lisi dei batteri sensibili. L'attività antibatterica del lisozima è principalmente diretta contro i batteri gram positivi grazie ai peptidoglicani presenti nella parete cellulare, ottimo substrato per questo enzima. Il lisozima inibisce anche virus (HIV), microrganismi eucariotici come parassiti (trofozoiti di *Entamoeba histolytica*), e funghi (*Candida albicans*) (Musaev et al., 2021).

Recenti ricerche dimostrano che la quantità di lisozima nel latte equino è la più elevata tra tutti i tipi di latte finora studiati con quantità circa 6000 volte superiori a quelle presenti nel latte bovino (Conte et al., 2012). Si pensa che l'elevata quantità di lisozima sia protettiva a livello di ghiandola mammaria prevenendo le possibili mastiti, frequenti nel latte bovino che si dimostra povero di lisozima (McKinnon A. et al., 2010).

Un'ottima attività antimicrobica è data anche dalla lattoferrina: una glicoproteina legante ferro dalla famiglia delle transferrine. L'attività batteriostatica della lattoferrina è data dalla sua capacità di estrarre lo ione  $Fe^{3+}$ , limitandone l'uso da parte dei batteri e bloccando così la loro crescita; la funzione battericida invece è data dalla sua diretta interazione con la parete cellulare batterica (Musaev et al., 2021).

Altri costituenti del latte equino come specifiche immunoglobuline (IgM, IgG, IgA), componenti lipidiche, citochine e prostaglandine hanno un importante ruolo di difesa contro i virus (Hamosh, 1998).

Fattori come lisozima, lattoferrina e le immunoglobuline sono essenziali per il mantenimento della salute intestinale del puledro, promuovendo crescita e salute generale dell'animale durante l'allattamento. Uno studio ha dimostrato come suinetti di otto settimane, assumendo latte di capra transgenico con aggiunta di lisozima per due settimane, hanno arricchito il loro intestino di bifidobatteri e lattobacilli, essenziali per la salute intestinale di questi animali. Il lisozima è quindi fondamentale nel promuovere la crescita di batteri buoni per la salute intestinale (Mienaltowski et al., 2024).

## 2. STRESS OSSIDATIVO

### 2.1 DEFINIZIONE DI STRESS OSSIDATIVO

Lo stress ossidativo rappresenta una condizione fisiopatologica in cui l'equilibrio tra la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e la capacità del sistema biologico di disintossicare i reattivi intermedi e di riparare i danni conseguenti viene a mancare o risulta inefficiente (Bullone & Lavoie, 2017).

La formazione dei ROS avviene principalmente attraverso processi metabolici fisiologici, tra cui la catena di trasporto degli elettroni (ETC) nella membrana mitocondriale, utile assieme al processo di fosforilazione ossidativa, per produrre energia sotto forma di ATP. Durante la respirazione cellulare, una piccola percentuale di elettroni sfugge dalla catena di trasporto degli elettroni e si combina con l'ossigeno molecolare per formare il superossido ( $O_2^-$ ), che può successivamente generare altre specie reattive come il perossido di idrogeno e il radicale ossidrile attraverso reazioni chimiche specifiche (Lushchak, 2014).

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) includono vari tipi di molecole e radicali liberi derivati dall'ossigeno, tra cui il superossido ( $O_2^-$ ), radicale ossidrile ( $OH^\cdot$ ), perossile ( $ROO^\cdot$ ) ed il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). Il perossido di idrogeno non è un radicale libero, ma è chimicamente più attivo dell'ossigeno molecolare motivo per cui è incluso nel gruppo dei ROS. Oltre alle specie reattive dell'ossigeno ci sono anche quelle dell'azoto (NOS) come, ad esempio, l'ossido nitrico ( $NO^\cdot$ ), diossido di azoto ( $NO_2^\cdot$ ) e perossinitrito ( $ONOO^-$ ). La molecola di perossido di idrogeno che accetta un altro elettrone viene scissa in radicale ossidrile ( $HO^\cdot$ ) e anione ossidrile ( $OH^-$ ). Infine, il radicale idrossile interagisce con un altro elettrone e protone con conseguente formazione di molecole d'acqua (Bullone & Lavoie, 2017; Lushchak, 2014).

Il 90% dei ROS sono prodotti dai mitocondri, in percentuali minori invece dalla catena di trasporto degli elettroni nel reticolo endoplasmatico (ER), dalle membrane nucleari e dalle ossidasi. Le ossidasi sono enzimi che catalizzano reazioni di ossidazione, utilizzando l'ossigeno molecolare come accettore di elettroni; ossidano carboidrati, aldeidi, amminoacidi, composti eterociclici ed altro. La NADPH ossidasi, ad esempio, è un complesso enzimatico che genera specie reattive dell'ossigeno in modo controllato per

diverse funzioni fisiologiche come la difesa immunitaria contro i patogeni ma anche in altre cellule non immunitarie per funzioni regolatorie specifiche (Lushchak, 2014).

Un'altra ossidasi molto studiata nell'ambito animale è la xantina ossidasi: è stato dimostrato che in ambiente ipossico sia il maggior produttore di specie reattive dell'ossigeno (Bullone & Lavoie, 2017).

L'auto-ossidazione è un processo mediante il quale molecole organiche reagiscono spontaneamente con l'ossigeno molecolare, producendo ROS. Questo fenomeno può avvenire con diverse molecole endogene, come l'adrenalina e la noradrenalina o con xenobiotici, composti estranei all'organismo, contribuendo così all'incremento dello stress ossidativo. Nello specifico l'auto-ossidazione delle catecolamine porta alla formazione di radicali idrossilici, i quali possono alterare il normale funzionamento cellulare e causare patologie cardiovascolari e neurodegenerative. Questo fenomeno viene attenuato da processi come l'O-metilazione, un processo enzimatico che aggiunge un gruppo metile alle catecolamine e l'ormone melatonina, che diminuiscono la produzione di ROS (Miller et al., 1996).

Lo stress ossidativo è una condizione patologica risultato di un eccesso di specie reattive dell'ossigeno (ROS) rispetto alle risorse antiossidanti dell'organismo, gli antiossidanti svolgono quindi un ruolo fondamentale nella protezione delle cellule dallo stress ossidativo. Gli antiossidanti possono essere classificati in due categorie principali: enzimatici e non enzimatici. Gli antiossidanti enzimatici, come la superossido dismutasi (SOD), la catalasi e la glutazione perossidasi, svolgono un ruolo chiave nel convertire il superossido in perossido di idrogeno e acqua, riducendo i ROS a molecole meno reattive. Altri antiossidanti enzimatici di recente scoperta sono: eme ossigenasi 1 (HO-1), tioredossina, perossiredossina, glutaredossina. Gli antiossidanti non enzimatici invece includono molecole come le vitamine C ed E, il coenzima Q10, i polifenoli,  $\beta$ -carotene, albumina, acido urico ed il glutatione (GSH), tripeptide costituito da cisteina, glicina e glutammato. Questi composti agiscono principalmente donando elettroni ai ROS, neutralizzandoli e impedendo loro di reagire con componenti cellulari vitali come lipidi, proteine e DNA (Bullone & Lavoie, 2017; Lushchak, 2014).

Gli antiossidanti possono essere ulteriormente suddivisi in base alla loro massa molecolare: maggiore o minore di un kilodalton. Gli antiossidanti a bassa massa



molecolare, come la vitamina C, il tocoferolo e il glutatione, possono facilmente penetrare nelle cellule e interagire direttamente con i ROS, mentre quelli ad alta massa molecolare, che includono proteine e complessi proteici, agiscono sequestrando i ROS o prevenendone la formazione attraverso meccanismi più complessi (Azat Aziz et al., 2019; Lushchak, 2014).

Nessun sistema enzimatico è in grado di eliminare il radicale ossidrile ( $\text{OH}^\cdot$ ) e la prevenzione della produzione è il miglior modo per la protezione dell'organismo dai suoi effetti dannosi. La formazione del radicale ossidrile viene bloccata dagli antiossidanti a bassa massa molecolare anche se alcune molecole di  $\text{OH}^\cdot$  e altri ROS possono evadere i sistemi protettivi dell'organismo e recare danni alle cellule (Lushchak, 2014).

Le cause di stress ossidativo sono molteplici: aumento dei composti ossidanti dati da elevati livelli di composti endogeni ed esogeni che subiscono processi di auto ossidazione, deplezione degli antiossidanti a causa di una dieta inadeguata, diminuzione della produzione o inattivazione degli enzimi antiossidanti, esposizione a tossine ambientali, infiammazione cronica, stress fisico, radiazioni ionizzanti o una combinazione di più fattori elencati. Anche una situazione di stress cronico può aumentare la produzione di ROS alterando l'equilibrio ossidativo e favorendo l'infiammazione ed il danno tissutale (Lushchak, 2014).

Lo squilibrio che si crea tra sostanze ossidanti ed antiossidanti può colpire molti, se non tutti i processi fisiologici. In condizioni fisiologiche, il livello di ROS fluttua in un determinato intervallo definito dal funzionamento di enzimi ossidanti e molecole antiossidanti. A causa di alcuni motivi, come l'introduzione di elevate quantità di molecole ossidanti, il livello di ROS può aumentare bruscamente e lasciare l'intervallo di condizioni di controllo (steady-state, stationary level) (Lushchak, 2011b). Se i sistemi antiossidanti sono in grado di far fronte adeguatamente a quantità di ROS aumentate, questo livello torna a condizioni fisiologiche standard: questo evento viene definito stress ossidativo acuto. Se il livello di ROS resta elevato si stabilizza nella zona definita stress ossidativo cronico, portando a modifiche di diverse componenti cellulari e ad un disturbo dell'omeostasi. Un ulteriore scenario può succedere dopo *l'oxidative boost* (picco ossidativo): il livello di ROS non torna a livelli fisiologici ma si stabilizza ad un nuovo livello (quasi-stationary level) come si evince dalla figura x (Lushchak, 2011a, 2014).

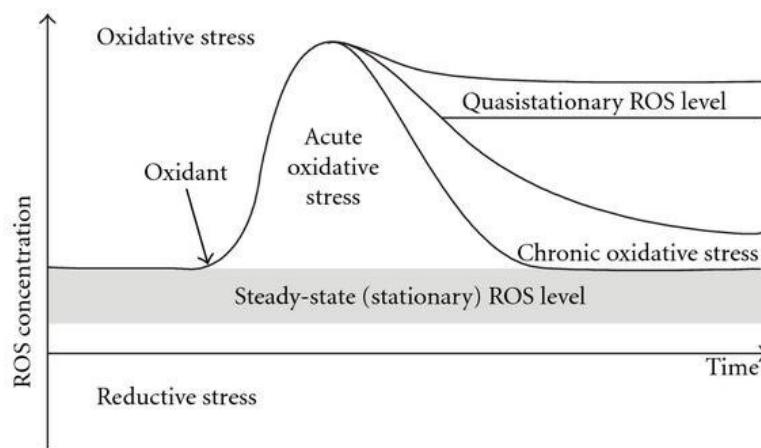


Figura 2.1 I livelli stazionari delle specie reattive dell'ossigeno fluttuano in un certo intervallo in condizioni fisiologiche. Tuttavia, sotto stress i livelli di ROS possono aumentare o diminuire oltre l'intervallo normale con conseguente stress ossidativo acuto o cronico. In alcune condizioni, i livelli di ROS potrebbero non tornare al loro intervallo iniziale e stabilizzarsi a un nuovo livello quasi stazionario (Lushchak, 2012).

Alcune patologie come cancro, diabete mellito, malattie cardiovascolari e neurodegenerative sono esempi di stress ossidativo cronico; in queste situazioni patologiche è importante investigare per capire se lo stress ossidativo cronico sia causa di patologia o viceversa (Leinonen, 2014; Lushchak, 2014).

Lo stress ossidativo non è indotto solo da sostanze ossidanti o composti esogeni che portano la produzione di ROS: è stato dimostrato che all'aumentare dei livelli esterni di ossigeno aumenta lo stress ossidativo e che in simil modo anche condizioni di danno da ischemia/riperfusionne lo provocano. Al contrario sono state approfondite conoscenze anche sui danni cellulari provocati da situazioni di ipossia (Kudoh et al., 2014; Lushchak, 2014).

## 2.2 OSSIDAZIONE DELLE PROTEINE

Le proteine sono ubiquitarie nella cellula, hanno svariate ed uniche funzioni biologiche; la loro ossidazione può portare a cambiamenti strutturali e di conseguenza a modifiche delle loro funzioni come quelle di recettori, enzimi, trasporto o struttura con effetti dannosi per la cellula. L'ossidazione proteica è un processo chimico in cui le proteine subiscono modifiche alla catena principale e alle catene laterali dovute all'interazione con

specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (NOS). Le proteine sono particolarmente vulnerabili all'ossidazione perché contengono aminoacidi con gruppi funzionali suscettibili come cisteina e metionina in quanto contengono atomi di zolfo particolarmente suscettibili (Celi & Gabai, 2015; Gianazza et al., 2007). Infezioni, infiammazioni, esposizione a radiazioni, tossine ambientali e processi metabolici anomali sono esempi di cause che possono portare all'ossidazione proteica (Hawkins & Davies, 2019).

Se non vengono riparate o rimosse, le proteine ossidate sono spesso tossiche e possono minacciare il normale funzionamento cellulare formando grandi aggregati a causa di legami covalenti o aumentata idrofobicità in quanto residui alifatici ed aromatici vengono esposti al riarrangiamento della struttura secondaria e terziaria proteica (Gianazza et al., 2007; Grune T, 2003). La risposta immunitaria può essere influenzata dall'ossidazione proteica, poiché i peptidi ossidati e strutturalmente modificati, possono essere riconosciuti come antigeni anomali, innescando risposte autoimmuni (Hawkins & Davies, 2019).

I prodotti dell'ossidazione delle catene laterali proteiche sono molto stabili e hanno un'emivita relativamente lunga per questo motivo sono utili *biomarkers* per dimostrare la presenza di stress ossidativo. Il dosaggio dei carbonili misura i gruppi carbonilici delle proteine, la carbonilazione avviene quando i ROS attaccano le catene laterali amminoacidiche di prolina, arginina, lisina e treonina in presenza di metalli di transizione (carbonilazione proteica primaria). La carbonilazione avviene anche in composti come carboidrati e lipidi che hanno gruppi carbonilici reattivi prodotti durante l'ossidazione e la lipoperossidazione: si legano a catene laterali amminoacidiche, specialmente lisina, cisteina e istidina (carbonilazione proteica secondaria). I prodotti proteici di ossidazione avanzata (AOPP) possono essere definiti come markers sintetici di ossidazione proteica e possono aumentare in risposta all'attivazione neutrofilica durante le infezioni dimostrandosi utili biomarcatori di mieloperossidasi (Celi & Gabai, 2015).

L'ossidazione di proteine ricche in cisteina e metionina è reversibile grazie ad enzimi come le reduttasi, glutatione ed il sistema redox della tioredoxina, capace di ridurre l'ossidazione. È importante considerare che le proteine ossidate non sempre possono essere riparate o degradate efficacemente dalle cellule, portando all'accumulo di proteine disfunzionali che possono contribuire a malattie degenerative e a disfunzioni cellulari croniche (Celi & Gabai, 2015; Gianazza et al., 2007).

### 2.3 PEROSSIDAZIONE LIPIDICA

I lipidi sono componenti essenziali dell'unità cellulare contenuti nella membrana plasmatica, nell'apparato di Golgi e nel reticolo endoplasmatico. La membrana cellulare è composta da un doppio strato lipidico che fornisce un'integrità strutturale alla cellula. La fluidità della membrana influisce sulle proprie funzioni e maggiore è il numero di doppi legami contenuti dagli acidi grassi polinsaturi (PUFA), maggiore è la fluidità; questa proprietà dall'altro lato rende gli acidi grassi suscettibili all'ossidazione a causa del riarrangiamento dei doppi legami nella molecola. Con la formazione dei radicali liberi, gli elettroni del doppio legame permettono una rapida reazione con l'ossigeno per formare radicali perossilici, che possono attrarre un ulteriore atomo di idrogeno della struttura lipidica con la formazione di idroperossidi e permettendo la propagazione della reazione a catena dei radicali liberi (Demirci-Çekiç et al., 2022).

I lipidi più suscettibili a perossidazione sono PUFA con più di 2 doppi legami in posizione cis ed i loro esteri: vengono ossidati da una reazione a catena indotta dai ROS; nello specifico si tratta di acido linoleico, acido arachidonico, acido docosaesaenoico e l'acido eicosapentaenoico (Demirci-Çekiç et al., 2022).

Nella perossidazione lipidica enzimatica, LOX, COX e CYP ossidano selettivamente i lipidi grazie a meccanismi regolati. LOX è una diossigenasi che contiene ferro non eme in grado di catalizzare la diossigenazione dei PUFA che contengono almeno due doppi legami cis isolati (acido linoleico e arachidonico sono substrati). Le lipossigenasi (LOX) ossidano gli acidi grassi liberi ricavati dai lipidi esteri dalla fosfolipasi citosolica A2 mentre altre isoforme di LOX sono in grado di ossigenare acidi grassi dei fosfolipidi ed esteri del colesterolo direttamente nelle membrane cellulari. Le ciclossigenasi (COX) catalizzano una reazione di bis-diossigenazione formando un intermedio endo-perossido instabile, la prostaglandina G<sub>2</sub>, ridotta poi a prostaglandina H<sub>2</sub> da un'idroperossidasi e poi convertita in vari prostanoidi.

Gli enzimi CYP funzionano come monoossigenasi ed hanno specifici substrati; ne esistono due forme: idrossilasi ed epossigenasi in grado di ossidare acidi grassi insaturi per produrre idrossidi ed epossidi (Demirci-Çekiç et al., 2022; Gaschler & Stockwell, 2017; Niki, 2021).

Nell'ossidazione lipidica non enzimatica invece, i lipidi subiscono ossidazione a causa dell'azione di radicali liberi senza l'intervento di enzimi specifici. Nello specifico, il radicale biossido di azoto agisce principalmente con l'acido linoleico (Niki, 2021).

A causa della perossidazione lipidica a livello di membrana cellulare vengono influenzati i sistemi di trasporto, interrotto il mantenimento dell'equilibrio ionico intracellulare ed extracellulare e cambiata la permeabilità della membrana. (Niki, 2021). La perossidazione lipidica avviene in tre fasi: iniziazione, propagazione e terminazione. La prima fase avviene con la rimozione di un atomo di idrogeno dal gruppo metilenico della catena laterale dei PUFA da parte del radicale libero. Con la perdita dell'atomo di idrogeno un elettrone spaiato resta sul carbonio trasformando il radicale dell'acido grasso in un diene per essere più stabile termodinamicamente. Nella fase di propagazione i radicali dell'acido grasso acquisiscono ossigeno per formare il radicale lipidico perossilico che inizia la reazione a catena sottraendo un idrogeno da un altro PUFA. Nella fase terminale si formano prodotti non radicali, alcanali ed alchenali, i quali manifestano proprietà tossiche (Demirci-Çekiç et al., 2022).

Nella perossidazione dei fosfolipidi di membrana causata da ROS, si formano idroperossidi reattivi e composti carbonilici secondari come 4-idrossi-2-nonenale (HNE), malondialdeide, acrilaldeide, crotonaldeide e metilgliossale (Demirci-Çekiç et al., 2022). La perossidazione lipidica può essere indotta da fonti esogene come l'inquinamento ambientale, il fumo, la luce, tossine o da radicali generati da sistemi enzimatici endogeni come NADPH ossidasi (Demirci-Çekiç et al., 2022; Gaschler & Stockwell, 2017).

Oltre all'ossidazione di lipidi da parte di enzimi e da radicali liberi, anche specie ossidanti non radicaliche come ipoclorito, il radicale anione carbonato ed il biossido di azoto colpiscono i lipidi a causa di una difficile neutralizzazione da parte della vitamina E (Niki, 2021). La vitamina E è un ottimo antiossidante liposolubile che permette di interrompere le catene di reazioni radicaliche che portano alla perossidazione dei lipidi. Questa vitamina agisce proteggendo le membrane cellulari e neutralizzando i radicali liberi, riducendo così i livelli di sostanze reattive all'acido tiobarbiturico come la malondialdeide (MDA) (Chandra et al., 2013).

Gli effetti negativi potenzialmente causati dalla perossidazione lipidica sono molteplici: come precedentemente citato i lipidi ossidati danneggiano le membrane cellulari compromettendo struttura e funzione cellulare, possono inoltre innescare risposte

infiammatorie aggravando precedenti condizioni patologiche (Yin et al., 2011). L'abilità dei prodotti dell'ossidazione lipidica di generare secondi messaggeri tossici è stata utile per lo studio di diverse patologie, tra cui malattie neurodegenerative dell'encefalo e del sistema nervoso centrale come Alzheimer e Morbo di Parkinson (Gaschler & Stockwell, 2017).

La perossidazione lipidica presenta tuttavia aspetti positivi: è stato dimostrato come il prodotto della reazione della reazione di ossidazione, il 4-idrossi-2-nonenale (HNE), agisca come molecola di segnalazione modulando vie di trasduzione del segnale, influenzando quindi processi come la proliferazione cellulare e l'apoptosi. Gli endoperossidi lipidici sono composti intermedi nella formazione delle prostaglandine, rendendo la perossidazione lipidica importante anche nella regolazione dei processi infiammatori. (Gaschler & Stockwell, 2017).

## 2.4 OSSIDAZIONE DEL DNA

L'interazione tra DNA e specie reattive dell'ossigeno può causare cross-link ovvero legami covalenti tra DNA e proteine, alterazioni dello scheletro zuccherino e delle basi del DNA, cross-linking tra basi sullo stesso filamento o su filamenti opposti della doppia elica del DNA oppure rotture del singolo o doppio filamento. I cross-link interfilamento sono tra i danni al DNA più citotossici e difficili da riparare in quanto bloccano il filamento di DNA nella sua separazione durante replicazione e trascrizione. I ROS reagendo con la porzione zuccherina del DNA possono generare radicali a livello del carbonio dello zucchero portando a rottura del filamento con formazione di prodotti zuccherini e siti apurinici o apirimidinici (Baiken et al., 2021; Deans & West, 2011; Demirci-Çekiç et al., 2022).

La guanina è la base del DNA che più facilmente si ossida a causa del suo potenziale redox più basso ovvero una maggiore facilità a perdere elettroni predisponendo ad ossidazione; viene così trasformata a 8-osso-7,8-diidrodeossiguanina grazie al trasferimento di un elettrone a specie reattive dell'ossigeno. Due principali prodotti risultano dalle modificazioni della guanina: 8-idrossiguanosina (8-OH-G) se in presenza di ossigeno e 2,6-diammino-4-idrossi-5-formamidopirimidina (FapyG) quando sono presenti agenti riducenti (Demirci-Çekiç et al., 2022). Similmente possono formarsi

rispettivamente 8-OH-Ade e FapyA dall'adenina, glicole di timina e 5-FoU dalla timina e glicole di citosina, 5-OHC e 5-OHU dalla citosina. (Demirci-Çekiç et al., 2022)

Le lesioni provocate al DNA vengono segnalate da alcune proteine che riconoscono lesioni o alterazioni di cromatina che possono portare a danni al DNA; trasduttori del segnale attivano poi gli effettori per la riparazione dei danni. Una delle lesioni più pericolose è la rottura del doppio filamento ed una singola lesione di queste può causare apoptosi, inattivare geni chiave o portare ad aberrazioni cromosomali (Barzilai & Yamamoto, 2004).

I danni creati al DNA a causa dello stress ossidativo vengono riparati grazie ad alcuni principali meccanismi: riparazione per escissione di basi (BER), riparazione per escissione di nucleotidi (NER) e riparazione dei mismatch (MMR). BER è un meccanismo che permette alla cellula di riparare lesioni alle basi del DNA che non provocano distorsione dell'elica come la guanina ossidata a 8-oxoG. NER si occupa di lesioni di maggiori dimensioni distorcenti l'elica del DNA, derivanti da fattori ambientali, radiazioni UV, agenti chimici oltre a danni causati da stress ossidativo. Viene rimosso il segmento danneggiato ed il *gap* riempito da DNA polimerasi. Il meccanismo di riparazione MMR scova e ripara errori prodotti durante la replicazione del DNA come inserzione o delezione errata del nucleotide. Nell'uomo sono state identificate specifiche proteine in grado di legarsi ai nucleotidi errati facilitando la loro rimozione (Shadfar et al., 2023).

Le conseguenze di questi danni al DNA originano da cause endogene od esogene e se non riparati possono portare a riarrangiamenti cromosomici che portano allo sviluppo di possibili patologie come cancro, malattie cardiovascolari e neurodegenerative (Demirci-Çekiç et al., 2022).





### 3. MARKERS CORRELATI ALLO STRESS OSSIDATIVO

Nel contesto dello stress ossidativo, un aspetto cruciale della ricerca veterinaria riguarda l'identificazione e l'analisi dei markers specifici che indicano la presenza e l'entità di danno ossidativo nei tessuti. Nel caso del latte di cavalla, questi markers, come i prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP), i gruppi tiolici, i carbonili proteici, il malondialdeide (MDA), glucosio e lattati permettono di comprendere le dinamiche dello stress ossidativo e le sue implicazioni sulla salute generale dell'animale. Lo studio di questi biomarkers permette di valutare il grado di stress ossidativo, ma anche di monitorare l'efficacia di eventuali interventi nutrizionali o terapeutici mirati a migliorare il benessere della cavalla durante il periodo di lattazione.

#### 3.1 AOPP

Gli Advanced Oxidation Protein Products (AOPP) ovvero “prodotti proteici di ossidazione avanzata” sono considerati marcatori utili per valutare il danno ossidativo nelle matrici biologiche, incluso il latte. Questi composti si formano a seguito dell'ossidazione delle proteine e sono indicatori di uno stato di stress ossidativo, che può influenzare la salute e la produttività degli animali. Gli AOPP si formano attraverso reazioni chimiche che coinvolgono specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'ossidazione delle proteine, ad esempio durante stati infiammatori e infezioni. L'attivazione dei neutrofili, che avviene in risposta a stimoli infiammatori, porta all'aumento della produzione di ROS e alla formazione di AOPP, rendendoli indicatori utili di stress ossidativo e infiammazione (Bordignon et al., 2014; Falomo et al., 2020; Gabai et al., 2019).

Un importante contributo alla formazione di AOPP risulta quindi dagli ossidanti clorurati prodotti dalla mieloperossidasi (MPO) derivata dai neutrofili attivati. I neutrofili hanno la funzione di ingerire e distruggere i patogeni invasori essendo cellule predominanti coinvolte nell'infiammazione acuta, sono una delle maggiori fonti di ossidanti nei mammiferi. La MPO utilizza il perossido di idrogeno ed il cloruro per produrre acido ipocloroso (HOCl), questo composto è reattivo e possiede proprietà microbica danneggiando però anche le proteine dell'ospite e portando alla formazione di AOPP. Gli AOPP dopo essersi formati possono agire come mediatori di stress ossidativo

influenzando ulteriormente l'attività di monociti e neutrofili innescando ulteriori risposte ossidative (Bordignon et al., 2014; Celi & Gabai, 2015; Falomo et al., 2020).

Nel contesto delle cavalle uno studio evidenzia che concentrazioni plasmatiche elevate di AOPP sono state osservate in animali che mostrano segni clinici di involuzione uterina ritardata indicando una condizione di lieve stress ossidativo possibilmente collegato a uno stato infiammatorio generale che attivando neutrofili periferici contribuisce alla formazione di AOPP. I livelli di stress ossidativo ed infiammazione osservati in cavalle postpartum è tuttavia risultato inferiore rispetto a quello di vacche da latte in presenza di endometrite (Falomo et al., 2020).

Nelle bovine da latte livelli di AOPP elevati sono stati associati a problemi di salute come il rischio aumentato di malattie metaboliche e infiammazioni subcliniche come la mastite (Zachut et al., 2020).

In un ulteriore studio su bovine è stato osservato che i livelli plasmatici di AOPP aumentano in risposta alla crescita dell'animale ed a cambiamenti nutrizionali suggerendo il loro utilizzo come biomarcatori per monitorare lo stato di salute in relazione a bilancio ossidativo e risposte infiammatorie (Bordignon et al., 2014).

### 3.2 TIOLI

I tioli, molecole che contengono una catena laterale sulfidrilica (SH), fungono da antiossidanti stabilizzando i radicali liberi accettando il loro elettrone spaiato. La cisteina e la metionina sono due amminoacidi tiolici chiave nella dieta, molto sensibili alla modificazione ossidativa a causa del carattere nucleofilo dei gruppi tiolico e tioetere, rispettivamente, che contengono; sono in grado di metabolizzare il più potente antiossidante endogeno: il glutatione (GSH) (Demirci-Çekiç et al., 2022b; McLeay et al., 2017).

Livelli adeguati di GSH sono fondamentali per mantenere l'equilibrio redox nei tessuti corporei, con il rapporto tra glutatione ridotto e ossidato (GSH/GSSG) rappresentante un indicatore primario dello stato redox e monitorabile spettrofotometricamente (Demirci-Çekiç et al., 2022b; McLeay et al., 2017). Un rapporto elevato di GSH su GSSG suggerisce un ambiente riduttivo in cui i livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono mantenuti a livelli omeostatici, mentre un basso rapporto GSH su GSSG è indicativo di stress ossidativo. È la cisteina che conferisce al GSH la sua attività antiossidante; poiché

la cisteina è anche un fattore limitante per la sua formazione, la cisteina dietetica, o il suo precursore aminoacido metionina, è fondamentale per mantenere la difesa antiossidante endogena. Oltre al GSH, i tioli dietetici hanno la capacità di aumentare i livelli di taurina, un ulteriore antiossidante tiolico, tramite la via dell'acido cisteinsulfonico (McLeay et al., 2017). L'albumina costituisce il più grande serbatoio di tioli nella circolazione, grazie a un residuo di cisteina ridotta (Cys34), la molecola perde però parte delle sue proprietà antiossidanti una volta esposta agli ossidanti (Bordignon et al., 2014).

Una buona gestione dell'animale e la supplementazione di antiossidanti possono avere un ruolo nel mantenere un alto livello di tioli circolanti anche in presenza di condizioni infiammatorie subcliniche: la supplementazione di antiossidanti negli atleti umani, ad esempio, può contrastare l'esaurimento degli antiossidanti endogeni (McLeay et al., 2017).

### 3.3 CARBONILI

Il biomarcatore più frequentemente utilizzato per l'ossidazione delle proteine è il test per i carbonili, che misura i gruppi carbonilici delle proteine. La carbonilazione delle proteine è una trasformazione irreversibile, avviene quando le specie reattive dell'ossigeno (ROS) attaccano le catene laterali degli aminoacidi come prolina, arginina, lisina e treonina in presenza di metalli di transizione ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{+}$ , ecc.) provocando un cambiamento nella struttura della catena peptidica e quindi la perdita dell'attività funzionale delle proteine (Demirci-Çekiç et al., 2022b). Questo processo può essere definito come "carbonilazione proteica primaria" e si riferisce alla formazione di chetoni o aldeidi reattivi che possono reagire con il 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH), che consente la determinazione dei gruppi carbonilici totali delle proteine. In alternativa, composti carbonilici reattivi, come carboidrati e lipidi con gruppi carbonilici reattivi prodotti durante la glicossidazione e la lipoperossidazione, possono legarsi alle catene laterali degli aminoacidi (principalmente sui residui di lisina, cisteina e istidina) generando la cosiddetta "carbonilazione proteica secondaria" (Celi & Gabai, 2015; Zachut et al., 2020).

I derivati carbonilici sono frequentemente utilizzati come biomarcatori nel danno ossidativo delle proteine e possono formarsi principalmente in quattro modi diversi. Il primo di questi è l'ossidazione diretta dei residui di prolina, arginina, lisina e treonina nelle catene laterali delle proteine da parte del radicale idrossile ( $HO^{\bullet}$ ) generato dalla

reazione di Fenton tra cationi metallici e perossido di idrogeno o da radiazioni ionizzanti. Come risultato di questo meccanismo, si formano vari composti carbonilici come la semialdeide glutammica e la semialdeide amminoadipica, derivati rispettivamente dall'ossidazione dell'arginina e della lisina. L'ossidazione tramite la via dell' $\alpha$ -amidazione porta alla formazione di composti derivati dall'idrolisi dello scheletro proteico da parte del radicale idrossilico. Il terzo meccanismo forma derivati carbonilici tramite la "reazione di "addizione di Michael" ai residui di cisteina, istidina e lisina delle aldeidi come il 4-idrossinonenale (4-HNE), il 2-propenale (acroleina) e la malondialdeide, i quali sono prodotti di ossidazione secondari dei lipidi. I prodotti formati da una serie di reazioni tra residui di lisina e gruppi carbonilici dei carboidrati, chiamati prodotti finali di glicoossidazione avanzata, sono ulteriori specie carboniliche come la carbossimetil-lisina (Colombo et al., 2016; Demirci-Çekiç et al., 2022).

In generale, l'accumulo di proteine ossidate dipende dalla velocità della loro eliminazione; la degradazione di queste è influenzata dall'attività di proteasi specifiche e dall'essenza della loro modifica chimica. Le proteine leggermente ossidate sono più inclini alla degradazione, mentre le proteine estremamente ossidate (cioè carbonilate) possono formare legami ed aggregati, che sono poveri substrati per la proteolisi. Queste molecole sono quindi chimicamente stabili, dimostrandosi facilmente conservabili e rilevabili tramite diversi test disponibili (Celi & Gabai, 2015).

### 3.4 MDA

Come risultato della perossidazione lipidica, gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) possono formare varie aldeidi a catena corta ovvero metaboliti secondari della perossidazione lipidica, i principali sono il 4-idrossinonenale (4-HNE) e la malondialdeide (MDA) che sono i membri più ben descritti e studiati di questa classe (Demirci-Çekiç et al., 2022b; Gaschler & Stockwell, 2017).

Oltre alla perossidazione enzimatica e dei radicali liberi dei PUFA contenenti almeno tre doppi legami, l'MDA si forma anche durante la sintesi delle prostaglandine. La MDA è frequentemente utilizzata come marcatore della perossidazione lipidica reagendo con i residui di lisina (Lys) delle proteine per formare addotti con proteine e DNA. I prodotti della perossidazione lipidica come il 4-HNE e la MDA possono essere trovati in forma libera nel metabolismo; possono anche essere legati covalentemente a varie molecole

come proteine e acidi nucleici a causa della loro alta reattività. È stato affermato che la formazione di questi prodotti è associata all'infiammazione, all'apoptosi e a varie malattie come il diabete mellito e le malattie neurodegenerative. L'acroleina, uno dei prodotti altamente reattivi dell'ossidazione catalizzata da metalli dei PUFA, può anche indurre danni neuronali formando prodotti di addizione con le proteine (Demirci-Çekiç et al., 2022). L'MDA è stata quindi associata a diverse malattie, ma non è ancora chiaro se sia una molecola attiva nei meccanismi patologici o se sia semplicemente rilevabile come conseguenza di questi processi (Falomo et al., 2020; Gaschler & Stockwell, 2017).

Il test delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS) è probabilmente il metodo più comune e più criticato per determinare l'ossidazione lipidica. Uno dei prodotti finali dell'ossidazione lipidica è la malondialdeide (MDA). Il metodo si basa sulla misurazione dell'assorbanza ottica del composto cromogenico costituito dall'addotto tra la MDA e l'acido tiobarbiturico (TBA) in un rapporto stechiometrico di 1:2 ( $\text{MDA}-(\text{TBA})_2$ ) a 532 nm spettrofotometricamente o a 553 nm fluorimetricamente (Demirci-Çekiç et al., 2022b).

La malondialdeide (MDA) è quindi un biomarcatore ampiamente utilizzato per segnalare la perossidazione lipidica e può riflettere lo stress ossidativo dell'animale. In uno studio compiuto su latte di bovina nel periodo postpartum, la concentrazione di MDA è risultata essere più alta nelle prime fasi della lattazione per poi decrescere esponenzialmente, ed è stata inversamente correlata ai giorni di lattazione. Questo suggerisce che la MDA nel latte può essere utilizzato come biomarcatore dello stress ossidativo nel latte. Tuttavia, è stato dimostrato che la MDA è un biomarcatore incoerente e variabile (Zachut et al., 2020).

Il principale svantaggio del metodo TBARS è che, soprattutto in matrici complesse, l'acido tiobarbiturico può reagire con composti non direttamente correlati all'ossidazione lipidica, causando risultati errati. (Demirci-Çekiç et al., 2022)

### 3.5 GLUCOSIO E LATTATI

Il glucosio e i lattati svolgono ruoli cruciali nel metabolismo cellulare e sono strettamente correlati allo stress ossidativo. Il glucosio è una fonte di energia fondamentale per tutte le cellule, essendo il principale substrato della glicolisi, un processo metabolico che produce ATP, necessario per le funzioni cellulari. Durante la glicolisi, una molecola di glucosio

viene convertita in due molecole di piruvato, generando ATP e NADH, che sono essenziali per la produzione di energia e il mantenimento dell'equilibrio redox cellulare (Tu et al., 2021).

Il piruvato entra nel ciclo di Krebs generando acqua, anidride carbonica e 36 molecole di adenosina trifosfato (ATP) per ogni molecola di glucosio (Ye et al., 2022), se invece la lattato deidrogenasi (LDH) riduce piruvato a lattato si formano due molecole di ATP (Tu et al., 2021).

I lattati, derivati dalla riduzione del piruvato catalizzata dall'enzima lattato deidrogenasi (LDH), svolgono un ruolo cruciale sia come intermedi metabolici sia come indicatori dello stato metabolico della cellula. In condizioni di ipossia o di elevata domanda energetica, come durante l'attività muscolare intensa o la proliferazione cellulare rapida, il piruvato viene convertito in lattato per rigenerare il NAD<sup>+</sup>, necessario per sostenere la glicolisi e, quindi, la produzione continua di ATP (Ye et al., 2022). Il lattato non è solo un sottoprodotto metabolico, ma può anche servire come fonte di energia alternativa in vari tessuti, inclusi i muscoli ed il cervello. Inoltre, il lattato può essere riciclato nel fegato attraverso la gluconeogenesi, contribuendo al mantenimento dei livelli di glucosio nel sangue (Haas et al., 2016).

La correlazione tra glucosio, lattati e stress ossidativo è significativa; l'eccessiva produzione di lattato può portare a uno stato di stress ossidativo, poiché il metabolismo glicolitico predominante riduce la capacità delle cellule di utilizzare vie ossidative più efficienti, come la fosforilazione ossidativa, è meno incline a generare specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Haas et al., 2016). Quando il glucosio viene metabolizzato in modo prevalente attraverso la glicolisi, il tasso di produzione di ROS può aumentare, contribuendo al danno ossidativo. (Ye et al., 2022).

Il glucosio ed i lattati sono essenziali per il metabolismo energetico delle cellule, la loro gestione alterata può quindi contribuire significativamente allo stress ossidativo. Questo è particolarmente evidente in condizioni patologiche come il cancro, dove il metabolismo cellulare anomalo (effetto Warburg) porta ad un aumento dei livelli di lattato e ROS, aggravando lo stress ossidativo e promuovendo la progressione della malattia (Tu et al., 2021; Ye et al., 2022)

## 4. EVENTI STRESSANTI NEL POST PARTUM

Lo stress ossidativo nella cavalla è una condizione complessa che può essere scatenata da vari eventi stressanti, come il parto, l'involuzione uterina post-parto, l'allattamento, la ripresa dell'attività ciclica, o l'errata gestione dell'animale. Questi eventi possono aumentare la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che superano la capacità antiossidante dell'organismo, causando danni cellulari e compromettendo la salute generale della cavalla e la produzione di latte.

### 4.1 PERIPARTO

Il parto è un evento fisiologicamente stressante per la cavalla, comportando un notevole dispendio energetico ed una serie di cambiamenti metabolici che possono generare uno squilibrio redox nell'organismo. Pochi studi sono stati svolti riguardo i parametri di stress ossidativo nelle cavalle durante il periparto ma è stato dimostrato uno sbilancio nell'equilibrio fisiologico ossidoriduttivo nell'uomo e in altre specie come le bovine da latte (Bernabucci et al., 2005; Cecchini et al., 2019).

Durante il periparto, infatti, si verifica un significativo aumento dello stress ossidativo, come evidenziato dall'incremento del Total Oxidant Status (TOS) e dei livelli di radicali nitrici (NOx), indicatori di un potenziale redox alterato. Questi parametri raggiungono i loro picchi intorno al momento del parto e nella prima settimana post-parto, periodo durante il quale l'organismo della cavalla sembra subire un temporaneo squilibrio del bilancio ossidativo. Nonostante ciò, studi recenti hanno dimostrato che questo squilibrio non porta necessariamente a danni ossidativi a lungo termine su lipidi e proteine, probabilmente grazie alla capacità del sistema antiossidante della cavalla di rispondere adeguatamente a tali sollecitazioni (Cecchini et al., 2019).

Il periodo periparturiente è caratterizzato da un aumento delle richieste metaboliche legate allo sviluppo fetale e alla successiva lattazione, il che intensifica ulteriormente la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Queste ROS possono provocare danni cellulari se non adeguatamente neutralizzate da meccanismi antiossidanti interni. In questo contesto, l'integrazione con antiossidanti esogeni ha dimostrato di avere un ruolo protettivo. In particolare, la supplementazione con alte dosi di  $\alpha$ -tocoferolo, una forma di vitamina E, è stata associata a una maggiore capacità antiossidante del plasma, che contribuisce a mitigare gli effetti dello stress ossidativo durante il parto e il post-parto.

Questo effetto è particolarmente evidente nelle cavalle più anziane, che mostrano livelli più elevati di capacità antiossidante del plasma nel periodo post-parto, suggerendo una possibile relazione tra età, stato redox e gestione del parto (Martuzzi et al., 2019).

Il dolore durante il parto è una delle componenti che possono contribuire all'aumento dello stress ossidativo: in generale, il dolore acuto è noto per innescare una risposta infiammatoria e la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS); questo meccanismo è ben documentato in diversi contesti clinici, sia in animali che in esseri umani. Alcuni studi condotti su animali da laboratorio e umani hanno mostrato che il dolore acuto, inclusi quello associato a interventi chirurgici o traumi, è correlato a un aumento dei livelli di ROS e, di conseguenza, a stress ossidativo, nonostante la complessità di questa relazione richieda ulteriori indagini specifiche. Per quanto riguarda le cavalle, la ricerca disponibile si concentra maggiormente sullo stress ossidativo indotto da fattori metabolici e infiammatori legati alla gravidanza e al parto, piuttosto che sull'impatto diretto del dolore. Considerato che il dolore acuto può indurre stress ossidativo in altri mammiferi, è plausibile che un meccanismo simile possa esistere anche nelle cavalle durante il parto (Yuba et al., 2024).

## 4.2 OXINFLAMMATION

Il termine "oxinflammation" descrive una condizione patologica caratterizzata da un'interazione continua tra stress ossidativo e infiammazione. Questo processo inizia quando un'inflammation non viene risolta in modo efficiente, portando a una produzione costante di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Le ROS alimentano ulteriormente l'inflammation, creando un circolo vizioso che porta ad un ambiente pro-ossidante cronico che provoca danni cellulari e compromette l'omeostasi dell'organismo (Falomo et al., 2020b; Valacchi et al., 2018).

Questo meccanismo è particolarmente critico negli animali da allevamento, dove l'oxinflammation può compromettere la funzione immunitaria e ridurre la capacità riproduttiva. Per esempio, nelle bovine da latte, l'oxinflammation è spesso correlata a un bilancio energetico negativo durante il post-partum, che non solo peggiora la produzione di latte ma può anche prolungare l'anoressia postpartum e ridurre i tassi di concepimento (Fernandez-Novo et al., 2020).



Lo stato di oxinflammation oltre a provocare danni cellulari e tissutali può anche contribuire allo sviluppo di varie patologie croniche. In alcuni studi sull'uomo è stato osservato che l'oxinflammation sia correlata a malattie metaboliche come il diabete di tipo II, malattie cardiovascolari, obesità, e anche in patologie neurodegenerative come l'Alzheimer e la sindrome di Rett. In queste condizioni, l'infiammazione e lo stress ossidativo non si limitano a influenzare un singolo organo o tessuto, ma possono avere effetti sistemici compromettendo la capacità dell'organismo di mantenere l'omeostasi redox causando quindi un danno a lungo termine (Valacchi et al., 2018).

Nella cavalla, l'oxinflammation è stata osservata durante il processo di involuzione uterina post-parto, specialmente quando questa involuzione è ritardata o compromessa. Per monitorare il grado di stress ossidativo associato a questa condizione sono stati utilizzati *biomarkers* come malondialdeide (MDA) e Advanced Oxidation Protein Products (AOPP): un aumento dei livelli di questi biomarcatori è stato rilevato in cavalle con segni di involuzione uterina ritardata, suggerendo una correlazione tra l'infiammazione uterina persistente e stress ossidativo (Falomo et al., 2020). Questo stato di oxinflammation può avere effetti significativi sulla salute riproduttiva della cavalla, influenzando negativamente la fertilità e predisponendo l'animale a ulteriori complicazioni, come l'endometrite (Falomo et al., 2020). La gestione efficace dell'oxinflammation richiede un approccio integrato, che includa l'ottimizzazione della nutrizione per prevenire il bilancio energetico negativo, l'uso di integratori antiossidanti, una gestione adeguata della salute riproduttiva e strategie di gestione dello stress che riducano l'esposizione degli animali a fonti di natura ambientale e sociale stressante (Falomo et al., 2020; Fernandez-Novo et al., 2020; Valacchi et al., 2018).

### 4.3 INVOLUZIONE UTERINA

L'involuzione uterina è un processo fisiologico che combina la riduzione delle dimensioni dell'utero, la rimozione dei residui fetali relativi alla gravidanza e l'alterazione della superficie endometriale per creare un ambiente ospitale per un nuovo concepimento. Nella cavalla l'involuzione uterina avviene in modo rapido: viene completata in circa 7 giorni a livello funzionale ed entro 14 giorni post-parto a livello istologico. Eventi come natimortalità, distocia e placentite possono ritardare l'involuzione a causa del danno alla

placenta, che interrompe la normale separazione placentare e porta alla ritenzione di residui fetali (McKinnon A. et al., 2010).

La presenza di un lieve grado di infiammazione durante l'involutione uterina è considerata fisiologica, poiché l'endometrio reagisce contro i microrganismi invasivi ed il processo infiammatorio è importante per pulire l'endometrio dai detriti tissutali e dai microrganismi introdotti durante il parto (Jischa et al., 2008).

Il processo di involuzione uterina inizia con una drastica diminuzione del diametro dei corni uterini durante la prima settimana post-parto; un maggior diametro del corno uterino gravido è stato correlato ad un'involutione uterina ritardata, all'accumulo di fluido intra-uterino e a edema endometriale. Queste risposte sono associate ad un lieve grado di infiammazione sistemica combinata con stress ossidativo (Jischa et al., 2008).

Uno studio ha dimostrato che una lieve condizione di infiammazione e stress ossidativo si verificano nelle cavalle con segni di involuzione uterina ritardata o compromessa. La risposta infiammatoria dovrebbe corrispondere all'intensità dell'insulto e terminare non appena l'infezione è stata controllata. Se la reazione infiammatoria non viene interrotta, possono verificarsi risposte eccessive, che potrebbero portare ad uno stato di "oxinflammation" (Falomo et al., 2020).

Altri studi compiuti su bovine da latte hanno dimostrato gli effetti benefici della supplementazione alimentare di  $\beta$ -carotene sulla fertilità migliorando i tassi di concepimento, l'involutione uterina, l'ovulazione e una riducendo l'incidenza di ovaie cistiche e morte embrionale precoce (Talukder et al., 2017).

Uno studio attuale ha provato che la supplementazione dietetica con microalghe ricche di acido docosaesaenoico (DHA) ha portato ad un diametro inferiore del corno uterino gravido, riducendo così lo sforzo necessario per il processo di involuzione prima del ciclo e dell'ovulazione successivi ed una diminuzione del fluido intrauterino, suggerendo che la supplementazione con DHA potrebbe ridurre l'infiammazione endometriale post-partum. Oltre al DHA anche l'uso di acidi grassi polinsaturi della famiglia omega-3 nelle diete delle cavalle durante il periodo del periparto potrebbe favorire l'involutione uterina ed un miglior tasso riproduttivo al primo calore; tuttavia, è necessario condurre ulteriori studi per valutare i risultati a fine gravidanza (Jischa et al., 2008).

Mantenere quindi sotto controllo il processo di involuzione uterina è fondamentale per prevenire l'insorgenza di stress ossidativo cronico ed infiammazione sistemica nella

cavalla postpartum. Una gestione adeguata di questo processo non solo favorisce la ripresa della fertilità, ma riduce anche il rischio di complicazioni associate all'infiammazione, migliorando così la salute generale dell'animale e le sue possibilità di concepimento futuro.

#### 4.4 FOAL HEAT

Il "calore del puledro" (foal heat) è il primo ciclo estrale che si verifica nelle cavalle entro pochi giorni dal parto, solitamente tra il settimo ed il nono giorno postpartum. Questo periodo è caratterizzato da un'ovulazione precoce e da una rapida ripresa dell'attività riproduttiva, il che può essere vantaggioso per mantenere un intervallo di "foaling" regolare tuttavia questo primo calore risulta avere un più basso tasso di concezione (AboEl-Maaty et al., 2012; Falomo et al., 2020). Durante calore del puledro, le cavalle sono soggette ad un aumento dello stress ossidativo (AboEl-Maaty et al., 2012; Martuzzi et al., 2019), dovuto ai cambiamenti fisiologici intensi che accompagnano il parto e la ripresa della funzione ovarica, che aumentano la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (AboEl-Maaty et al., 2012).

Durante il foal heat, i livelli di alcuni antiossidanti come il glutatione (GSH) e l'acido ascorbico (vitamina C) tendono a diminuire, mentre i marcatori di stress ossidativo, come il malondialdeide (MDA), aumentano, soprattutto nell'ottavo e nono giorno postpartum. Questo squilibrio tra ossidanti e antiossidanti può compromettere la capacità della cavalla di concepire se non viene adeguatamente gestito (AboEl-Maaty et al., 2012).

Per ridurre lo stress ossidativo durante il foal heat, è consigliabile integrare la dieta delle cavalle con antiossidanti come l'acido ascorbico e lo zinco. Questi nutrienti possono migliorare l'immunità e aiutare a bilanciare il rapporto tra ossidanti e antiossidanti, favorendo così la salute riproduttiva e aumentando le probabilità di concepimento durante questo periodo critico (AboEl-Maaty et al., 2012).

Nello specifico la vitamina C è un potente antiossidante che neutralizza direttamente le specie reattive dell'ossigeno (ROS), protegge le cellule donando elettroni ai radicali liberi, prevenendo così il danno ossidativo inoltre contribuisce alla rigenerazione di altri antiossidanti, come la vitamina E, migliorando l'efficacia complessiva del sistema antiossidante dell'organismo (Agwu et al., 2024; Didier et al., 2023).

Lo zinco agisce come cofattore per numerosi enzimi antiossidanti, tra cui la superossido dismutasi (SOD), che è fondamentale per neutralizzare i radicali superossido. Questo minerale stabilizza le membrane cellulari e inibisce l'enzima NADPH ossidasi, riducendo la produzione di ROS, inoltre, lo zinco stimola la sintesi di metallotioneine, proteine che sequestrano i radicali liberi, riducendo così il danno ossidativo nelle cellule (Marreiro et al., 2017; Olechnowicz et al., 2018).

#### 4.5 TEMPERATURA

Le temperature ambientali elevate possono causare “heat stress” negli animali ovvero una condizione in cui la temperatura corporea dell'animale aumenta a causa di un'eccessiva esposizione al calore ambientale, superando la capacità dell'animale di dissipare il calore in modo efficiente (Krishnan et al., 2017). Questo stress termico induce una serie di cambiamenti metabolici significativi per cercare di ridurre la produzione interna di calore (Koch et al., 2016).

Esistono informazioni consolidate riguardo allo stress ossidativo indotto da temperature elevate nel cavallo, specialmente nel contesto dell'esercizio fisico. Studi hanno dimostrato che l'esposizione a condizioni di calore eccessivo durante l'esercizio può aumentare significativamente la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), portando a stress ossidativo, con potenziali effetti negativi sulla salute muscolare e generale del cavallo (Kang et al., 2023; Mills et al., 1996). Tuttavia, non esistono ancora studi specifici che esaminino lo stress ossidativo causato da temperature elevate durante la lattazione nelle cavalle. Le informazioni disponibili si concentrano nel contesto dell'“heat stress” nella bovina da latte: questi studi mostrano come il calore eccessivo possa causare una diminuita produzione di latte ed un'alterata composizione indicando potenziali conseguenze simili nelle cavalle, sono però necessari ulteriori studi per confermare questa relazione.

L'heat stress si verifica nelle bovine esposte a temperature ambientali maggiori di 25°C combinate ad elevata umidità ovvero con indice di temperatura-umidità (THI) superiore a 68, considerato soglia critica oltre il quale si verificano effetti negativi sulla salute dell'animale e sulla produzione di latte (Michael et al., 2023).

Si osserva quindi una riduzione dell'assunzione di cibo, data però la necessità di mantenere la produzione di latte, l'animale si trova in uno squilibrio energetico. I

meccanismi compensatori messi in atto includono il maggior utilizzo del glucosio e degli amminoacidi per la gluconeogenesi, un processo che avviene prevalentemente nel fegato, utilizzando precursori come lattato e alanina. Questo meccanismo può aumentare la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), contribuendo ad un aumento di stress ossidativo nell'organismo (Koch et al., 2016; Krishnan et al., 2017).

La produzione di latte subisce modifiche sia in quantità che in composizione durante lo stress da calore: la quantità di latte prodotta tende a diminuire, mentre la composizione del latte può essere alterata, con possibili riduzioni delle componenti proteiche e del grasso (Koch et al., 2016; Krishnan et al., 2017). Queste alterazioni sono dovute a un cambiamento nel metabolismo energetico, dove il corpo dell'animale cerca di limitare la produzione di calore interno aumentando l'utilizzo di glucosio e riducendo l'ossidazione degli acidi grassi (Koch et al., 2016).

Uno studio su bovine di razza modicana ovvero una razza rustica a bassa produzione di latte, ha dimostrato come la quantità di latte prodotta da queste vacche non sia differita notevolmente nei mesi tra aprile e luglio, mesi caratterizzati da elevate temperature. Dati alcuni studi che dimostrano come lo stress da calore riduca la produzione di latte, questa razza si discosta dai precedenti risultati poiché essendo una razza meno produttiva riesce ad affrontare più facilmente un possibile "heat stress" in quanto produce minor calore metabolico dovendo richiedere minor energia per la produzione di latte. La composizione del latte è invece risultata modificata registrando un minor contenuto di grasso all'aumentare del THI, correlato probabilmente alla minor ingestione di sostanza secca. La concentrazione di lattosio e proteine non è stata influenzata dai diversi livelli di THI (Michael et al., 2023).

Per prevenire o mitigare gli effetti dello stress da calore, è essenziale adottare misure gestionali, come fornire ombra e sistemi di raffreddamento, oltre a mantenere un'adeguata idratazione. Sul piano nutrizionale, l'integrazione con antiossidanti può essere utile per ridurre lo stress ossidativo. L'acido ascorbico e il glutatione, ad esempio, sono antiossidanti che possono aiutare a neutralizzare i ROS, riducendo così il danno cellulare associato allo stress ossidativo (Koch et al., 2016). Risultano di fondamentale importanza anche la somministrazione di selenio e Vitamina E migliorando così la resistenza degli animali allo stress da calore e mantenendo la produzione di latte a livelli ottimali (Krishnan et al., 2017).

#### 4.6 MASTITE

La mastite è un'infezione del tessuto parenchimoso della ghiandola mammaria, viene considerata una delle principali cause di diminuzione della produzione lattifera, cambiamento della composizione del latte e compromissione della salute della mammella. Viene descritta come una alterazione tissutale che porta a un progressivo deterioramento dell'apparato secretorio con una diminuzione della produzione di latte sia nelle forme cliniche che subcliniche di mastite (Azam et al., 2021).

La mastite nella cavalla può manifestarsi in due forme principali: clinica e subclinica. La mastite clinica si caratterizza per la presenza di sintomi evidenti di infiammazione nella ghiandola mammaria, come dolore, gonfiore, calore e secrezioni anomale. Questi sintomi possono essere accompagnati da un aumento significativo della conta delle cellule somatiche (SCC) con valori maggiori di 50.000 cellule/ml di latte, che riflette un'infiltrazione di cellule immunitarie come neutrofili, macrofagi e linfociti nella ghiandola mammaria. La mastite subclinica, invece, è una condizione in cui non sono presenti sintomi clinici evidenti, ma si possono comunque osservare alterazioni nei parametri del latte, come un aumento della SCC e della conduttività elettrica del latte (ECM), che indicano la presenza di un'infezione latente (Domańska et al., 2022).

La causa più comune di mastite acuta è l'infezione batterica proveniente dalle seguenti specie: *Streptococcus zooepidemicus*, *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Actinobacillus*, *E. coli*, *Pasteurella ureae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* (Canisso et al., 2021; Domańska et al., 2022). I batteri entrano nella ghiandola mammaria attraverso l'apertura del capezzolo e poi risalgono il canale fino al tessuto mammario (Canisso et al., 2021; McKinnon A. et al., 2010).

L'insorgenza della mastite si verifica tipicamente entro i primi 2-3 giorni dopo il parto soprattutto se il puledro non si nutre correttamente dalla madre, causando un riempimento eccessivo della cisterna mammaria e allo stesso modo nelle prime 4-8 settimane dopo lo svezzamento di un puledro, a causa dell'accumulo continuo di latte nella ghiandola mammaria una volta che il puledro smette di nutrirsi (Canisso et al., 2021; McKinnon A. et al., 2010).

Il meccanismo che provoca stress ossidativo nella mastite è strettamente legato alla risposta infiammatoria del sistema immunitario all'infezione della ghiandola mammaria. Quando i patogeni invadono la ghiandola, il sistema immunitario risponde con

l'infiltrazione di leucociti, in particolare neutrofili, che rilasciano specie reattive dell'ossigeno (ROS) per eliminare i microrganismi invasori. Tuttavia, la produzione eccessiva di ROS può superare la capacità antiossidante della cellula, portando a danni ossidativi a proteine, lipidi e DNA nelle cellule della ghiandola mammaria (Halliwell, 1996; Turk et al., 2012). Oltre ai ROS, l'infiammazione attiva l'ossido nitrico (NO) che può reagire con il superossido per formare perossinitrito, un radicale altamente reattivo che contribuisce ulteriormente al danno ossidativo (Novac et al., 2022). Inoltre, la risposta infiammatoria coinvolge la produzione di citochine pro-infiammatorie, come l'interleuchina-1 (IL-1) e il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- $\alpha$ ), che non solo amplificano la risposta infiammatoria ma aumentano anche la produzione di ROS, esacerbando così lo stress ossidativo (Khan et al., 2022). Questo processo si complica ulteriormente con la perossidazione lipidica, che danneggia le membrane cellulari e peggiora lo stress ossidativo, come evidenziato dall'aumento dei livelli di perossidi lipidici (LPO) nei campioni di latte infetti in uno studio su capre con mastite subclinica di (Novac et al., 2022). Il danno ossidativo al DNA, misurabile attraverso marcatori come l'8-OHdG, rappresenta un'altra conseguenza del processo infiammatorio (Novac et al., 2022). In questo contesto, lo stress ossidativo e l'infiammazione si alimentano reciprocamente, aggravando il danno tissutale e compromettendo la funzionalità della ghiandola mammaria (Khan et al., 2022).

In uno studio su bovine con mastite clinica e subclinica, è stato osservato un cambiamento significativo nell'attività degli enzimi antiossidanti/antinfiammatori come la paraoxonasi-1 (PON1) e la fosfolipasi A2 (PAF-AH), nonché nei livelli della proteina della fase acuta amiloide A sierica (SAA). Questi enzimi e proteine sono stati misurati per valutare la risposta infiammatoria e lo stress ossidativo. L'attività della PON1, enzima antiossidante importante per neutralizzare radicali liberi, è risultata significativamente ridotta rispetto ai controlli sani, suggerendo un aumento dello stress ossidativo. Anche l'attività di PAF-AH e della proteina SAA sono risultate significativamente ridotte nelle vacche con mastite clinica, ma non in quelle con mastite subclinica, suggerendo un coinvolgimento differenziale dello stress ossidativo in queste due forme della malattia. Questi parametri hanno indicato una compromissione dello stato antiossidante e una risposta infiammatoria accentuata durante la mastite, correlando quindi la malattia allo stress ossidativo (Turk et al., 2012).

Bovine con mastite presentano una riduzione dei livelli di vitamina C nel latte e nel plasma. La vitamina C neutralizza le specie reattive dell'ossigeno attraverso un rapido trasferimento di elettroni e inibendo la perossidazione lipidica, dimostrando così un'importante difesa antiossidante contro il danno ossidativo (Tufarelli et al., 2023).

Uno studio effettuato su bovine con mastite da (Khan et al., 2022) suggerisce che per mitigare gli effetti dello stress ossidativo e migliorare la risposta infiammatoria, è buona prassi somministrare agli animali un'integrazione di antiossidanti come il selenio, la vitamina E e l'acido folico. Questi nutrienti migliorano l'attività degli enzimi antiossidanti come la glutatione perossidasi (GSH-Px) e riducono la concentrazione di malondialdeide (MDA). Inoltre, il selenio e la vitamina E hanno dimostrato di ridurre i livelli di citochine pro-infiammatorie come IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , e di inibire le vie di segnalazione NF- $\kappa$ B e MAPK, che sono coinvolte nella progressione della mastite.



## 5. MATERIALI E METODI

### 5.1 RACCOLTA DEI CAMPIONI

I campioni dello studio sono stati raccolti da 12 fattrici, durante la stagione riproduttiva 2022, una volta a settimana per 8 settimane. I prelievi sono stati effettuati presso la Scuderia Gardesana (S.R.L.) a Sant'Angelo di Piove di Sacco PD; il latte è stato prelevato a mano da ciascuna fattrice e raccolto in una provetta Falcon da 50 ml, successivamente congelato a -18°C e stoccato presso cella frigo del campus di Agripolis. Il primo campione per ogni cavalla è stato raccolto dopo 3 giorni dalla nascita del puledro per escludere il colostro dal prelievo.

Tutti gli animali coinvolti nello studio erano clinicamente sani al momento del prelievo, ogni prelievo di latte è stato preceduto da una visita clinica generale e specifica della mammella per confermare l'assenza di patologie quali mastiti. Le fattrici in questione sono state fecondate nel primo calore post-parto tra 8 e 16 giorni dopo la nascita dei puledri tramite inseminazione artificiale.

Tutte le analisi sono state effettuate presso il laboratorio di Fisiologia del Dipartimento BCA dell'Università Degli Studi di Padova con sede al campus di Agripolis.

Parametri valutati:

- Proteine totali
- AOPP
- Tioli
- Carbonili
- Glucosio e lattati
- MDA

Protocollo utilizzato

Il latte è stato inizialmente centrifugato a 1500 giri per 15 minuti a 4°C, successivamente è stato rimosso il grasso in sospensione. È stato ottenuto il prodotto skim milk, trasferito poi in provette Eppendorf da 5 ml ed ultracentrifugato a 25000 rpm per 30 minuti a 4°C sottovuoto fino a 750 mmHg (Beckman Coulter® Optima L 90K, rotore basculante 55Ti).

Il surnatante (siero di latte o whey protein) è stato diviso in 2 aliquote da 2 ml ciascuna e congelato. Successivamente a partire dai campioni ricavati sono state eseguite le analisi del caso.

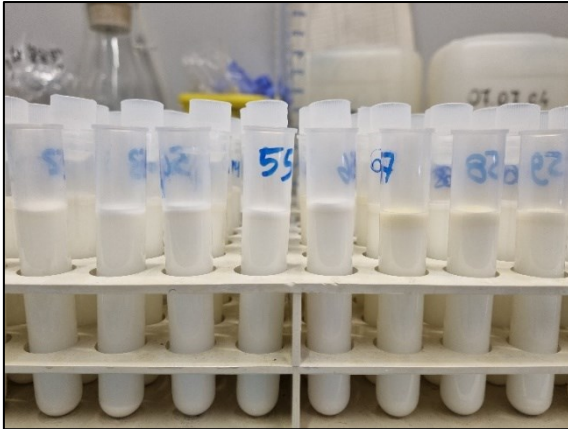


Foto 5.1.1 Latte dopo il processo di centrifugazione



Foto 5.1.2 Portaprovette dell'ultracentrifuga Beckman Coulter Optima L 90K



Foto 5.1.3 Suddivisione del siero di latte in due aliquote

## 5.2 DOSAGGIO DI GLUCOSIO E LATTATI

Il dosaggio del glucosio e lattato è stato eseguito tramite l'utilizzo di un kit diagnostico della Biosen C-Line (Glucose and Lactate analyzer – EKF Diagnostics). Prima dell'analisi dei campioni lo strumento è stato calibrato e tarato con soluzioni standard fornite dal kit (Multi standard solution 12 mmol/L glucosio 216,2 mg/dl; lattato 108,1 mg/dl e Sensor test solution). 20 µl di skim milk sono stati addizionati in eppendorf fornite dal kit con 1 ml Glucose/Lactate hemolysing solution. Sono state analizzate fino a 20 provette per ciclo negli appositi spazi. L'analizzatore ha poi riportato i risultati sul display.



Foto 5.2.1 Biosen C-Line Glucose and Lactate analyzer – EKF Diagnostics

## 5.3 DOSAGGIO DELLE PROTEINE TOTALI CON METODO BCA

Le proteine totali sono state analizzate utilizzando il kit diagnostico BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology 3747 N. Meridian Road, PO Box 117 Rockford, IL 61105 USA). che prevede la costruzione di una curva di taratura con Albumina Bovina (2 mg/ml) diluita in modo seriale 1:2 con PBS 10mM. La reazione colorimetrica è avvenuta dopo l'aggiunta delle soluzioni di reazione fornite dal kit (R2 + R1, 1:50)

1:50	R1	R2
1 piastra	20 ml	400 µl
½ piastra	10 ml	200 µl

16 well	3.5 ml	70 $\mu$ l
---------	--------	------------

Tabella 5.3.1 Illustrazione dei volumi e concentrazioni finali

Soluzione di calibrazione	Volume di diluente ( $\mu$ l)	Volume di BSA ( $\mu$ l)	Concentrazione finale ( $\mu$ g/ml)
A	0	300 di soluzione A	2000
B	150	150 di soluzione A	1000
C	150	150 di soluzione B	500
D	150	150 di soluzione C	250
E	150	150 di soluzione D	125
F	200	50 di soluzione E	25
G	300	0	0 = blank

Tabella 5.3.2 Diluizioni seriali preparate

Il dosaggio è stato eseguito su una piastra da 96 pozzetti (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA).

Sono stati caricati nella piastra: 25  $\mu$ l di standard e 25  $\mu$ l di campione (diluito a seconda del *range* di concentrazione stimato) 1/10 whey protein e 1/25 skim milk. Sono stati aggiunti poi 200  $\mu$ l di reagente. La piastra è stata agitata e mantenuta a 37°C per 30 minuti. I risultati sono stati riportati dal lettore di micropiastre (VICTOR X100, Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton,CT,USA) a 570 nm.

La concentrazione proteica è stata calcolata utilizzando l'equazione della retta di taratura e moltiplicando per il coefficiente di diluizione.

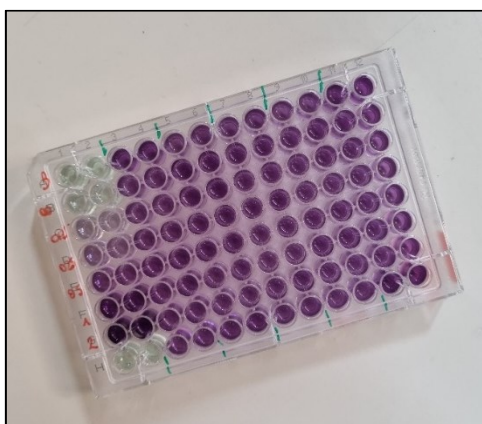


Foto 5.3.3 Dosaggio delle proteine totali con metodo BCA

#### 5.4 DOSAGGIO DELLE AOPP

Le AOPP sono misurate utilizzando il metodo spettrofotometrico di Witko-Sarsat (Witko-Sarsat et al. 1998), (Witko-Sarsat et al. 1996) su lettore di micropiastre (VICTOR X100, Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton,CT,USA) e calcolate mediante una curva di calibrazione con chloramina-T (N-cloro-p-toluensulfonamide sale di sodio). Su una piastra da 96 pozzetti (Perkin Elmer) sono caricati rispettivamente 200 µl di PBS (per il bianco) e di soluzione di calibrazione e alla quale sono stati addizionati 10 µl di potassio ioduro 1.16 M (Fluka, St. Louis, MO).

Soluzioni:

Chloramina-T: SOL.A. 10 Mm

28.189 mg	Chloramine-T
10 ml	acqua

Potassio Ioduro: 1.16 M

1.9256 g	Potassio ioduro
10 ml	acqua

PBS:

N°	SALE	Grammi	Molarità	Volume di soluzione	Volume finale	Molarità finale
SOL A	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O	13.8 g/500 ml	0.2 mM	19 ml		
SOL B	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -12 H <sub>2</sub> O	35.82 g/500 ml	0.2 mM	81 ml		
32	NaCl	8.5 g	0.85 %			
					1L	20 mM

Tabella 5.4.1 Composizione PBS

Le soluzioni scalari sono state preparate come descritto in tabella:

								Standard µM
20	µl	SOL. A	+	980	µl	PBS	ST 7	200
500	µl	ST 7	+	500	µl	PBS	ST 6	100
500	µl	ST 6	+	500	µl	PBS	ST 5	50
500	µl	ST 5	+	500	µl	PBS	ST 4	25
500	µl	ST 4	+	500	µl	PBS	ST 3	12.5
500	µl	ST 3	+	500	µl	PBS	ST 2	6.25
500	µl	ST 2	+	500	µl	PBS	ST 1	3.125
				500	µl	PBS	ST 0	0

Tabella 5.4.2 Soluzioni scalari di Chloramina-T

I campioni di whey protein (100µl in esame) sono stati depositati e portati ad un volume di 200 µl pozzetto con una diluizione finale 1:2.

Su tutti i pozzetti vengono aggiunti 20 µl di acido acetico. Dopo agitazione l'assorbanza della reazione è stata letta allo spettrofotometro a 340 nm contro il bianco contenente solo PBS.

La chloramine-T standard assorbe a 340 nm in modo lineare con un range da 0-200 µmol/litro con una sensibilità di 3.125 µM e la concentrazione delle AOPP è espressa come micromoli per litro di chloramina-T equivalenti.

	Bianco µl	Standard µl	Whey protein µl
PBS µl	200	-	100
Chloramine-T	-	200	-
Campione	-	-	100
KI	10	10	-
Ac.Acetico	20	20	20

Tabella 5.4.3 Quantità dei componenti caricati nei pozzetti

## 5.5 DOSAGGIO DEI CARBONILI

I campioni di siero di latte sono stati suddivisi in due aliquote (ciascuna con 100 µl di whey protein): una destinata al controllo negativo e l'altra trattata con dinitrofenilidrazina (DNPH). La DNPH reagisce con i carbonili proteici, formando un derivato cromatico cromoforo idrazone che può essere rilevato a 380 nm. Inizialmente, le proteine sono state precipitate con 0,5 ml di acido tricloroacetico al 10%. Il pellet proteico è stato risospeso in 0,5 ml di DNPH 10 mM solubilizzata in HCl 2,5N, mentre ai controlli negativi sono stati aggiunti 0,5 ml di HCl 2,5 N e posti al buio a temperatura ambiente agitandoli ogni 10 minuti.

Successivamente, sono stati aggiunti 0,5 ml di acido tricloroacetico al 20% a ogni serie di campioni, agitati con un vortex e centrifugati a 4°C a 5000 g per 15 minuti. Dopo aver eliminato il surnatante, il pellet proteico è stato lavato per tre volte e risospeso con 1 ml di etanolo/acetato di etile per rimuovere l'eccesso di DNPH. Al termine dei lavaggi, il pellet dei campioni è stato eluito con 1 ml di guanidina-HCl 6M e incubato a 37°C per 15 minuti.

La concentrazione di carbonili (CT) è stata determinata con uno spettrofotometro a un'assorbanza di 380 nm (Abs 380 nm), utilizzando il coefficiente di estinzione molare della DNPH di 22,000 M<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup> (Levine et al. 1994) secondo le seguenti equazioni:

$$\varepsilon = 22,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} = \frac{2.2 \cdot 10^4}{10^6 \text{ ml/nmol}} \quad 1/\varepsilon = 45,45 \text{ nmol/ml}$$

$$C = \text{Abs}/\varepsilon = \text{Abs } 380 \text{ nm} \cdot 45,45 \text{ nmol/ml}$$

I valori sono stati rapportati alla concentrazione proteica calcolata mediante BCA (nmol/mg di proteine). Tratto da: Reznick, A.Z. 1994; Dalle-Donne, Isabella 2003

DNFH 10 Mm	TCA 10%	TCA 20%
24.77 mg     DNFH	10 g            TCA	20 g            TCA
12.5 ml       HCl 2.5N	100 ml        H <sub>2</sub> O	100 ml        H <sub>2</sub> O
ETANOLO:		GUANIDINA-HCl 6M
ETILI ACETATO		57.31 g        Guanidina
50 ml         ET.OH		100 ml        H <sub>2</sub> O
50 ml         ET.Ac		

Tabella 5.5.1 Soluzioni preparate per il saggio enzimatico utilizzato per la determinazione dei carbonili totali

## 5.6 DOSAGGIO DEI TIOLI

Il DTNB (5,5'-ditiobis-(acido 2-nitrobenzoico)) è un composto idrosolubile impiegato per quantificare i gruppi sulfidrilici liberi in una soluzione. La reazione tra il DTNB e un gruppo sulfidrilico libero delle proteine produce un disolfuro misto e acido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB), un composto giallo. Questo prodotto viene quindi misurato con un lettore di micropiastre (VICTOR X100, Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) a 412 nm. La determinazione dei gruppi sulfidrilici avviene confrontando il campione di siero con una curva standard, costruita utilizzando concentrazioni note di un composto contenente sulfidrilico, come la Cysteina-HCl 1,5M (Sigma -Aldrich, Milan, Italy) diluita in modo seriale come da tabella 5.6.1.

Standard	Volume di RB ( $\mu$ l)	Q.tà Cys ( $\mu$ l)	Concentrazione finale (mM)	Concentrazione (nmol/20 $\mu$ l pozzetto)
A	270	30	1.5	30
B	275	25	1.25	25
C	280	20	1	20
D	285	15	0.75	15
E	290	10	0.5	10
F	295	5	0.25	5
G	300	0	0	0

Tabella 5.6.1 Curva di taratura con cisteina

Per il dosaggio dei tioli si utilizzano:

- RB Reaction Buffer
  - o 0.1M sodio phosphate 0.1M pH 8                      200 ml
  - o 1 mM EDTA (mw 372.24)                                      74.48 mg/200 ml
- Cys-HCl Cysteina-HCl (mw 175.6)                              13.17 mg/50 ml RB
- DTNB Ellman's reagent (DTNB)                              4 mg/ml RB

La curva standard ed il campione (ciascuno di 20 $\mu$ l) è depositato su una piastra da 96 pozzetti e portato ad un volume di 200 con il tampone di reazione (RB). Ad ogni pozzetto si aggiungono 3,5  $\mu$ l di DTNB e si mette ad incubare ad RT per 15 minuti.

La determinazione dei tioli si esegue tramite lettore di micropiastre (VICTOR X100, Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) misurando l'assorbanza a 412 nm.

	Bianco $\mu$ l	Standard $\mu$ l	Whey protein $\mu$ l
RB $\mu$ L	200	180-	150
Cys-HCl	-	20	-
Campione	-	-	<b>50</b>
DTNB	3.5	3.5	3.5

Tabella 5.6.2 Preparazione della piastra per la lettura della concentrazione dei tioli.



Calcolo della concentrazione:

Viene determinata la concentrazione tiolica utilizzando l'equazione della retta di taratura allestita con la cisteina standard.

Curva: 30 – 5 nmol/pozzetto

$$y = ax + b$$

$$\text{Abs} = a [\text{Cys nmol/pozzetto}] + b$$

$$x = (y - b) / a \quad [\text{Cys nmol/pozzetto}] = (\text{Abs} - b) / a$$

Il risultato va poi moltiplicato per il fattore di diluizione 20 per trasformare il dato in nmol/ml

### 5.7 DOSAGGIO MDA – ANALISI CON ACIDO TIOBARBITURICO

La concentrazione plasmatica di MDA è stata stimata secondo (Pegado et al., 2020; Uchiyama & Mihara, 1978). In breve, la reazione è stata effettuata miscelando 12,5 µl di soluzione di sodio dodecil solfato (8,1% p/v; Sigma-Aldrich, Milano, Italia), 93,5 µl di acido tricloroacetico (20% v/v, pH 3,5; Sigma-Aldrich), 93,5 µl di acido tiobarbiturico (1% v/v; Sigma-Aldrich), 45 µl di PBS 50 mM, 10 µl di plasma e 50 µl di acqua. La miscela di reazione è stata incubata a 100°C per 10 minuti e poi raffreddata in ghiaccio. La miscela è stata centrifugata (2000 g, 4°C, 2 minuti) e il surnatante è stato misurato spettrofotometricamente su un lettore di micropiastre a 535 nm (2023 Multilabel Reader VictorX4, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). MDA (tetrametossipropano; Sigma-Aldrich) è stato utilizzato per eseguire una curva standard compresa tra 0,154 e 5 mM. Il valore MDA è stato calcolato dal grafico standard MDA ed espresso come nmol/mg di proteine totali.

Preparazione dei reagenti

<i>PBS 50 mM</i>	40ml A + 180ml B + 5.7mg NaCl portare a 1L
<i>SDS 8.1%:</i>	0.81g di SDS in 10 ml di acqua
<i>TCA 20%</i>	10g + 50 ml acqua
<i>TBA 1%:</i>	25 mg Acido Tiobarbiturico + 2.5 ml acqua
<i>TMOP (MDA) Stock solution:</i>	1.69 µl MDA + 1 ml di acqua (10mM)

Allestire la curva di taratura con TMPO 10mM

TMPO 10 mM = 1.69  $\mu$ l TMPO + 1 ml H<sub>2</sub>O

TMPO 200  $\mu$ M = 60  $\mu$ l TMPO 10 mM + 3 ml H<sub>2</sub>O

Ci 200	Cf TMPO $\mu$ M	Vi TMPO ul	Vf 300 ul H <sub>2</sub> O
A	200,00	300,0	0,0
B	100,00	300,0	300
C	50,00	300,0 B	300
D	25,00	300,0 C	300
E	12,50	300,0 D	300
F	6,25	300,0 E	300
G	3,125	300,0 F	300
I	0	0	300

1. Accendere Il bagnetto termostatico a 95°C
2. preparare le eppendorf 1.5 ml.
3. 10 $\mu$ l campione o di standard
4. aggiungere 45 $\mu$ l PBS monobasico 50mM
5. aggiungere 12.5  $\mu$ l di SDS 8.1%.
6. aggiungere 93,5  $\mu$ l TCA 20% pH 3.5
7. aggiungere 93.5  $\mu$ l di TBA 1%
8. aggiungere 50.5  $\mu$ l di acqua nella curva
9. agitare brevemente ogni campione
10. centrifugare i campioni (2000rpm, 1 min)
11. incubare a 100°C per 10 min.
12. raffreddare in ghiaccio per 2 minuti
13. trasferire la fase superficiale 100 $\mu$ l su piastra per la lettura al victor a 530 nm.

	<b>STANDARD</b>	<b>CAMPIONE LATTE</b>
	$\mu\text{l}$	$\mu\text{l}$
PBS	45	45
SDS 8.1%	12.5	12.5
TCA 20%	93.5	93.5
TBA 1%	93.5	93.5
H <sub>2</sub> O	50.5	35.5
Standard	5	-
Campione	-	20

## 5.8 RISULTATI

I dati sono espressi in  $\mu\text{mol}/\text{tubo}$  e vanno moltiplicati per il fattore di diluizione 15 per ottenere il valore espresso in  $\mu\text{M}$ .



## 6. RISULTATI E DISCUSSIONE

I dati sono stati analizzati mediante analisi della varianza (utilizzando un modello lineare generalizzato) confrontando le fattrici per i seguenti fattori: proteine totali, AOPP, tioli, carbonili, e tBARS (MDA). Quando la correlazione osservata risultava statisticamente significativa ( $P < 0,05$ ), le medie marginali stimate dei gruppi sono state confrontate mediante confronti a coppie.

Fattrice	Proteine (mg/ml)	AOPP (nmol/ml)	Tioli (nmol/ml)	tBARS (nmol/ml)	Carbonili (nmol/ml)
KORALINE	14,7 ± 1,2	24,6 ± 3,9	187,8 ± 30,5 <sup>cde</sup>	42,6 ± 6,9	1,53 ± 0,15 <sup>cd</sup>
LEGENDE	13,5 ± 1,5	27,0 ± 3,7	157,5 ± 22,0 <sup>bcde</sup>	40,5 ± 6,4	1,50 ± 0,28 <sup>cd</sup>
LESINDY	10,9 ± 0,4	26,3 ± 6,7	87,9 ± 26,5 <sup>abc</sup>	38,7 ± 5,9	0,63 ± 0,12 <sup>ab</sup>
NEW YORK	12,7 ± 0,8	52,2 ± 16,4	279,5 ± 74,7 <sup>de</sup>	98,3 ± 28,1	1,19 ± 0,10 <sup>cd</sup>
PLAZA	14,0 ± 1,7	38,2 ± 3,7	54,6 ± 16,1 <sup>a</sup>	46,5 ± 16,6	1,13 ± 0,16 <sup>abcd</sup>
SASSY	12,2 ± 0,7	51,4 ± 17,7	108,8 ± 20,4 <sup>abcde</sup>	54,6 ± 9,0	0,76 ± 0,10 <sup>abc</sup>
SIMPHONY	10,5 ± 0,5	15,0 ± 1,4	64,0 ± 13,7 <sup>ab</sup>	59,8 ± 12,5	0,48 ± 0,05 <sup>a</sup>
URIEL	12,1 ± 1,2	28,2 ± 15,1	87,3 ± 25,2 <sup>abcd</sup>	28,5 ± 1,9	1,10 ± 0,27 <sup>abcd</sup>
URSULA	13,5 ± 0,6	35,1 ± 10,8	103,6 ± 36,8 <sup>abc</sup>	155,7 ± 70,5	0,57 ± 0,20 <sup>a</sup>
WINNIPEG	13,8 ± 1,1	41,7 ± 6,8	356,2 ± 87,5 <sup>e</sup>	47,7 ± 10,4	1,69 ± 0,52 <sup>cd</sup>
WISH	12,3 ± 1,3	44,7 ± 10,2	250,2 ± 69,3 <sup>de</sup>	75,0 ± 30,0	2,35 ± 0,32 <sup>d</sup>
ZANZIBAR	12,9 ± 0,9	43,1 ± 11,6	133,3 ± 25,2 <sup>abcde</sup>	5,04 ± 7,6	1,14 ± 0,12 <sup>bcd</sup>

Tabella 6.1 Concentrazioni medie ( $\pm$  e.s.) dei biomarcatori di stress ossidativo osservate nel latte sgrassato delle 12 fattrici. Lettere diverse (<sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup>) nella stessa colonna indicano differenze statisticamente significative ( $P < 0,05$ , coefficiente di Pearson).

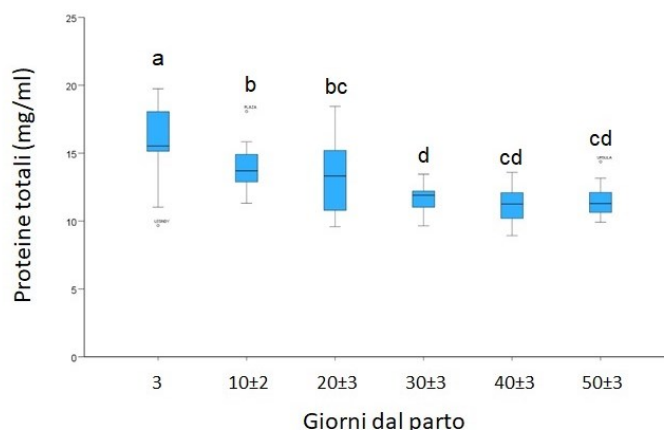


Grafico 6.2 Variazioni delle concentrazioni medie ( $\pm$  s.e.m.) del fattore Proteine totali nei due mesi post-parto. Le proteine totali sono state misurate in mg/ml.

Il grafico 6.2 illustra la concentrazione delle proteine totali nel latte di cavalla durante i primi 60 giorni di lattazione, escludendo il colostro. Si osserva una chiara tendenza alla diminuzione della concentrazione proteica con il progredire della lattazione. Nei primi giorni post-parto (giorno 3), la concentrazione proteica è significativamente alta, raggiungendo valori intorno ai 20 mg/ml. Tuttavia, a partire dal 10° giorno e fino al 50° giorno, si osserva una riduzione costante della quantità di proteine, con valori che scendono a circa 10 mg/ml.

Questa diminuzione della concentrazione proteica è considerata fisiologica nella cavalla. Infatti, è noto che nelle fasi iniziali della lattazione, il latte è ricco di proteine per soddisfare le elevate esigenze nutritive del puledro appena nato. Man mano che il puledro cresce e inizia a dipendere meno dal latte materno, la composizione del latte si modifica, con una riduzione delle proteine e un aumento di altri componenti come i grassi e il lattosio. Questo processo è documentato in letteratura scientifica, ad esempio, uno studio condotto da (Ofstedal et al., 1983) sottolinea come la composizione del latte equino subisca cambiamenti significativi durante la lattazione, con una diminuzione della frazione proteica che riflette le esigenze nutrizionali del puledro in crescita. Numerosi altri studi sulla bovina (Connolly et al., 2023) e sulla pecora (Balabanova & Ivanova, 2021) dimostrano il fisiologico calo proteico durante la lattazione similmente a quello osservato nelle analisi compiute sulle cavalle.

La quantità di proteine presenti nel latte analizzato è risultata inversamente correlata alle temperature ambientali giornaliere medie misurate come si può osservare dal grafico 5.3. Temperature elevate sono state associate a fenomeni di “heat stress” nelle bovine da latte, con conseguente riduzione del contenuto proteico da 3,02 g/100 g a 2,89 g/100 nel latte munto, nello specifico in presenza di un indice umidità-temperatura (THI) maggiore di 75 (Summer et al., 2019; Zeng et al., 2023). L’elevata temperatura influenza i meccanismi metabolici che riguardano la sintesi proteica del latte ma si è dimostrato come il declino proteico sia principalmente causato dall’effetto diretto dello stress termico, piuttosto che alla sola riduzione di assunzione di alimenti dimostrando l’effetto dello stress ossidativo indotto dal calore sulla qualità del latte (Summer et al., 2019).

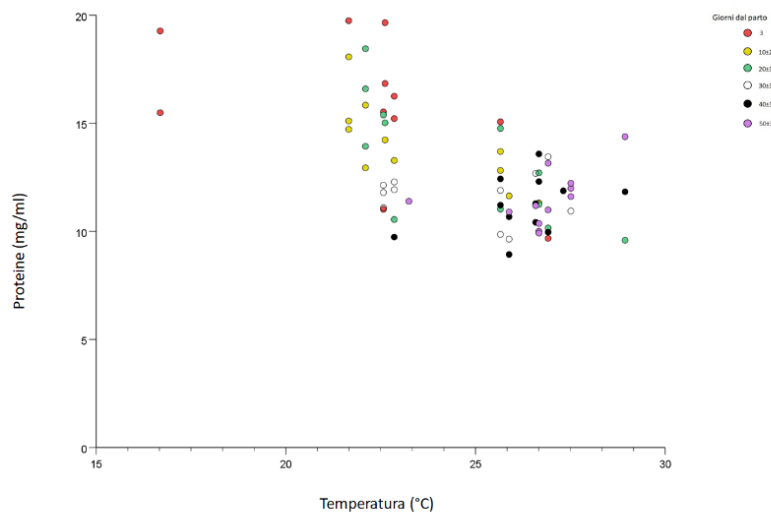


Grafico 6.3 Distribuzione delle concentrazioni proteiche nel latte delle 12 cavalle durante le diverse settimane. Ogni colore rappresenta una settimana specifica di misurazione, mostrando la variazione settimanale e individuale delle proteine nel latte. Il grafico evidenzia l'andamento del contenuto proteico in relazione al tempo e alle temperature ambientali.

Sebbene aumento della temperatura e calo della quantità proteica risultino inversamente correlati, le temperature ambientali (temperatura media = 24,62 °C, temperatura massima = 28,94 °C) non sembrano essere risultate troppo elevate per causare stress ossidativo indotto dal calore nella cavalla, specialmente in questo animale in cui non si verifica stress da calore facilmente se non in condizioni di BCS elevato (BCS > 4,25 al momento dell'inseminazione). Uno studio ha registrato che durante il 2° e 3° mese di allattamento, alcune cavalle hanno subito *heat stress* a causa di un'ondata di calore seguita da una siccità, dimostrando una minore capacità di adattamento allo stress termico rispetto a cavalle non sovrappeso (Robles et al., 2023).

Uno studio ha dimostrato come il fenomeno dell'*heat stress* aumenti la concentrazione di AOPP nel plasma di pecore e suini (Celi & Gabai, 2015; Chauhan et al., 2014), tuttavia nelle cavalle presenti in questo studio non è stata trovata una correlazione significativa tra l'aumento delle temperature e la quantità di AOPP presenti nel latte.

La correlazione inversa osservata tra proteine totali e temperatura può essere considerata una co-correlazione, riflettendo non tanto un effetto diretto della temperatura sulle proteine, quanto piuttosto un andamento fisiologico naturale delle proteine che tendono a diminuire in modo più significativo con il passare delle settimane. Questo calo è

fisiologico e può coincidere temporalmente con l'aumento delle temperature, creando un'apparente relazione significativa tra i due fenomeni.

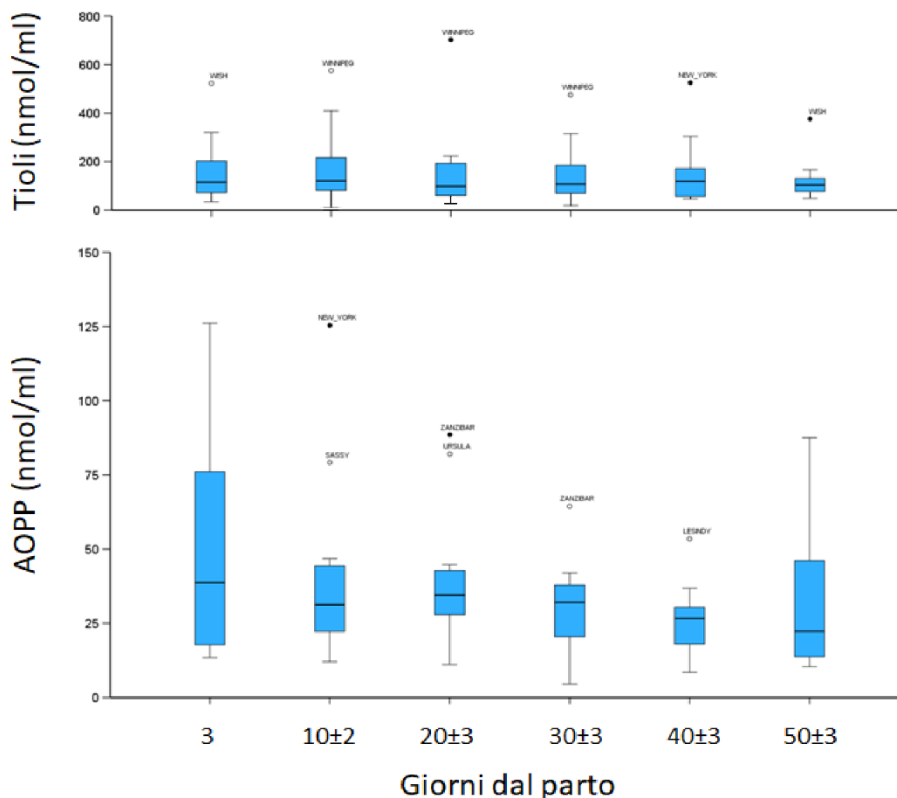


Grafico 6.4 Il grafico mostra le concentrazioni di AOPP (Advanced Oxidation Protein Products) e Tioli misurati in nmol/ml nel latte di cavalle a diverse tempistiche post-parto.

Dal grafico 6.4 si osserva una diminuzione significativa dei livelli di AOPP dal giorno 3 in poi, indicando un possibile calo dello stress ossidativo con il progredire del post-parto. I valori inizialmente elevati di AOPP suggeriscono un aumento dello stress ossidativo subito dopo il parto, che si attenua nelle settimane successive.

L'ossidazione proteica, con particolare riferimento ai prodotti avanzati di ossidazione delle proteine (AOPP), è un biomarker di stress ossidativo (OS) strettamente legato all'attività dei polimorfonucleati (PMN), come dimostrato nei bovini, dove i neutrofili attivati contribuiscono significativamente alla formazione degli AOPP (Gabai et al., 2019). Nelle vacche da latte, l'inseminazione artificiale può introdurre patogeni nell'utero, innescando reazioni infiammatorie che portano alla formazione di AOPP e al possibile sviluppo di endometrite subclinica, spesso correlata alla mortalità embrionale (Celi &



Gabai, 2015). Inoltre, livelli elevati di AOPP sono stati osservati in vacche alimentate con insilato di mais, un alimento a basso contenuto di antiossidanti che non contribuisce alla diminuzione di stress ossidativo. Questo fenomeno è anche associato a una diminuzione della quantità di latte prodotto, evidenziando una correlazione negativa tra AOPP e resa lattifera. Simili aumenti di AOPP sono stati riscontrati in pony con elevato BCS sottoposti a restrizione energetica, dove l'ossidazione dei lipidi comporta un innalzamento delle AOPP (Celi & Gabai, 2015).

Tuttavia, nel latte di cavalla, non sono disponibili studi specifici riguardanti le AOPP nella matrice latte. Il grafico analizzato, che mostra AOPP elevate nei primi giorni post-parto, si discosta dagli studi condotti su plasma bovino, le quali AOPP risultano diminuite attorno al periodo del parto (Celi & Gabai, 2015). Questo aumento iniziale potrebbe essere attribuito a lievi processi infiammatori causati dalla suzione del puledro, piuttosto che da fattori simili a quelli osservati nelle vacche da latte.

Per tutta la durata delle analisi la concentrazione di tioli risulta mantenersi costante indicando una buona capacità antiossidante del latte.

L'analisi dei dati mostra una correlazione significativa tra le AOPP ed i tioli nel latte suggerendo una possibile risposta compensatoria in cui i tioli vengono prodotti e mantenuti a livelli elevati per contrastare l'aumento dello stress ossidativo indicato dalle AOPP. Nelle successive settimane, con la diminuzione delle AOPP, i tioli mantengono una concentrazione stabile indicando una capacità antiossidante che non è stata compromessa dallo stress ossidativo.

Sono visibili delle cavalle *outliers* come "Winnipeg" tra i dieci giorni ed il primo mese post-parto, nella quale è stata misurata una concentrazione tre volte maggiore rispetto alla media del gruppo indicando una possibile risposta più forte in termini di produzione di tioli.

I tioli hanno un'importante capacità antiossidante in quanto l'atomo di zolfo agisce come antiossidante stabilizzando i radicali liberi accettando il loro elettrone spaiato. Livelli adeguati di Glutazione (GSH), il più importante antiossidante endogeno, sono fondamentali per il mantenimento di uno stato ossido riduttivo bilanciato prevenendo che sfoci in stress ossidativo (McLeay et al., 2017).

Gli studi compiuti sulle bovine da latte primipare e in bovine nel primo periodo di lattazione dimostrano come questi animali siano più suscettibili a infezioni rispetto a

bovine multipare e in generale rispetto alle stesse bovine nei successivi stadi di lattazione (Tufarelli et al., 2023).

Questi studi sulle bovine si riferiscono tutti a livelli di tioli presenti nel plasma, la letteratura riguardante queste molecole presenti nel latte risulta ancora scarsa: (Niero et al., 2015) ha correlato i tioli nel latte bovino con le sue caratteristiche qualitative.

Per quanto riguarda la cavalla non esistono studi specifici a riguardo, si può dedurre però che gli effetti dei tioli nel loro ruolo di antiossidanti sia il medesimo, fungendo da molecole protettive contro lo stress ossidativo.

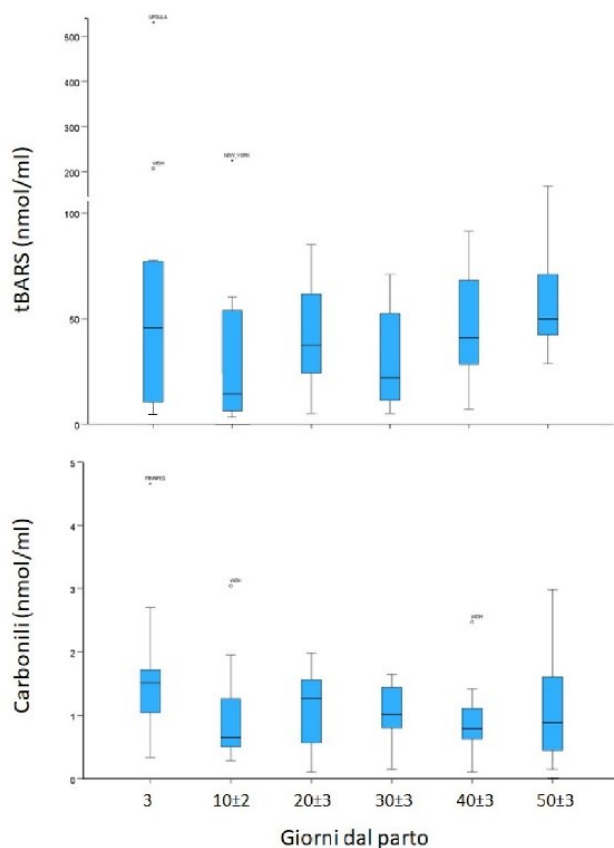


Grafico 6.5. Il grafico mostra le concentrazioni di Carbonili e tBARS misurate in nmol/ml nel latte di cavalle a diverse tempistiche post-parto.

Il grafico 6.5 mostra una certa variabilità nei livelli di tBARS con alcune fluttuazioni osservabili nei diversi giorni post-parto. Non è presente una tendenza costante, l'andamento suggerisce la presenza di periodi in cui il latte delle cavalle in esame è

maggiormente soggetto a perossidazione lipidica. Sono visibili livelli molto elevati di alcune outliers specialmente nei primi campionamenti post-parto.

Il test tBARS vien utilizzato come metodo rapido e semplice per valutare il danno ossidativo dei lipidi sebbene sia stato criticato per la sua bassa specificità e la formazione di artefatti (Celi et al., 2011). La malondialdeide (MDA) è un biomarker ampiamente riconosciuto della perossidazione lipidica (Tsikas, 2017), spesso associato a diverse malattie, è ancora poco chiaro però se l'MDA abbia un ruolo attivo nei meccanismi patologici o se sia una semplice conseguenza dei processi patologici (Falomo et al., 2020; Gaschler & Stockwell, 2017).

Uno studio di (Yaralioglu-Gurgoze et al., 2005) ha riscontrato un aumento della MDA plasmatica in cavalle affette da endometrite rispetto a cavalle sane (Falomo et al., 2020b), mentre un ulteriore studio ha mostrato come l'integrazione della dieta dei suini con l-metionina (l-Met) riduca i livelli di MDA e dei carbonili proteici nei campioni di mucosa duodenale, indicando una diminuzione dello stress ossidativo nella mucosa del duodeno (Celi & Gabai, 2015).

Nei primi giorni post-parto, si osserva una concentrazione relativamente elevata di carbonili nel latte. Questo suggerisce che subito dopo il parto, c'è un incremento dello stress ossidativo, che porta alla formazione di questi composti. La concentrazione di carbonili sembra poi diminuire gradualmente nei giorni successivi, con una tendenza leggermente discendente man mano che ci si allontana dal parto. Questo lieve calo potrebbe indicare una riduzione dello stress ossidativo e dei processi infiammatori iniziali legati al parto. Si notano alcune variazioni tra le cavalle, come evidenziato dagli outlier nel grafico. Questo indica che alcune cavalle hanno livelli di carbonili significativamente diversi rispetto ad altre nello stesso periodo.

Al contrario delle AOPP, i carbonili proteici sono biomarcatori meno sensibili della mieloperossidasi (MPO) e non possono essere considerati prodotti specifici dell'esplosione ossidativa dei neutrofili e dell' $\text{HOCl}$  (acido ipocloroso), poiché vari meccanismi di ossidazione possono portare alla loro formazione (Gabai et al., 2019).

I carbonili sono prodotti della ossidazione delle proteine, e la loro presenza è indicativa di danno ossidativo; sono il marker di danno proteico non specifico attualmente più utilizzato (Dalle-Donne et al., 2003; Gabai et al., 2019b) e sono formati quando i gruppi

funzionali delle proteine reagiscono con specie reattive dell'ossigeno (ROS) o altri agenti ossidanti, portando a modificazioni strutturali delle proteine. La formazione di carbonili è spesso associata a condizioni di stress ossidativo, infiammazione, disfunzioni metaboliche e patologie quali malattia di Alzheimer, artrite reumatoide, diabete, sepsi, insufficienza renale cronica e sindrome da distress respiratorio (Dalle-Donne et al., 2003). Non ci sono studi disponibili sui carbonili nel latte equino per effettuare confronti, ma esistono ricerche che analizzano la presenza di carbonili nel latte umano e bovino.

In uno studio attuato su latte di donne con mastite è stato evidenziato un aumento della concentrazione di carbonili nel latte suggerendo che la mastite possa indurre stress ossidativo con conseguente danno alle proteine del latte (Valls-Bellés et al., 2022).

Nello studio su latte di bovina, i risultati relativi ai carbonili e alla malondialdeide (MDA) hanno mostrato un significativo aumento di entrambi i biomarcatori nei campioni di latte delle bovine affette da mastite subclinica rispetto a quelli delle bovine sane. I risultati hanno evidenziato una correlazione positiva tra i livelli di MDA e i carbonili, supportando l'ipotesi che la mastite subclinica sia associata a un aumento dello stress ossidativo; nello specifico entrambi i markers analizzati risultavano più presenti nell'immediato post-parto rispetto a successivi momenti della lattazione. Questo aumento è stato attribuito allo stress ossidativo associato alla transizione post-partum, caratterizzato da un elevato fabbisogno energetico e da cambiamenti omeoretici significativi, che possono portare a un aumento della produzione di radicali liberi e, di conseguenza, ad un incremento dei biomarcatori di stress ossidativo come MDA e carbonili (Yehia et al., 2024).

Il grafico analizzato delle cavalle in studio mostra un andamento dei carbonili simile a quello osservato nelle bovine, con livelli più alti di carbonili subito dopo il parto ed una successiva diminuzione. Questo *pattern* potrebbe essere legato a processi infiammatori e di stress ossidativo post-parto, tuttavia, ulteriori studi sarebbero necessari per comprendere meglio le dinamiche dei carbonili nel latte di cavalla e per confrontarle direttamente con quelle delle bovine.

Nello studio di (Yehia et al., 2024) l'aumento dei carbonili, è stato associato anche ad una diminuzione delle proteine totali nel latte delle vacche affette da mastite subclinica. Questa relazione suggerisce che l'ossidazione delle proteine, evidenziata dai livelli elevati di carbonili, può contribuire a una riduzione della qualità e della quantità delle proteine totali nel latte.

Quando il latte subisce stress ossidativo le proteine presenti possono ossidarsi portando a modifiche strutturali come la carbonilazione che può rendere queste proteine non più rilevabili da alcuni metodi analitici utilizzati per misurare il livello di proteine totali risultando in un apparente riduzione dei livelli proteici totali (Domínguez et al., 2022)

Analizzando l'andamento dei fattori AOPP e Carbonili, i quali risultano significativamente correlati, si osserva una tendenza a calare per la concentrazione nel latte di entrambi i fattori con l'avanzare del tempo riflettendo un miglioramento dello stato ossidativo.

La correlazione positiva significativa presente tra Tioli e Carbonili dimostra che l'aumento dei carbonili è associato ad un aumento compensatorio dei tioli per cercare di limitare l'estensione del danno ossidativo presente nel post-parto indicando un meccanismo di difesa attivo da parte delle cavalle.

Il glucosio e i lattati in sede di laboratorio hanno riportato troppi valori non registrabili o non leggibili; pertanto, non sono stati presi in considerazione nelle analisi dei risultati.



## CONCLUSIONI

I markers di stress ossidativo analizzati, tra cui AOPP, carbonili, tioli e tBARS (MDA), indicano tutti un incremento dello stress ossidativo immediatamente dopo il parto, suggerendo che questo periodo è particolarmente critico per la salute della fattrice.

Questo aumento dello stress ossidativo può essere attribuito a diversi fattori che accompagnano il periodo post-parto, tra cui cambiamenti metabolici significativi, lo stress legato alla suzione del puledro, o la possibile presenza di lievi mastiti subcliniche. Nonostante l'importanza dei risultati ottenuti, è evidente la necessità di ulteriori studi per approfondire la comprensione dello stress ossidativo nel latte equino. L'assenza di studi comparativi specifici per la cavalla rende difficile interpretare in modo completo i risultati ottenuti. Un futuro studio potrebbe includere ulteriori esami come un citologico, un batteriologico e la conta delle cellule somatiche nel latte come ulteriore parametro per discernere la presenza di processi infiammatori locali subclinici che potrebbero alterare i marker di infiammazione oggetto del presente studio.

Risulta necessaria in un prossimo futuro la comparazione di dati ottenuti da animali clinicamente sani con un gruppo di soggetti con patologia mammaria per desumerne l'entità della variazione dello stress ossidativo in corso di mastite. Un ulteriore elemento di analisi potrebbe essere anche la valutazione delle curve di crescita dei puledri risulterebbe estremamente interessante per valutare se aumenti di stress ossidativo nel latte materno possano inficiare una regolare crescita dei redi.

In conclusione, i dati confermano che un lieve stress ossidativo è fisiologico nel periodo post-parto. Tuttavia, oltre a garantire una dieta equilibrata e adeguatamente calorica per prevenire sbilanci energetici e cambiamenti metabolici, appare necessario, garantire idonee supplementazioni di antiossidanti per migliorare significativamente il benessere delle fattrici e la qualità del latte, riducendo i rischi associati allo stress ossidativo. Queste strategie potrebbero inoltre favorire un migliore recupero post-parto e una più rapida ripresa della fertilità, migliorando così anche gli aspetti riproduttivi e produttivi delle cavalle.





## BIBLIOGRAFIA

- AboEl-Maaty, A. M., Shata, F. Y. H., Mahmoud, M. B. E., & Gabr, F. I. (2012). Oxidant/antioxidant status during foal heat in Arab mares and their relation to ovarian hormones. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, *1*(3), 198–202. [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(13\)60077-9](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(13)60077-9)
- Agwu, E., Ezihe, C., & Kaigama, G. (2024). Antioxidant Roles/Functions of Ascorbic Acid (Vitamin C). In *Ascorbic Acid - Biochemistry and Functions*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.110589>
- Allen WR, W. S. S. F. S. F. O. J. O. J. F. A. (2002). *The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. II. Endocrinology of pregnancy*. . 237–246.
- Auclair-Ronzaud, J., Jaffrézic, F., Wimel, L., Dubois, C., Laloë, D., & Chavatte-Palmer, P. (2022). Estimation of milk production in suckling mares and factors influencing their milk yield. *Animal*, *16*(4). <https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100498>
- Azam, M., Naseer, M. A., Mumtaz, K., Muzammil, I., Atta, K., Ahmed, R., & Islam Aqib, A. (2021). Alterations in Quality Parameters of Mastitic Milk. *Veterinary Science Research*, *2*(2). <https://doi.org/10.30564/vsr.v2i2.2638>
- Azat Aziz, M., Shehab Diab, A., & Abdulrazak Mohammed, A. (2019). Antioxidant Categories and Mode of Action. In *Antioxidants*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83544>
- Baiken, Y., Kanayeva, D., Taipakova, S., Groisman, R., Ishchenko, A. A., Begimbetova, D., Matkarimov, B., & Sapparbaev, M. (2021). Role of Base Excision Repair Pathway in the Processing of Complex DNA Damage Generated by Oxidative Stress and Anticancer Drugs. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.617884>
- Balabanova, T. B., & Ivanova, M. G. (2021). Effect of stage of lactation on somatic cell count in sheep milk of Pleven Blackhead breed. *Food Science and Applied Biotechnology*, *4*(1). <https://doi.org/10.30721/fsab2021.v4.i1.124>
- Barzilai, A., & Yamamoto, K. I. (2004). DNA damage responses to oxidative stress. In *DNA Repair* (Vol. 3, Issues 8–9, pp. 1109–1115). <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.002>

- Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N., & Nardone, A. (2005). Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 88(6). [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72878-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72878-2)
- Bordignon, M., Da Dalt, L., Marinelli, L., & Gabai, G. (2014). Advanced oxidation protein products are generated by bovine neutrophils and inhibit free radical production in vitro. *Veterinary Journal*, 199(1), 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.10.028>
- Bullone, M., & Lavoie, J. P. (2017). The contribution of oxidative stress and inflammaging in human and equine asthma. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12). <https://doi.org/10.3390/ijms18122612>
- Canisso, I. F., Podico, G., & Ellerbrock, R. E. (2021). Diagnosis and treatment of mastitis in mares. In *Equine Veterinary Education* (Vol. 33, Issue 6). <https://doi.org/10.1111/eve.13228>
- Cavinder, C. A. , V. M. M. , G. P. G. , F. D. W. and S. D. G. (2007). Endocrine profile comparisons of fat versus moderately conditioned mares following parturition. *Journal of Equine Veterinary Science*, 72–79.
- Cecchini, S., Fazio, F., Bazzano, M., Caputo, A. R., Giannetto, C., & Piccione, G. (2019). Redox status and oxidative stress during late pregnancy and postpartum period in mares. *Livestock Science*, 230. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.103821>
- Celi, P., & Gabai, G. (2015). Oxidant/antioxidant balance in animal nutrition and health: The role of protein oxidation. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 2, Issue OCT). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2015.00048>
- Celi, P., Merlo, M., Da Dalt, L., Stefani, A., Barbato, O., & Gabai, G. (2011). Relationship between late embryonic mortality and the increase in plasma advanced oxidised protein products (AOPP) in dairy cows. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(4). <https://doi.org/10.1071/RD10268>
- Chandra, G., Aggarwal, A., Singh, A. K., Kumar, M., & Upadhyay, R. C. (2013). Effect of vitamin E and zinc supplementation on energy metabolites, lipid peroxidation, and milk production in peripartum sahiwal cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26(11), 1569–1576. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12682>

- Chauhan, S. S., Celi, P., Leury, B. J., Clarke, I. J., & Dunshea, F. R. (2014). Dietary antioxidants at supranutritional doses improve oxidative status and reduce the negative effects of heat stress in sheep. *Journal of Animal Science*, 92(8). <https://doi.org/10.2527/jas.2014-7714>
- Chaves, V. E., Júnior, F. M., & Bertolini, G. L. (2013). The metabolic effects of growth hormone in adipose tissue. In *Endocrine* (Vol. 44, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s12020-013-9904-3>
- Colombo, G., Clerici, M., Garavaglia, M. E., Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A., & Dalle-Donne, I. (2016). A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1019. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.11.052>
- Conley, A. J. (2016). Review of the reproductive endocrinology of the pregnant and parturient mare. In *Theriogenology* (Vol. 86, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.049>
- Conley, A. J., & Ball, B. A. (2019). Steroids in the establishment and maintenance of pregnancy and at parturition in the mare. In *Reproduction* (Vol. 158, Issue 6). <https://doi.org/10.1530/REP-19-0179>
- Connolly, C., Yin, X., & Brennan, L. (2023). Impact of Lactation Stage on the Metabolite Composition of Bovine Milk. *Molecules*, 28(18). <https://doi.org/10.3390/molecules28186608>
- Conte, F., Foti, M., Malvisi, M., Giacopello, C., & Piccinini, R. (2012). *Valutazione dell'azione antibatterica del lisozima del latte d'asina. Considerazioni igienico-sanitarie.*
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. In *Clinica Chimica Acta* (Vol. 329, Issues 1–2). [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00003-2)
- Davies Morel, M. C. (2021). *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management, 5th Edition.*
- Deans, A. J., & West, S. C. (2011). DNA interstrand crosslink repair and cancer. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 11, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/nrc3088>

- Deichsel, K., & Aurich, J. (2005). Lactation and lactational effects on metabolism and reproduction in the horse mare. *Livestock Production Science*, 98(1–2), 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.10.003>
- Demirci-Çekiç, S., Özkan, G., Avan, A. N., Uzunboy, S., Çapanoğlu, E., & Apak, R. (2022a). Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Vol. 209). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114477>
- Demirci-Çekiç, S., Özkan, G., Avan, A. N., Uzunboy, S., Çapanoğlu, E., & Apak, R. (2022b). Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Vol. 209). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114477>
- Didier, A. J., Stiene, J., Fang, L., Watkins, D., Dworkin, L. D., & Creeden, J. F. (2023). Antioxidant and Anti-Tumor Effects of Dietary Vitamins A, C, and E. In *Antioxidants* (Vol. 12, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/antiox12030632>
- Domańska, D., Trela, M., Pawliński, B., Podeszewski, B., & Domino, M. (2022). The Indicators of Clinical and Subclinical Mastitis in Equine Milk. *Animals*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/ani12040440>
- Domínguez, R., Pateiro, M., Munekata, P. E. S., Zhang, W., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., Prieto, M. A., Bohrer, B., & Lorenzo, J. M. (2022). Protein oxidation in muscle foods: A comprehensive review. In *Antioxidants* (Vol. 11, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox11010060>
- Doreau, M., & Martuzzi, F. (2023). Milk yield of nursing and dairy mares. In *Nutrition and feeding of the broodmare*. [https://doi.org/10.3920/9789086865840\\_006](https://doi.org/10.3920/9789086865840_006)
- Falomo, M. E., Del Re, B., Rossi, M., Giaretta, E., Da Dalt, L., & Gabai, G. (2020a). Relationship between postpartum uterine involution and biomarkers of inflammation and oxidative stress in clinically healthy mares (*Equus caballus*). *Heliyon*, 6(4). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03691>
- Falomo, M. E., Del Re, B., Rossi, M., Giaretta, E., Da Dalt, L., & Gabai, G. (2020b). Relationship between postpartum uterine involution and biomarkers of inflammation and oxidative stress in clinically healthy mares (*Equus caballus*). *Heliyon*, 6(4). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03691>

- Fernandez-Novo, A., Pérez-Garnelo, S. S., Villagrà, A., Pérez-Villalobos, N., & Astiz, S. (2020). The effect of stress on reproduction and reproductive technologies in beef cattle—A review. In *Animals* (Vol. 10, Issue 11, pp. 1–23). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani10112096>
- Forsyth, I. A., Rossdale, P. D., & Thomas, C. R. (1975). Studies on mild composition and lactogenic hormones in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 23.
- Gabai, G., De Luca, E., Miotto, G., Zin, G., Stefani, A., Da Dalt, L., Barberio, A., & Celi, P. (2019a). Relationship between protein oxidation biomarkers and uterine health in dairy cows during the postpartum period. *Antioxidants*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/antiox8010021>
- Gabai, G., De Luca, E., Miotto, G., Zin, G., Stefani, A., Da Dalt, L., Barberio, A., & Celi, P. (2019b). Relationship between protein oxidation biomarkers and uterine health in dairy cows during the postpartum period. *Antioxidants*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/antiox8010021>
- Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 482, Issue 3, pp. 419–425). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>
- Geiger, A. J., Parsons, C. L. M., & Akers, R. M. (2016). Feeding a higher plane of nutrition and providing exogenous estrogen increases mammary gland development in Holstein heifer calves. *Journal of Dairy Science*, 99(9), 7642–7653. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11283>
- Gianazza, E., Crawford, J., & Miller, I. (2007). Detecting oxidative post-translational modifications in proteins. *Amino Acids*, 33(1), 51–56. <https://doi.org/10.1007/s00726-006-0410-2>
- Gibbs, P. G., Potter, G. D., Blake, R. W., & McMullan, W. C. (1982). Milk production of quarter horse mares during 150 days of lactation. *Journal of Animal Science*, 54(3). <https://doi.org/10.2527/jas1982.543496x>
- Grune T, M. K. S. G. D. K. (2003). Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun*, 709–718.
- Haas, R., Cucchi, D., Smith, J., Pucino, V., Macdougall, C. E., & Mauro, C. (2016). Intermediates of Metabolism: From Bystanders to Signalling Molecules. In *Trends*

- in *Biochemical Sciences* (Vol. 41, Issue 5, pp. 460–471). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.02.003>
- Halliwell, B. (1996). Free radicals, proteins and DNA: Oxidative damage versus redox regulation. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 24, Issue 4). <https://doi.org/10.1042/bst0241023>
- Hamosh, M. (1998). Protective function of proteins and lipids in human milk. In *Biology of the Neonate* (Vol. 74, Issue 2). <https://doi.org/10.1159/000014021>
- Hawkins, C. L., & Davies, M. J. (2019). Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *Journal of Biological Chemistry*, 294(51), 19683–19708. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.006217>
- Holmes, A. D., Spelman, A. F., Tyson Smith, C., & Kuzmeski, J. W. (1947). Composition of Mares' Milk as Compared with that of Other Species. *Journal of Dairy Science*, 30(6). [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(47\)92363-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(47)92363-1)
- Jischa, S., Walter, I., Nowotny, N., Palm, F., Budik, S., Kolodziejek, J., & Aurich, C. (2008). Uterine involution and endometrial function in postpartum pony mares. *American Journal of Veterinary Research*, 69(11). <https://doi.org/10.2460/ajvr.69.11.1525>
- Kang, H., Zsoldos, R. R., Sole-Guitart, A., Narayan, E., Cawdell-Smith, A. J., & Gaughan, J. B. (2023). Heat stress in horses: a literature review. In *International Journal of Biometeorology* (Vol. 67, Issue 6, pp. 957–973). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00484-023-02467-7>
- Khan, M. Z., Ma, Y., Xiao, J., Chen, T., Ma, J., Liu, S., Wang, Y., Khan, A., Alugongo, G. M., & Cao, Z. (2022). Role of Selenium and Vitamins E and B9 in the Alleviation of Bovine Mastitis during the Periparturient Period. In *Antioxidants* (Vol. 11, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox11040657>
- Koch, F., Lamp, O., Eslamizad, M., Weitzel, J., & Kuhla, B. (2016). Metabolic Response to heat stress in late-pregnant and early lactation dairy cows: Implications to liver-muscle crosstalk. *PLoS ONE*, 11(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160912>
- Krakowski, L., Brodzki, P., Krakowska, I., Opielak, G., Marczuk, J., & Piech, T. (2020). The Level of Prolactin, Serum Amyloid A, and Selected Biochemical Markers in Mares Before and After Parturition and Foal Heat. *Journal of Equine Veterinary Science*, 84. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.102854>

- Krishnan, G., Bagath, M., Pragna, P., Vidya, M. K., Aleena, J., Archana, P. R., Sejian, V., & Bhatta, R. (2017). Mitigation of the Heat Stress Impact in Livestock Reproduction. In *Theriogenology*. InTech.  
<https://doi.org/10.5772/intechopen.69091>
- Kudoh, K., Uchinami, H., Yoshioka, M., Seki, E., & Yamamoto, Y. (2014). Nrf2 activation protects the liver from ischemia/reperfusion injury in Mice. *Annals of Surgery*, 260(1). <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000000287>
- Leinonen, H. M. , et al. (2014). Role of the Keap1-Nrf2 Pathway in Cancer. *Advances in Cancer Research*, Vol. 122, 281–320.
- Lubritz, D. L., Forrest, K., & Robison, O. W. (1989). Age of cow and age of dam effects on milk production of Hereford cows. *Journal of Animal Science*, 67(10). <https://doi.org/10.2527/jas1989.67102544x>
- Lushchak, V. I. (2011a). Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. In *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* (Vol. 153, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.10.004>
- Lushchak, V. I. (2011b). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. In *Aquatic Toxicology* (Vol. 101, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- Lushchak, V. I. (2012). Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *Journal of Amino Acids*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/736837>
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. In *Chemico-Biological Interactions* (Vol. 224, pp. 164–175). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>
- Marreiro, D. do N., Cruz, K. J. C., Morais, J. B. S., Beserra, J. B., Severo, J. S., & Soares de Oliveira, A. R. (2017). Zinc and oxidative stress: Current mechanisms. In *Antioxidants* (Vol. 6, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/antiox6020024>
- Martens, H. (2020a). Transition Period of the Dairy Cow Revisited: I. Homeorhesis and Its Changes by Selection and Management. *Journal of Agricultural Science*, 12(3), 1. <https://doi.org/10.5539/jas.v12n3p1>

- Martens, H. (2020b). Transition Period of the Dairy Cow Revisited: I. Homeorhesis and Its Changes by Selection and Management. *Journal of Agricultural Science*, 12(3), 1. <https://doi.org/10.5539/jas.v12n3p1>
- MARTIN, R. G., McMENIMAN, N. P., & DOWSETT, K. F. (1992). Milk and water intakes of foals sucking grazing mares. *Equine Veterinary Journal*, 24(4). <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1992.tb02839.x>
- Martuzzi, F., Bresciani, C., Simoni, M., Basini, G., Quarantelli, A., & Righi, F. (2019). Evaluation of the oxidative status of periparturient mares supplemented with high amount of  $\alpha$ -tocopherol. *Italian Journal of Animal Science*, 18(1), 1404–1409. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2019.1677518>
- McKinnon A., Squires E., Valaa W., & Varner D. (2010). *Equine Reproduction*.
- McLeay, Y., Stannard, S., Houltham, S., & Starck, C. (2017). Dietary thiols in exercise: Oxidative stress defence, exercise performance, and adaptation. In *Journal of the International Society of Sports Nutrition* (Vol. 14, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12970-017-0168-9>
- Mephram TB, M. K. (1987). *Physiology of Lactation*. 109–127.
- Michael, P., de Cruz, C. R., Mohd Nor, N., Jamli, S., & Goh, Y. M. (2023). Evaluation of heat stress threshold and impacts on milk yield in dairy cattle crossbreds in a hot and humid climate. *Theoretical and Applied Climatology*, 154(1–2). <https://doi.org/10.1007/s00704-023-04549-3>
- Miller, J. W., Selhub, J., & Joseph, J. A. (1996). Brief Communication OXIDATIVE DAMAGE CAUSED BY FREE RADICALS PRODUCED DURING CATECHOLAMINE AUTOXIDATION: PROTECTIVE EFFECTS OF O-METHYLATION AND MELATONIN. In *Free Radical Biology & Medicine* (Vol. 21, Issue 2).
- Mills, P. C., Smith, N. C., Casas Patricia Harris, I., Harris, R. C., Marlin, D. J., Mills, P., Smith, N., Casas, I., Harris, P., & Harris Marlin, R. D. (1996). Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse. In *Eur J Appl Physiol* (Vol. 74).
- Musaev, A., Sadykova, S., Anambayeva, A., Saizhanova, M., Balkanay, G., & Kolbaev, M. (2021). Mare's milk: Composition, properties, and application in medicine. *Archives of Razi Institute*, 76(4), 991–1001.



<https://doi.org/10.22092/ARI.2021.355834.1725>

- National Research Council. (2007). Nutrient Requirements of Horses. *The National Academies Press, Washington, DC*, 315.
- Nett TM, Holtan DW, & Estergreen VL. (1975). Oestrogen, LH, PMSG and prolactin in serum of pregnant mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, 457–462.
- Niero, G., De Marchi, M., Masi, A., Penasa, M., & Cassandro, M. (2015). Short communication: Characterization of soluble thiols in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 98(9). <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9740>
- Niki, E. (2021). Lipid oxidation that is, and is not, inhibited by vitamin E: Consideration about physiological functions of vitamin E. *Free Radical Biology and Medicine*, 176, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.09.001>
- Novac, C. Ștefania, Nadăș, G. C., Matei, I. A., Bouari, C. M., Kalmár, Z., Crăciun, S., Fiț, N. I., Dan, S. D., & Andrei, S. (2022). Milk Pathogens in Correlation with Inflammatory, Oxidative and Nitrosative Stress Markers in Goat Subclinical Mastitis. *Animals*, 12(23). <https://doi.org/10.3390/ani12233245>
- Oftedal, O. T., Hintz, H. F., & Schryver, H. F. (1983). Lactation in the horse: milk composition and intake by foals. *The Journal of Nutrition*, 113(10), 2096–2106. <https://doi.org/10.1093/jn/113.10.2096>
- Oftedal, O. T., & Jenness, R. (1988). Interspecies variation in milk composition among horses, zebras and asses (Perissodactyla: Equidae). *Journal of Dairy Research*, 55(1). <https://doi.org/10.1017/S0022029900025851>
- Olechnowicz, J., Tinkov, A., Skalny, A., & Suliburska, J. (2018). Zinc status is associated with inflammation, oxidative stress, lipid, and glucose metabolism. In *Journal of Physiological Sciences* (Vol. 68, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s12576-017-0571-7>
- Pegado, M. R., Santos, C. P., Pimentel, M., Cyrne, R., Sampaio, E., Temporão, A., Röckner, J., Diniz, M., & Rosa, R. (2020). Lack of oxidative damage on temperate juvenile catsharks after a long-term ocean acidification exposure. *Marine Biology*, 167(11). <https://doi.org/10.1007/s00227-020-03770-2>
- Potočnik, K., Gantner, V., Kuterovac, K., Cividini, A., fakultet Sveučilišta Strossmayera Osijeku, P. J., Svetog Trojstva, T., dd, A., & Petrovića, T. D. (2011). Mare's milk. In *Mljekarstvo* (Vol. 61, Issue 2).

- Pyles, M. B., Brock, K., Schendel, R. R., & Lawrence, L. M. (2023). Improved methods for mare milk analysis: Extraction and quantification of mare milk carbohydrates and assessment of FTIR-based macronutrient quantification. *Frontiers in Nutrition*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1066463>
- Reed, S. M. , B. W. M. , & S. D. C. (2018). *Equine Internal Medicine (Fourth edition)*.
- Remillard, R. L. (2023). *Equine Clinical Nutrition*.
- Robles, M., Rousseau-Ralliard, D., Dubois, C., Josse, T., Nouveau, É., Dahirel, M., Wimel, L., Couturier-Tarrade, A., & Chavatte-Palmer, P. (2023). Obesity during Pregnancy in the Horse: Effect on Term Placental Structure and Gene Expression, as Well as Colostrum and Milk Fatty Acid Concentration. *Veterinary Sciences*, *10*(12). <https://doi.org/10.3390/vetsci10120691>
- Shadfar, S., Parakh, S., Jamali, M. S., & Atkin, J. D. (2023). Redox dysregulation as a driver for DNA damage and its relationship to neurodegenerative diseases. In *Translational Neurodegeneration* (Vol. 12, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40035-023-00350-4>
- Shepherd, M. (2015). Protecting your investment: nutrition for the foal. *Clinical Theriogenology*, *275–278*.
- Sjaastad O., S. O. , H. K. (2010). *Physiology of Domestic Animal*.
- Summer, A., Lora, I., Formaggioni, P., & Gottardo, F. (2019). Impact of heat stress on milk and meat production. *Animal Frontiers*, *9*(1). <https://doi.org/10.1093/af/vfy026>
- Talukder, S., Kerrisk, K. L., Gabai, G., & Celi, P. (2017). Role of oxidant-antioxidant balance in reproduction of domestic animals. *Animal Production Science*, *57*(8), 1588–1597. <https://doi.org/10.1071/AN15619>
- Tsikas, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry*, *524*, 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.021>
- Tu, V. Y., Ayari, A., & O’connor, R. S. (2021). Beyond the lactate paradox: How lactate and acidity impact t cell therapies against cancer. In *Antibodies* (Vol. 10, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/antib10030025>
- Tufarelli, V., Colonna, M. A., Losacco, C., & Puvača, N. (2023). Biological Health Markers Associated with Oxidative Stress in Dairy Cows during Lactation Period. In *Metabolites* (Vol. 13, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/metabo13030405>

- Turk, R., Piras, C., Kovačić, M., Samardžija, M., Ahmed, H., De Canio, M., Urbani, A., Meštrić, Z. F., Soggiu, A., Bonizzi, L., & Roncada, P. (2012). Proteomics of inflammatory and oxidative stress response in cows with subclinical and clinical mastitis. *Journal of Proteomics*, 75(14), 4412–4428.  
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.05.021>
- Uchiyama, M., & Mihara, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, 86(1).  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90342-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1)
- Ullrev, D. E., Struthers, R. D., Hendricks, D. G., & Brent, B. E. (n.d.). *COMPOSITION OF MARE'S MILK I*. <https://academic.oup.com/jas/article/25/1/217/4698486>
- Valacchi, G., Virgili, F., Cervellati, C., & Pecorelli, A. (2018). OxInflammation: From subclinical condition to pathological biomarker. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 9, Issue JUL). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00858>
- Valls-Bellés, V., Abad, C., Hernández-Aguilar, M. T., Nacher, A., Guerrero, C., Baliño, P., Romero, F. J., & Muriach, M. (2022). Human milk antioxidative modifications in mastitis. Further beneficial effects of cranberry supplementation. *Antioxidants*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/antiox11010051>
- Wiest JJ, T. D. (1987). Plasma prolactin, LH and FSH concentrations after suckling in post-partum mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, 731–732.
- Worthy, K., Escreet, R., Renton, J. P., Eckersall, P. D., Douglas, T. A., & Flint, D. J. (1986). Plasma prolactin concentrations and cyclic activity in pony mares during parturition and early lactation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 77(2), 569–574. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0770569>
- Yaralioglu-Gurgoze, S., Cetin, H., Cen, O., Yilmaz, S., & Atli, M. O. (2005). Changes in malondialdehyde concentrations and glutathione peroxidase activity in purebred Arabian mares with endometritis. *Veterinary Journal*, 170(1).  
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.04.002>
- Ye, L., Jiang, Y., & Zhang, M. (2022). Crosstalk between glucose metabolism, lactate production and immune response modulation. In *Cytokine and Growth Factor Reviews* (Vol. 68, pp. 81–92). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2022.11.001>

- Yehia, S. G., Saad, M. F., Mosallam, T. E., Abdel-Mobdy, A. E., Megahed, E. A., Aly, H. H., Salem, N. Y., & Ramadan, E. S. (2024). Evaluation of oxidative stress, compositional and biochemical changes in milk and serum of cows with subclinical mastitis. *Comparative Clinical Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s00580-024-03582-6>
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. In *Chemical Reviews* (Vol. 111, Issue 10, pp. 5944–5972). <https://doi.org/10.1021/cr200084z>
- Yuba, T., Koyama, Y., Kinishi, Y., Uokawa, R., Ootaki, C., Shimada, S., & Fujino, Y. (2024). Analysis of Maternal and Fetal Oxidative Stress During Delivery with Epidural Analgesia. *Reproductive Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s43032-024-01580-1>
- Zachut, M., Šperanda, M., De Almeida, A. M., Gabai, G., Mobasher, A., & Hernández-Castellano, L. E. (2020a). Biomarkers of fitness and welfare in dairy cattle: healthy productivity. In *Journal of Dairy Research* (Vol. 87, Issue 1, pp. 4–13). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S0022029920000084>
- Zachut, M., Šperanda, M., De Almeida, A. M., Gabai, G., Mobasher, A., & Hernández-Castellano, L. E. (2020b). Biomarkers of fitness and welfare in dairy cattle: healthy productivity. In *Journal of Dairy Research* (Vol. 87, Issue 1, pp. 4–13). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S0022029920000084>
- Zeng, J., Cai, J., Wang, D., Liu, H., Sun, H., & Liu, J. (2023). Heat stress affects dairy cow health status through blood oxygen availability. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s40104-023-00915-3>

