

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
FACOLTÀ DI AGRARIA

Dipartimento *Scienze Animali*

TESI DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE ANIMALI

*MECCANISMI ENDOCRINI CHE MODIFICANO GLI EFFETTI DELL'ALIMENTAZIONE SULLA  
MAMMOGENESI DURANTE IL PERIODO PERIBUBERALE NELLA BOVINA*

Relatore:

Prof. *GIANFRANCO GABAI*

Laureanda:

ARIANNA DONOLATO

Matricola n. 595877

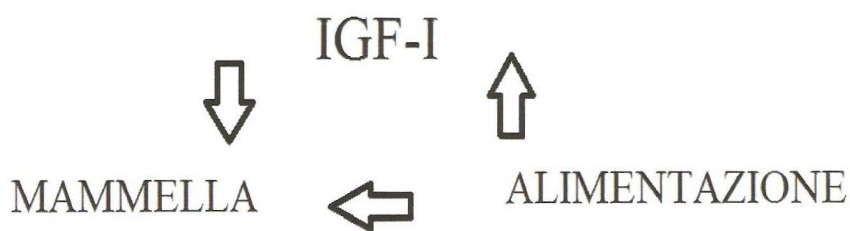
ANNO ACCADEMICO 2010- 2011

# INDICE

<b>Indice</b>	<b>I</b>
<b>Prefazione</b>	<b>III</b>
<b>Riassunto</b>	<b>IV</b>
<b>Summary</b>	<b>V</b>
<b>1. Struttura macroscopica e microscopica della mammella bovina.....</b>	<b>Pag. 1</b>
1.1 I legamenti sospensori.....	» 3
1.2 I sistemi vascolari.....	» 4
1.3 Il sistema linfatico.....	» 7
1.4 L'innervazione della mammella.....	» 8
1.5 I capezzoli.....	» 10
1.6 Il dotto papillare.....	» 12
1.7 Il seno papillare.....	» 14
1.8 Il seno lattifero.....	» 15
<b>2. Istologia e citologia della ghiandola mammaria.....</b>	<b>» 16</b>
2.1 Gli alveoli.....	» 16
2.2 I lobuli e i lobi.....	» 17
2.3 I dotti.....	» 18
2.4 Il capezzolo e le cisterne della ghiandola.....	» 19
2.5 I capezzoli-rivestimento epiteliale, muscoli e strutture.....	» 19
2.6 La citologia della ghiandola mammaria.....	» 19
<b>3. Sviluppo della ghiandola mammaria.....</b>	<b>» 21</b>
3.1 Le fasi della lattazione.....	» 21
3.1.1 Lo sviluppo prenatale della ghiandola mammaria bovina.....	» 21
3.1.2 Lo sviluppo mammario postnatale e fino alla pubertà.....	» 28
<b>4. Regolazione endocrina della biologia mammaria.....</b>	<b>» 30</b>
4.1 La relazione tra il numero di cellule e la produzione di latte.....	» 30
4.2 Il ruolo degli ormoni “classici” nello sviluppo mammario.....	» 31
4.3 Meccanismi locali di regolazione dello sviluppo mammario nelle manze prepuberali	» 32
4.3.1 L'asse somatotropico.....	» 33
4.3.2 Le IGF binding proteins.....	» 34
4.3.3 L'ovaio.....	» 35

4.3.4 Le cellule staminali.....	Pag.	37
4.3.5 Le proteine della matrice extracellulare.....	»	37
<b>5. Il livello alimentare modifica la crescita mammaria.....</b>	<b>»</b>	<b>39</b>
5.1 L'elevato aumento di peso e le implicazioni sulla crescita mammaria e sulla potenziale produzione di latte.....	»	39
5.1.1 Gli effetti del livello alimentare sulla crescita mammaria.....	»	39
5.1.2 Le basi fisiologiche per gli effetti del livello alimentare.....	»	40
5.1.3 Il livello alimentare e la produzione di latte.....	»	40
5.1.4 La capacità di crescita genetica e la produzione di latte.....	»	41
5.2 Gli effetti a lungo termine dell'assunzione di latte intero prima dello svezzamento sulle produzione di latte futura.....	»	42
5.3 La regolazione nutrizionale e somatotropica.....	»	43
5.4 La regolazione ontogenetica e nutrizionale.....	»	44
<b>6. Conclusioni.....</b>	<b>»</b>	<b>46</b>
<b>7. Bibliografia.....</b>	<b>»</b>	<b>48</b>
<b>8. Ringraziamenti.....</b>	<b>»</b>	<b>53</b>

## PREFAZIONE



*L'alimentazione modula la sintesi di IGF-I, il quale controlla lo sviluppo mammario; quindi la nutrizione modifica lo sviluppo mammario*

Nella presente dissertazione si vuole mettere in evidenza come l'effetto dell'alimentazione sullo sviluppo del parenchima mammario sia mediato dal quadro endocrino. Inoltre, si vuole mettere in evidenza la fase della vita in cui gli animali sono più sensibili ai trattamenti alimentari.

Il livello alimentare ed il tipo di alimentazione modificano il quadro endocrino e, in particolare, la sintesi di IGF-I (fattore di crescita insulino simile), il quale controlla lo sviluppo mammario. Il livello alimentare è in grado di modulare anche una famiglia di proteine, le IGFBP e in particolare l'IGFBP-III è in grado di modificare l'azione dell'IGF-I. L'azione di questi fattori è massima nel periodo prepuberale. Quindi è essenziale che la formulazione della dieta e la qualità degli alimenti destinati alle manze siano scrupolosamente curati per assicurare un fisiologico sviluppo della ghiandola mammaria, che porterà in età adulta ad un'eccellente carriera produttiva.

## RIASSUNTO

La mammella delle vacche lattifere è una ghiandola sudoripara modificata specializzata nella produzione latte.

La mammogenesi presenta due fasi distinte la prima precede il concepimento, mentre la seconda è rappresentata dalle ondate cicliche di proliferazione, secrezione ed involuzione durante i ricorrenti cicli di lattazione. La parte più importante è la crescita allometrica, che si osserva nella prima fase, prima della pubertà. Lo sviluppo della mammella in età prepuberale è promosso e controllato da diversi ormoni (estradiolo, progesterone, prolattina, ormoni tiroidei) ma il più importante è il GH (l'ormone della crescita) il quale effetto di proliferazione delle cellule epiteliali mammarie è mediato dall'IGF-I (il fattore di crescita insulino simile) prodotto a livello della mammella.

Il controllo endocrino in età prepuberale viene modificato dall'alimentazione; un alto livello alimentare aumenta la produzione locale di IGFBPs (le proteine di trasporto dell'IGF-I), e in particolare l'IGFBP-III si lega con l'IGF-I libero riducendo così la sensibilità del tessuto mammario all'IGF-I e quindi diminuendo la crescita mammaria.

L'alimentazione prepuberale è quindi in grado di modificare la mammogenesi e di conseguenza influenzare la futura produzione di latte.

## SUMMARY

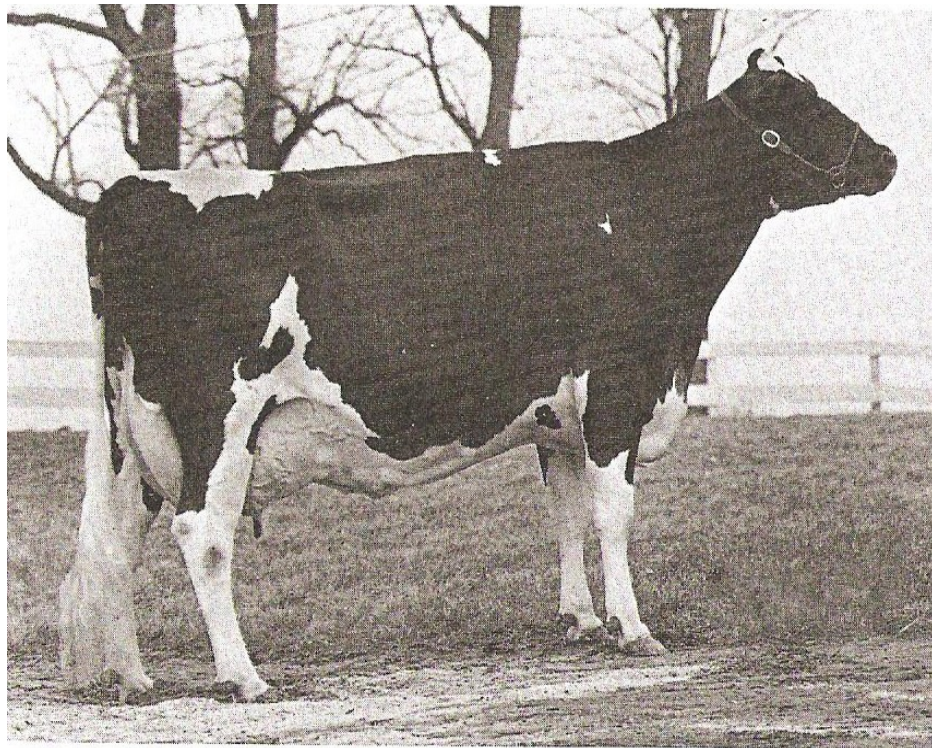
The udder of dairy cow is a cutaneous gland specialized in milk production.

The mammogenesis presents two different stages: the first stage occurs before conception, while the second is represented by cyclical waves of proliferation, secretion and involution during the recurrent cycles of lactation. The most important phase is the allometric growth, observed before puberty. The prepubertal udder development is promoted and controlled by different hormones (estradiol, progesterone, prolactin, thyroid hormones), but the most important is GH (growth hormone) that effects the proliferation of mammary epithelial cells by IGF-I (insulin-like growth factor) produced in the udder.

The prepubertal endocrine environment can be changed by feeding; a high feeding level enhances the local production of IGFBPs (IGF-I binding proteins), and particularly IGFBP-III binds to free IGF-I reducing the sensitivity of udder to IGF-I and thus decreasing mammary development.

Prepubertal nutrition is able to modulate mammogenesis and, accordingly, to influence future milk production.

# 1. STRUTTURA MACROSCOPICA E MICROSCOPICA DELLA MAMMELLA BOVINA



*Figura 1.1 Collins-Crest I >vanhoe Triune J, una bovina che combina eccellente modello e produzione. Lei è stata classificata eccellente (2E-96) e ha prodotto 31,028 lb di latte e 1020 lb di grasso in 365 giorni a 5 anni di età. (Courtesy of Donald S. Collins family, Perry, N. Y.) (Da Schmidt, 1971).*

La mammella è una ghiandola sudoripara apocrina modificata tubulo alveolare composta, tipica dei mammiferi e deputata alla produzione di latte.

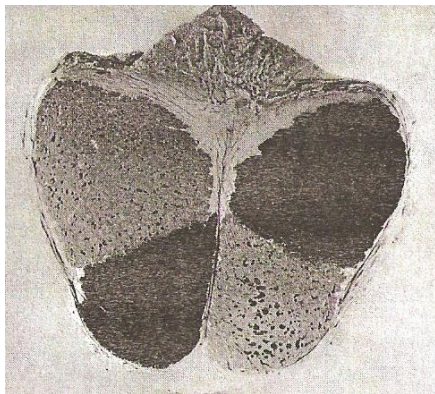
La mammella nella vacca lattifera (Figura 1.1) presenta uno sviluppo enorme e costituisce un complesso mammario che può raggiungere il peso di 25 kg in soggetti ad elevate attitudini con una produzione giornaliera di 50 l durante il picco di lattazione.

Il complesso mammario si estende cranio-caudalmente dalla metà caudale del tratto pubo-ombelicale fino alla parte ventrale del perineo e discende in basso fino alle regioni della gamba e perfino del garretto (Bortolami e altri, 2006).

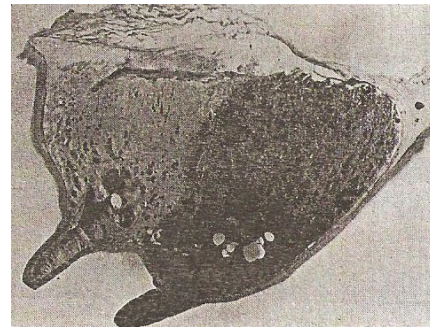
La mammella è suddivisa in due metà distinte, separate da tessuto connettivo e dai legamenti sospensori mediani. Tale separazione destra e sinistra appare facilmente per la presenza di un solco intermammario, più evidente osservando il posteriore della bovina. Ciascuna metà è costituita da due ghiandole, anteriore e posteriore, dette comunemente quarti o quartieri.

Per ciascuna metà della mammelle i quartieri sono costituiti da ghiandole completamente separate. Non sempre si osserva la presenza di un setto trasversale che separa i quartieri anteriori dai posteriori.

Talvolta infatti, alla sezione sagittale di ciascuna metà mammaria, non si osserva nessuna linea di demarcazione fra i quartieri anteriori e posteriori, tuttavia, una netta separazione del tessuto secernente, può essere dimostrata iniettando del colorante, come l'ematosilina, in uno dei quartieri appartenenti a ciascuna metà della mammella (Figura 1.2; 1.3).



*Figura 1.2: Dimostrazione dell'indipendenza dei quartieri anteriore e posteriore di una metà mammaria. Al momento della infusione nel quartiere posteriore è stata aggiunta ematosilina alla soluzione 20% di formalina. (Da Schalm et al., 1975).*



*Figura 1.3: L'ematosilina, aggiunta alla soluzione di formalina impiegata per la conservazione della mammella, ha provocato la colorazione di un quartiere anteriore e di un quartiere posteriore dimostrando in tal modo la netta separazione che essi presentano in ciascuna metà mammaria. (Da Schalm et al., 1975).*

La capacità dei quartieri posteriori è maggiore rispetto a quella degli anteriori. Questi ultimi producono circa il 40% del latte totale secreto dalla mammella, mentre quelli posteriori ne producono il 60% (Beach et al., 1904). La mammella è rivestita da pelle sottile, morbida ed elastica, provvista di peli sottili, di ghiandole sudoripare e, soprattutto, sebacee (Figura 1.5). La mammella deve essere abbastanza larga per produrre un elevato volume di latte e, allo stesso tempo, non deve essere eccessivamente larga o con attacchi scarsi, condizioni che creano problemi nell'allevamento.

Quindi la mammella bovina ottimale deve essere lunga, ampia, moderatamente profonda, fortemente attaccata e ragionevolmente parallela al pavimento (Figura 1.4).



Figura 1.4: Mammella di Vacca  
(Da Bortolami e altri, 2006).

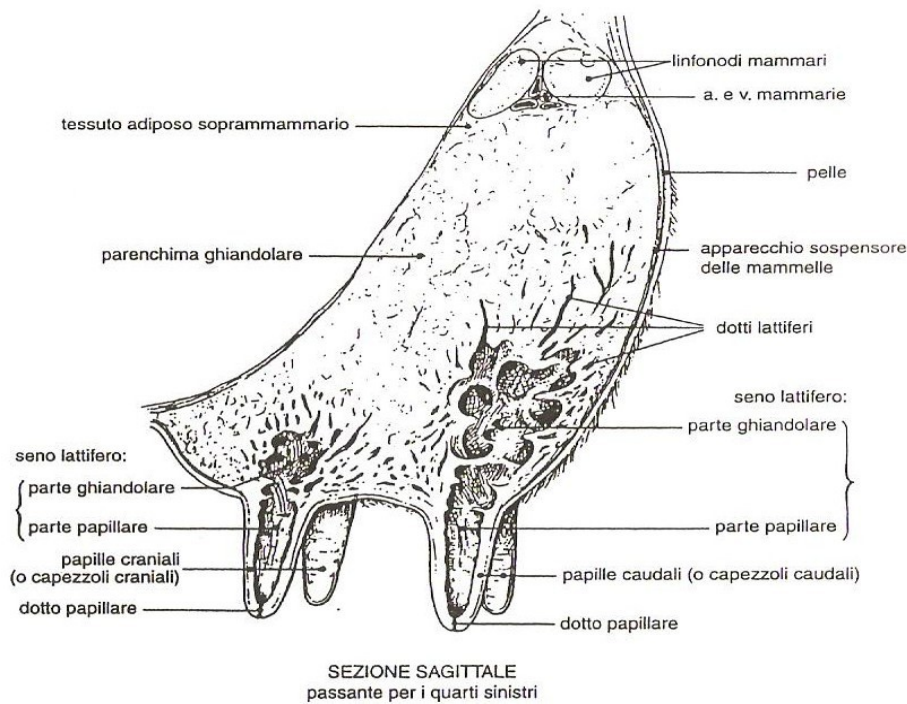
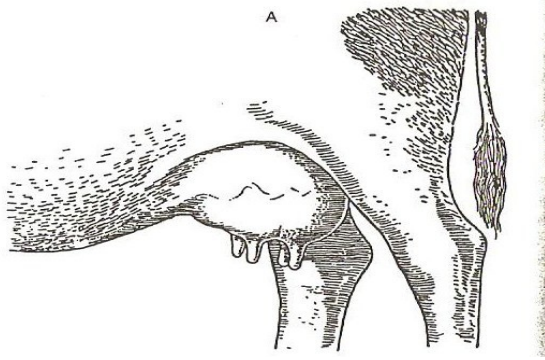


Figura 1.5: Conformazione interna delle mammelle di Vacca.  
(Da Bortolami e altri, 2006).

### 1.1 I legamenti sospensori

La mammella della bovina è principalmente sostenuta da una fascia di tessuto connettivo, presente in ciascuna metà mammaria e formata dalla fusione dei legamenti sospensori mediano e laterale (Figura 1.6). Per ciascuna metà mammaria è presente un legamento sospendore mediano che origina dalla linea mediana della tunica addominale e dal tendine prepubico. I due legamenti mediani decorrono parallelamente in direzione ventrale fra le due metà mammarie e vengono tenuti

insieme dal tessuto connettivo. Ciascuno di essi si inserisce nella ghiandola lungo la faccia mediale della corrispondente metà mammaria e si continua con lo stroma ghiandolare difendendo i lobi e i lobuli. Il tessuto del legamento sospensore mediano possiede un'elevata forza di trazione e gioca un importante ruolo nella sospensione della mammella. Il legamento mediano si fonde con il legamento sospensore laterale e con i bordi anteriore, posteriore e ventrale di ciascuna metà delle mammelle. Nel punto di separazione dei due legamenti mediani si forma il solco intermammario (Figura 1.6).

Il legamento sospensore laterale di ciascuna metà della mammella prende origine dai tendini sottopubico e prepubico. Nella sua estensione ventrale esso si allarga e raggiunge il legamento mediano come già descritto.

In maniera analoga, il legamento laterale si inserisce nello spessore della ghiandola in continuità con il relativo stroma connettivale. I legamenti sospensori laterali costituiscono il principale sostegno alla mammella, essi non contengono fibre elastiche e perciò non si distendono. Al contrario, tali fibre sono presenti nel legamento mediano che, potendosi perciò distendere, consentono alle mammelle di proiettarsi verso l'esterno.

Quando entrambi i legamenti cedono, la mammella diviene pendula e si abbassa verso il terreno. In questo caso essa risulta più vulnerabile di fronte agli agenti fisici e, d'altra parte, le lesioni del capezzolo rappresentano un frequente precursore di mastite.



*Figura 1.6: Apparato sospensore della mammella (Da Swett et al., 1942).*

## **1.2 I sistemi vascolari**

Il sangue, proveniente dal cuore, raggiunge la mammella compiendo il seguente tragitto (Figura 1.7):

1. Arteria iliaca esterna, deriva dall'aorta.
  - a) Arteria femorale.
  - b) Arteria prepubica all'anello inguinale esterno.

c) Arteria pudenda esterna, entra nella ghiandola mammaria dalla cavità addominale attraverso il canale inguinale

d) Arteria mammaria che si divide in due larghe arterie, anteriore, o craniale, e posteriore, o caudale; i rami di queste due si diffondono ventralmente e lateralmente e si dividono e si suddividono molte volte così che alla fine piccole arteriole riforniscono di sangue gli alveoli. Queste inoltre riforniscono di sangue il tessuto connettivo e i capezzoli.

e) Arteria addominale sottocutanea, un piccolo ramo che deriva dall'arteria mammaria prima che si divida in anteriore e posteriore.

Questa viaggia anteriormente e porta il sangue nella parete ventrale addominale anteriore e sulla parte basale della mammella.

2. Arteria iliaca interna, deriva dall'aorta e porta il sangue ai genitali e alla regione pudenda.

a) Arteria pudenda interna.

b) Arteria perineale, che passa sopra al margine posteriore dell'ischio verso il margine posteriore dorsale alla corrispondente metà mammaria.

Un letto venoso è situato alla base della mammella, nella fascia che la separa dalla parte addominale e riceve la maggior parte del sangue proveniente dai quattro quartieri. Il circolo venoso si continua, anteriormente e da ambo i lati, nella vena sottocutanea addominale e, posteriormente, nella vena pudenda esterna.

1. La vena sottocutanea addominale è la continuazione del ramo craniale della vena mammaria ed emerge dal margine anteriore della mammella e si dirige cranialmente e superficialmente fino alla fontana del latte, dove attraversa la parte addominale e diviene la vena toracica interna la quale poi entra nella vena cava anteriore. La posizione nella fontana del latte è variabile potendo essa riscontrarsi in qualunque punto tra l'ombelico e la cartilagine xifoidea. La vena sottocutanea addominale presenta notevoli variazioni di tortuosità e di diametro.

2. La vena pudenda esterna proviene, per ciascun lato, dalle porzioni posteriori del circolo venoso e, poiché attraversa il canale inguinale, forma la curva ad S e diviene la vena che sale lungo il canale stesso come un satellite dell'arteria pudenda esterna, raggiungendo la vena iliaca esterna e la vena cava posteriore fino ad arrivare al cuore. La vena pudenda esterna si divide in due rami craniale e caudale, e poi si divide e si suddivide e questi rami seguono il percorso delle corrispondenti arterie e arteriole.

3. La vena perineale è posizionata verso l'area dorsale posteriore di entrambe le metà della mammella e drena un'area della mammella nella quale il sangue è portato dall'arteria perineale, quest'area è una porzione molto piccola. La vena perineale presenta notevoli

variazioni e, di frequente, si nota una sola vena per le due metà della mammella. Essa decorre in alto e all'indietro verso l'ischio per raggiungere la vena pudenda interna. Per la particolare disposizione delle valvole, sembra che in questa vena il sangue vada verso la mammella anziché provenire da essa (Swett *et al.*, 1949). Gli allevatori ed i giudici delle bovine da latte erano un tempo convinti che le dimensioni e la lunghezza delle grosse vene del latte, quali si osservano stando lateralmente alla bovina, fossero importanti elementi per giudicare il potenziale produttivo degli animali. Il coefficiente di correlazione tra l'aspetto delle vene e la qualità di latte prodotto è di livello così modesto da far rifiutare tale credenza (Alrich *et al.*, 1917).

Il circolo venoso alla base della mammella è formato dai rami di destra e di sinistra delle vene mammarie craniale e caudale. I rami della vena mammaria caudale anastomizzano la base posteriore della mammella e i rami della vena sottocutanea addominale anastomizzano molti pollici anteriormente la base della mammella; è discutibile se il libero movimento del sangue si verifica tra le due metà della mammella a causa della direzione delle valvole nelle vene.

Il sangue può lasciare la mammella o dalla vena sottocutanea addominale o dalla vena pudenda esterna nelle bovine il lattazione. L'esatto percorso dipende probabilmente dalla posizione dell'animale, per questo appare che il sangue lasci la mammella attraverso la vena sottocutanea addominale negli animali in piedi.

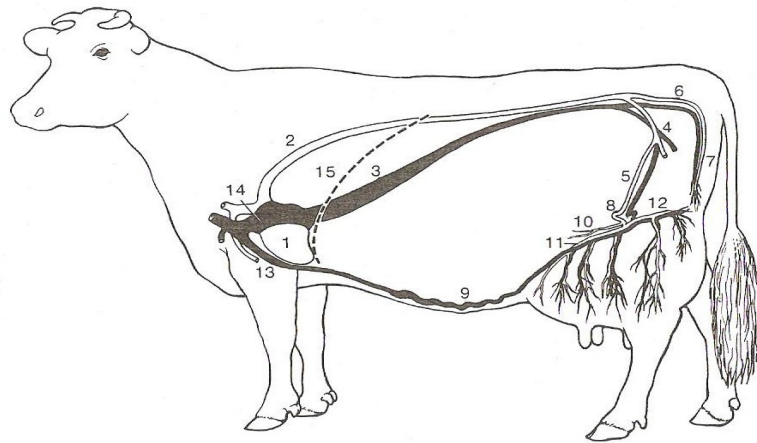


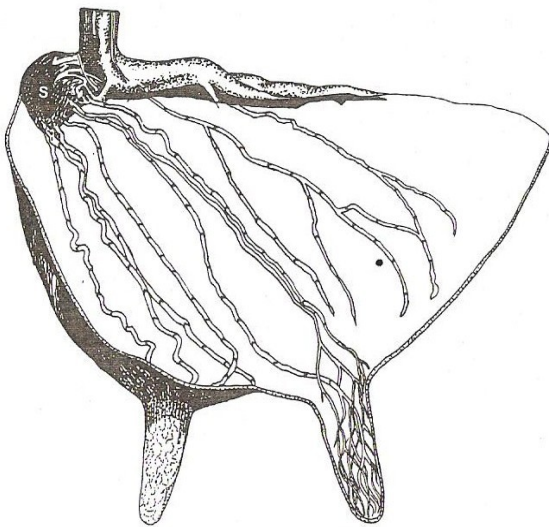
Figura 1.7: Circolazione sanguigna da e per la mammella. 1-Cuore, 2-Aorta addominale, 3-Vena cava posteriore, 4-Arteria e vena iliaca esterna, 5-Arteria e vena pudenda esterna, 6-Arteria e vena iliaca interna, 7-Arteria e vena perineale, 8-Curva ad S e arteria e vena pudenda esterna, 9-Vena addominale sottocutanea, 10-Arteria addominale sottocutanea, 11-Arteria mammaria craniale, 13-arteria e vena toracica interna, 14-Vena cava anteriore, e 15-Diaframma. (Da Schmidt, 1971).

### 1.3 Il sistema linfatico [Da Bortolami e altri, 2006]

Numerosi e grossi vasi linfatici (Figura 1.8) passano sulla superficie esterna della ghiandola, immersi nella fascia sottocutanea. I vasi linfatici formano tre reti distinte ma comunicanti che drenano la linfa della cute dalle vie di escrezione del latte e dal parenchima propriamente detto

1. Linfatici cutanei formano una rete superficiale che è tributaria di una rete profonda, posta al limite del derma, queste reti particolarmente sviluppate a livello della papilla si rendono a collettori e si spostano verso la base della mammella.
2. I linfatici delle vie di escrezione provengono da una rete sotto mucosa e si portano nella rete cutanea profonda in corrispondenza della base della papilla.
3. I linfatici del parenchima derivano da esili reti intra e perilobulari, che si aprono o nella rete papillare o direttamente nei collettori della base della mammella.

E' poco frequente il rilievo di piccoli linfonodi nel parenchima della cisterna in quanto, in generale, le strutture linfatiche sono limitate ai linfonodi sopramammari, situati subito al di sotto dei vasi e dei nervi che fuoriescono dal canale inguinale di ambo i lati.



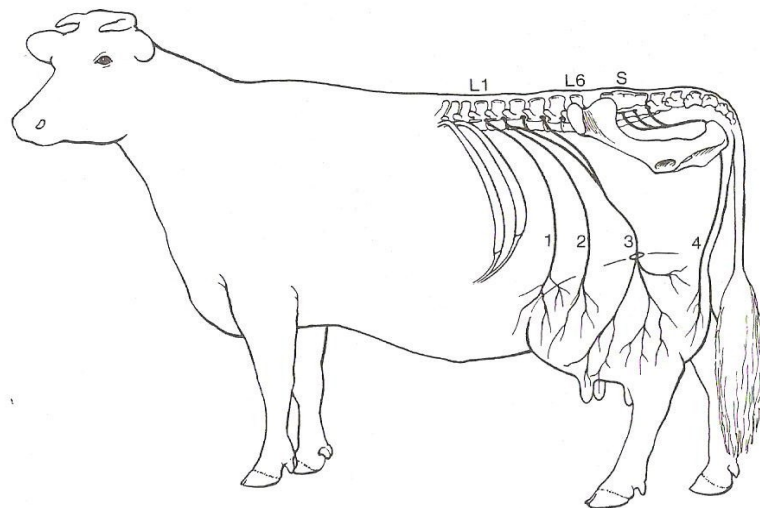
*Figura 1.8: Rappresentazione dei vasi linfatici sottocutanei che viaggiano in direzione dorso-caudale verso i linfonodi sopramammari. I vasi hanno valvole che permettono il movimento della linfa solo in una direzione-verso i linfonodi. (Da Schmidt, 1971).*

I linfonodi sono in posizione mediale rispetto al legamento sospensore laterale e tutti i linfatici afferenti, che prendono origine nella ghiandola mammaria, si immettono in tali linfonodi e poi la linfa si immette nella circolazione venosa. Delle strutture simili a valvole, poste alla fine del dotto toracico, impediscono al sangue di essere rigurgitato nel sistema linfatico. Queste valvole e le valvole addizionali nei vasi linfatici causano il flusso della linfa solo nella direzione del sistema del sangue venoso. I linfonodi filtrano il fluido rimuovendo i materiali estranei e poi la linfa passa in grandi vasi linfatici, i quali la trasferiscono nel sangue venoso attraverso il dotto toracico appena anteriore al cuore. I linfonodi inoltre aggiungono leucociti alla linfa. Generalmente si riscontra un unico linfonodo per ciascuna metà mammaria, ma se ne possono contare fino a sette. I vasi linfatici efferenti passano attraverso il canale inguinale profondo ma possono anche andare verso i linfonodi iliaci esterni. I vasi linfatici sono difficili da identificare, a causa della linfa che in loro ha un colore molto chiaro. La linfa è mossa dalla differenza di pressione causata dalla respirazione, dalla pressione nei capillari sanguigni, e dalla contrazione dei muscoli. Quando una eccessiva quantità di linfa si accumula tra la pelle e il tessuto secretorio della mammella, essa sviluppa l'edema. Questo è molto pericoloso nelle bovine al primo parto e in quelle anziane con mammella pendula al momento del parto. I dotti linfatici sottocutanei sotto la pelle della mammella sono i prevalenti e nelle bovine adulte diventano abbastanza larghi, alcuni raggiungono un diametro di 5-7 mm. Questi vasi corrono nella direzione dorso caudale ai linfonodi sopramammari. La linfa del tessuto ghiandolare è trasportata da un numero variabile di profondi e superficiali vasi linfatici e la loro misura varia da 2 a 6 mm di diametro. I capezzoli hanno un'abbondante fornitura di vasi linfatici. Questi sono separati per ogni capezzolo e sono leggermente più larghi dei vasi linfatici sottocutanei. I vasi linfatici dai capezzoli si uniscono in profondità o nei vasi sottocutanei, o in entrambi.

#### **1.4 L'innervazione della mammella**

I nervi della mammella (Figura 1.9) sono di origine mista, fibre afferenti, o sensoriali, e fibre efferenti o simpatiche. Le fibre dei nervi afferenti originano dalla radice dorsale del cordone spinale e le fibre efferenti, o motorie, dalla radice ventrale. Dopo aver lasciato la colonna vertebrale, si uniscono a formare nervi spinali. Questi sono pari e nei bovini il sistema nervoso consiste in 37 paia di nervi spinali e 12 nervi craniali. Solo pochi nervi spinali sono coinvolti nell'innervazione della mammella. I primi nervi lombari inviano fibre sulla superficie anteriore della mammella e adiacente alle pareti addominali; è discutibile se queste fibre entrano nella mammella. I secondi nervi lombari discendono dalla colonna vertebrale a fianco e innervano la parte anteriore della mammella. Queste fibre possono entrare nel tessuto ghiandolare davanti ai

quarti. I rami del secondo, del terzo, e del quarto nervo lombare si uniscono a formare i nervi inguinali ed entrano nella mammella attraverso il canale inguinale. I rami di questi nervi si trovano in tutto il tessuto ghiandolare, nel sistema di raccolta del latte, nei capezzoli, e nella pelle della mammella. I nervi perineali originano dal secondo, dal terzo e dal quarto nervo sacrale ed entrano nella mammella nella porzione caudale posteriore lungo le vene e le arterie perineali. I nervi perineali forniscono le fibre nervose della parte posteriore della mammella. I nervi sacrali sono considerati parte del sistema nervoso parasimpatico, e alcuni studiosi hanno pensato che questi nervi portassero le fibre nervose parasimpatiche alla mammella. Queste fibre non sono state trovate nella mammella e si è generalmente concluso che esse non sono presenti nella ghiandola mammaria della bovina. I nervi motori o efferenti forniscono la mammella al confine dei nervi inguinali. L'incisione dei nervi inguinali o la rimozione del tronco simpatico nell'area lombare rimuove tutti gli stimoli dei nervi efferenti della mammella. Le funzioni primarie delle fibre nervose simpatiche della mammella sono il controllo della fornitura di sangue alla mammella, l'innervazione dei muscoli lisci circostanti ai dotti per la raccolta del latte e il controllo del muscolo sfintere nel capezzolo. La stimolazione del sistema nervoso simpatico causa vasocostrizione dei vasi sanguigni e questo ha un effetto inibitorio della secrezione del latte, invece di stimolarla. Si deve ricordare che a livello della papilla sono presenti fitti plessi nervosi e numerosi corpuscoli tattili capsulati la cui stimolazione, durante la poppata provoca la liberazione per via riflessa di ormoni ipofisari, che favoriscono la eiezione del latte.



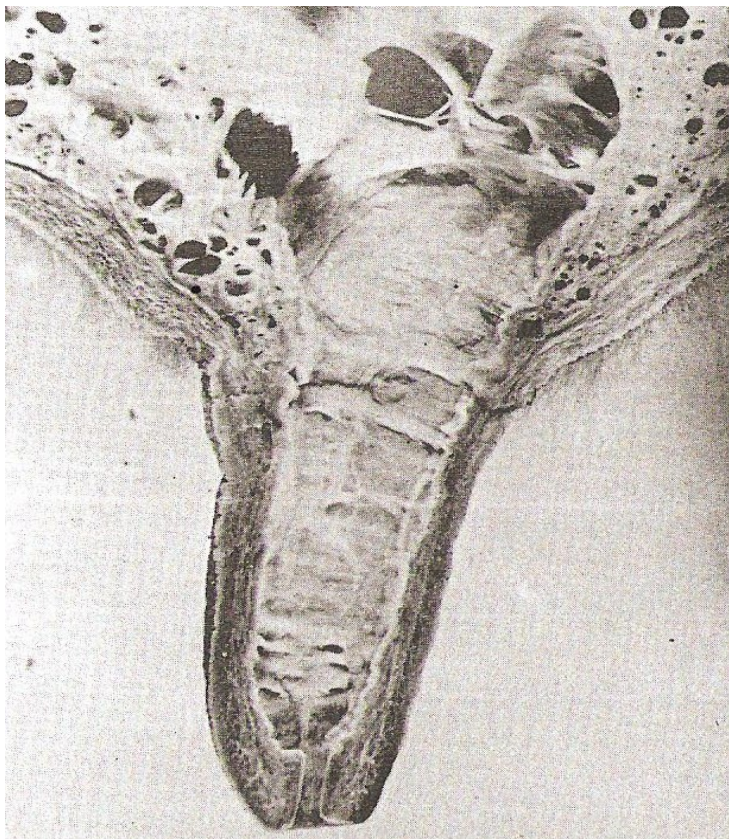
*Figura 1.9: Sistema nervoso della mammella. 1-Primo nervo lombare, 2-Secondo nervo lombare, 3-Nervo inguinale, 4-Nervo perineale, L1-Prima vertebra lombare, L6-Sesta vertebra lombare, e S-Sacro. (Da Schmidt, 1971).*

### 1.5 I capezzoli [Da Schalm et al., 1975]

Le strutture associate alla ghiandola mammaria comprendono i capezzoli (Figura 1.10)

Il numero normale di capezzoli funzionali, nella bovina, è di quattro.

La forma varia da quella cilindrica, cioè con diametro costante per l'intera lunghezza, a quella affusolata o conica, nel qual caso l'estremità libera è molto più sottile rispetto alla base. La lunghezza è estremamente variabile; i capezzoli posteriori sono solitamente più corti di quelli anteriori. Con l'avvento della mungitura meccanica, le bovine con capezzoli più corti sono state selezionate e preferite a quelle con capezzoli più lunghi, perché hanno mostrato un più rapido fluire del latte. La cute è sottile e sprovvista di peli e di ghiandole cutanee. Nella parete è contenuto un plesso vascolare che si riempie di sangue sotto pressione quando i capezzoli vengono stimolati, favorendone in tal modo l'erezione che, a sua volta, facilita il deflusso del latte, sia a seguito della suzione che della mungitura manuale o meccanica.



*Figura 1.10: Sezione del capezzolo della ghiandola mammaria bovina mostra numerose pieghe circolari nella cisterna del capezzolo. (Courtesy of Babson Bros. Company, Oak Brook, Illinois) (Da Schmidt, 1971).*



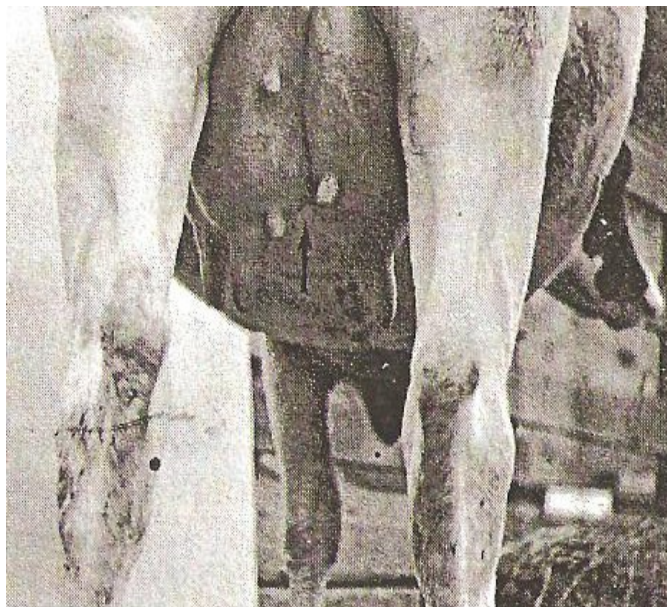
Capezzoli accessori o soprannumerari sono frequenti nella bovina (Figura 1.11).

Questi ultimi si osservano, più spesso, dietro ai normali capezzoli posteriori ed appaiono allineati rispetto ai capezzoli normali della corrispondente metà mammaria. I capezzoli accessori si sviluppano all'interno della linea mammaria, nei primi periodi della vita embrionale, e seguono la stessa evoluzione dei capezzoli normali.

Alcuni capezzoli soprannumerari producono in realtà una piccola quantità di latte e possono subire infezioni da parte di microorganismi patogeni implicati nel problema delle mastiti infettive.

Pertanto, i capezzoli soprannumerari funzionali non possono essere ignorati nei programmi di profilassi delle mastiti.

L'incidenza dei capezzoli soprannumerari varia da 25 a 68% nelle diverse razze bovine, con una media di 40-50%.



*Figura 1.11: Un esempio di capezzoli soprannumerari. I tre capezzoli in eccesso e non funzionanti sono allineati posteriormente ai capezzoli normali di ciascuna metà mammaria. I capezzoli in eccesso si sono formati in corrispondenza della linea mammaria nelle fasi iniziali della vita embrionale ma non hanno dato luogo alla formazione di tessuto mammario funzionante. Le due metà mammarie sono divise dal solco intermammario (freccie). (Da Schalm et al., 1975).*

I capezzoli si aprono all'esterno attraverso l'orifizio capezzolare. L'orifizio capezzolare è circondato

da anelli muscolari che impediscono la fuoriuscita del latte e fungono da barriera alla penetrazione batterica.

Lo sfintere del capezzolo deve essere sufficientemente elastico in quanto l'elevata frequenza di sollecitazioni a cui è sottoposto durante la mungitura (120-150 aperture) provoca l'affaticamento delle fibre muscolari.

L'affaticamento delle fibre muscolari comporta che alla fine della mungitura non si ha la completa chiusura dell'orifizio pertanto è facilitato l'ingresso dei batteri.

L'errata mungitura (ad es. elevato livello del vuoto e fenomeni di sovramungitura) può causare:

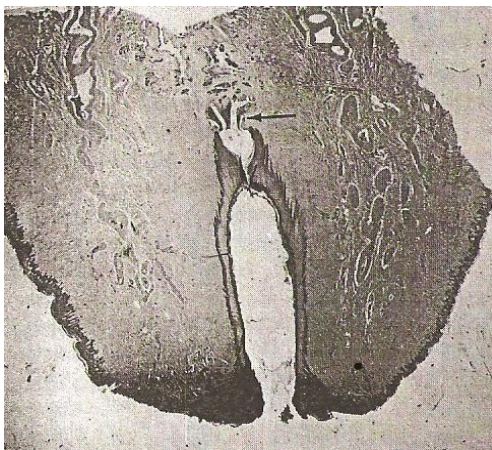
- Formazioni collose nell'orifizio capezzolare
- Ruvidezza
- Ipercheratosi e edema
- Lesioni

## **1.6 Il dotto papillare**

Lo stretto canale situato all'estremità del capezzolo è denominato dotto papillare o, più comunemente, canale striato (Figura 1.12). Esso solitamente è lungo 8-12 mm, ma può variare tra 5 e 13 mm (*Johnston et al., 1938*). Spesso il canale striato non presenta un diametro uniforme per tutta la sua lunghezza, varia tra 4 e 11 mm. Sia la lunghezza che il diametro interno aumentano con il progredire del numero delle lattazioni (*Carlo et al., 1964*). In condizioni normali, il canale striato presenta alcune strutture anatomiche che fungono da barriera alla penetrazione di microorganismi. L'efficienza di tali strutture appare massima alla prima lattazione e si affievolisce gradualmente in quelle successive, come può essere indicato dall'aumento di incidenza di infezioni mammarie in rapporto all'età. Il rivestimento interno del canale striato è costituito da epitelio pavimentoso stratificato ed in questo rassomiglia alla struttura della cute del capezzolo. La specifica disposizione di questo epitelio stratificato dà luogo alla formazione di pliche che possono collabire fra loro per contrazione del muscolo sfintere. Gli strati più superficiali dell'epitelio subiscono un continuo processo di cheratinizzazione dal quale deriva del materiale di tipo sebaceo, che si distacca e riempie il lume del canale. Quest'ultimo materiale contiene acidi grassi a lunga catena di elevata concentrazione, che potrebbero agire come batteriostatici nei confronti di alcuni batteri patogeni. E' pertanto probabile che essi impediscano, in condizioni normali, la sopravvivenza e la moltiplicazione di batteri eventualmente penetrati nel canale striato (*Adams et al., 1963*). Quest'ultimo, infine, termina in una serie di pliche, dette "rosette di Furstenberg" (Figura 1.13) la cui funzione potrebbe essere quella di trattenere il latte, connettendosi fra di loro, nell'intervallo fra due mungiture (*Pounden et al., 1950*).

La tecnica radiografica, applicata allo studio del canale del capezzolo, non consente di osservare le rosette di Furstenberg in funzione (McDonald, 1968).

Il canale striato è circondato da un vero sfintere, costituito da un muscolo liscio, deposto in senso longitudinale e aderente al rivestimento epiteliale, avvolto da uno strato più profondo costituito da fibre circolari. Un capezzolo viene indicato come beante, quando il muscolo sfintere risulta incapace di mantenere la chiusura ermetica del canale. I fatti indicano che esiste la disposizione ad una maggiore incidenza di infezioni mammarie in quei quartieri che hanno il canale del capezzolo beante (Murphy, 1944). L'età ed i traumi della mungitura possono dar luogo ad una minore efficienza del canale striato come barriera nei confronti dei microorganismi. La sensibilità all'infezione sperimentale di quartieri esposti all'azione di microorganismi patogeni è apparsa come un carattere individuale della bovina (Murphy, 1954). La resistenza all'infezione batterica di un quartiere mammario viene forse determinata in maggiore misura dalla struttura e dalla funzione del canale striato.



*Figura 1.12: Immagine a piccolo ingrandimento dell'estremità del capezzolo e del canale striato. Il rivestimento epiteliale squamoso stratificato del canale striato termina in corrispondenza delle rosette di Furstenberg (freccia) dove l'epitelio è costituito da due strati di cellule. In questa immagine il canale è abbondantemente dilatato come conseguenza del metodo impiegato per la conservazione della mammella. (Da Schalm et al., 1975).*



*Figura 1.13: Sezione a livello delle rosette di Furstenberg, all'altezza dell'estremità dorsale del canale striato. Si rileva il brusco passaggio dell'epitelio squamoso stratificato all'epitelio a doppio strato di cellule. In corrispondenza della zona della rosetta si rileva la presenza delle ghiandole accessorie costituite da strutture alveolari (freccia). (Ingrandimento dell'illustrazione 1.12) (Da Schalm et al., 1975)*

## 1.7 Il seno papillare

La cisterna del capezzolo (*sinus papillaris*) è rivestita da un epitelio a doppio strato di cellule e la topografia della sua superficie è estremamente variabile (*Johnston et al., 1938*). La superficie della cisterna del capezzolo può essere essenzialmente liscia, essendo sprovvista di pliche o di estroflessioni, oppure si possono osservare pliche longitudinali, creste trasverse o circolari, introflessioni o tasche (Figura 1.10). La cisterna del capezzolo è la cavità dentro al capezzolo ed è appena al di sotto della cisterna della mammella. Le cisterne del capezzolo e della mammella sono continue; in molte bovine definiscono una costruzione circolare, la piega anulare, è localizzata tra le due cavità. Questa è composta da denso tessuto connettivo ed è larga 2-6 mm. In casi eccezionali al punto di fusione tra le cisterne del capezzolo e della mammella, può essere presente una plica anulare che è appena percepibile oppure fortemente rilevata e, in quest'ultimo caso, impedisce la comunicazione tra le due cavità. Se ciò si verifica, si rende necessario l'intervento chirurgico allo scopo di perforare la membrana e di consentire il flusso di latte verso la cisterna del capezzolo. Un'altra anomalia, che si osserva raramente, è costituita dalla divisione a metà della cavità in due compartimenti, di dimensioni uguali o diverse, da parte di una membrana longitudinale. Per giustificare questa anomalia si potrebbe chiamare in causa lo sviluppo di due abbozzi primari, all'inizio della genesi embrionale del capezzolo. La cisterna del capezzolo è foderata da numerose pieghe longitudinali e circolari nella mucosa. Queste tendono a sovrapporsi alle altre formando una tasca al lato del capezzolo che può diventare luogo di stoccaggio di batteri. La superficie della cisterna del capezzolo, così come quella della cisterna mammaria, può presentare dei rilievi di tipo verrucoso che, istologicamente, appaiono come strutture lobulo-alveolari denominate ghiandole accessorie.

L'epitelio di rivestimento, normalmente costituito da due strati di cellule, può in alcuni casi risultare di tipo squamoso in corrispondenza delle creste e delle pliche (*Arnold, 1950*). Questa modificazione delle cellule superficiali di rivestimento potrebbe rappresentare una reazione ad eventuali traumi di mungitura.

Infatti, l'epitelio della cisterna del capezzolo ed i sottostanti tessuti possono reagire a tali traumi attraverso la formazione di tessuto cicatriziale. Quest'ultimo, se circoscritto, può provocare la formazione di un'escrescenza che si proietta nel lume ostacolando il flusso del latte, oppure, in caso di traumi gravi, può ostruire l'intera cavità del capezzolo. In questo caso l'epitelio, costituito normalmente da due strati di cellule, diviene pavimentoso stratificato e dà luogo a numerose proiezioni di tipo papillomatoso, mentre lo stroma sottostante va incontro ad estesa fibrosi.

### **1.8 Il seno lattifero** [Da Schalm et al., 1975]

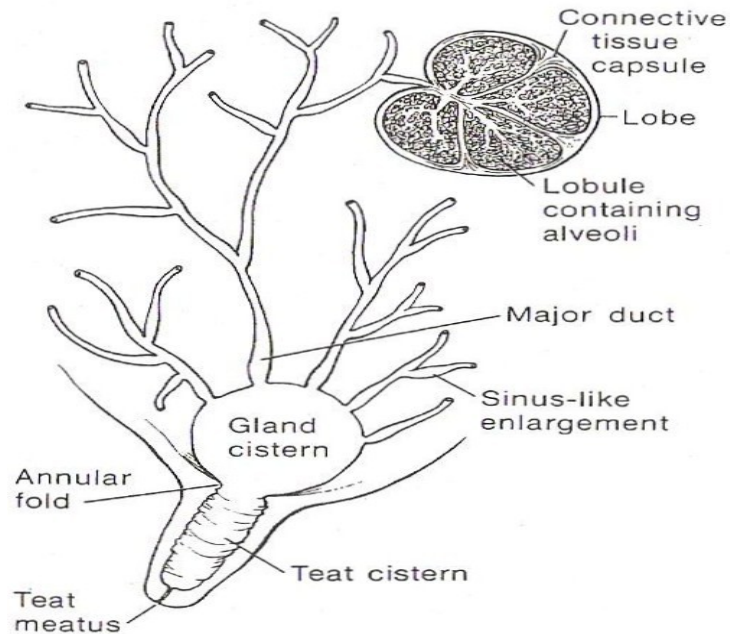
La cisterna mammaria o cisterna della ghiandola (*sinus lactiferus*) appare estremamente variabile per dimensione e forma. La capacità della cisterna varia da 100 a 400 g di latte, ma non vi è relazione tra la grandezza della cisterna e la quantità di latte secreto dai quarti.

Essa può essere costituita da un'unica grossa cavità, oppure essere suddivisa in seni secondari per mezzo di pliche provenienti dalla parete della cisterna stessa. L'epitelio è costituito da due strati di cellule e da lobuli isolati di tessuto secretori che, essendo situati al di sotto dello strato superficiale, danno luogo alla formazione di rilevatezze di aspetto verrucoso (Figura 1.10). Un certo numero di grossi dotti, variabile da 8 a 12, si diparte dalla cisterna mammaria per seguire il contorno esterno del quartiere corrispondente, estendendosi verso l'alto e curvandosi verso l'indietro in continuità con la maggior parte del parenchima ghiandolare. Nella regione della cisterna, questi grossi dotti presentano numerose ramificazioni che vanno a formare un reticolo di piccoli dotti, ciascuno dei quali richiede una notevole massa di tessuto di sostegno. I dotti sono rivestiti da epitelio costituito da due strati di cellule e la corrispondente parete contiene sia muscolatura liscia che tessuto elastico.

Tuttavia le fibre muscolari non sono disposte in modo da agire come sfinteri.

## 2. ISTOLOGIA E CITOLOGIA DELLA GHIANDOLA

### MAMMARIA [Schmidt, 1971]



*Figura 2.1: Rappresentazione del sistema dei dotti di un quarto di mammella bovina. La ghiandola mammaria è composta da molti lobi. I lobi contengono lobuli i quali a loro volta contengono gli alveoli, il tessuto secretorio; solo un lobo è mostrato. (Da Schmidt, 1971)*

#### 2.1 Gli alveoli

La componente base del tessuto secretorio è l'alveolo. Ogni alveolo è circa sferico ed è composto da un singolo strato di cellule epiteliali che circondano il lume.

Le cellule epiteliali poggiano sulla membrana basale (membrana propria), la quale può essere definita in una sezione istologica, ma è più chiaramente visibile al microscopio elettronico. Il latte dalle cellule epiteliali è secreto nel lume dell'alveolo ed è drenato da piccoli dotti a dotti intercalari. Questi dotti aderiscono a diversi dotti intralobulari che trasportano il latte all'esterno del lobulo, il quale è formato da un gruppo di alveoli (Figura 2.1).

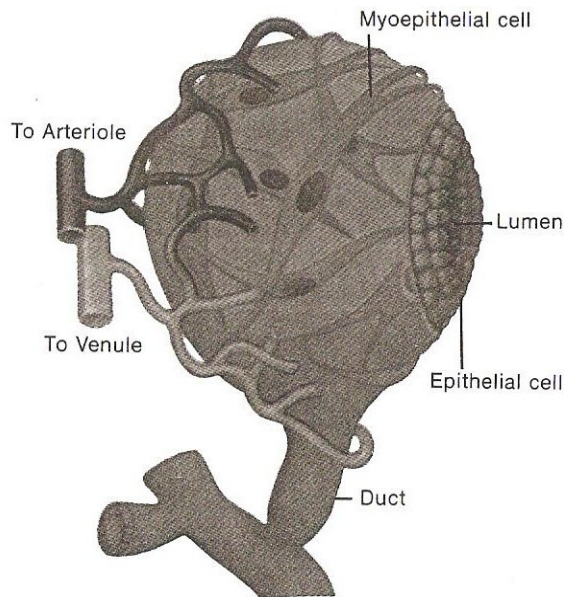
Le cellule mioepiteliali sono localizzate tra la membrana basale e le cellule epiteliali.

L'attività dell'ossitocina causa in queste cellule specializzate l'eiezione del latte dal lume dell'alveolo. Le cellule mioepiteliali sono prive di granuli lipidici e sono fosfato alcaline positive.

Tutti gli alveoli (Figura 2.2) sono circondati da capillari che li riforniscono di sangue contenente i precursori del latte.

Le vene drenano il sangue dagli alveoli e lo riportano nella circolazione venosa generale. L'alveolo è raramente circondato da tessuto connettivo. Le sole membrane che separano l'alveolo all'interno del lobulo sono le arteriole, le venule, e la membrana propria.

Le cellule epiteliali all'interno dell'alveolo sono solitamente di forma colonnare quando nel lume non c'è secrezione o è molto limitata. Quando il lume si riempie di latte, l'alveolo si estende, a causa delle cellule epiteliali che si appiattiscono.



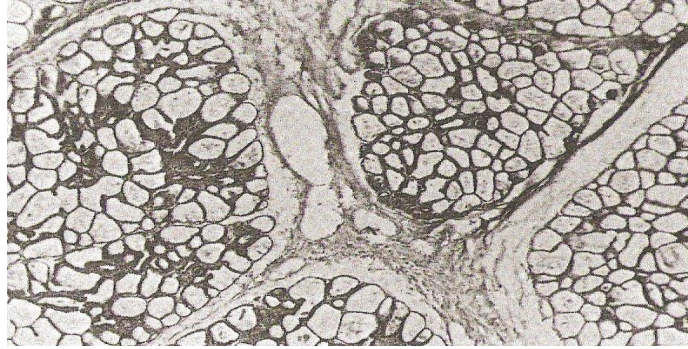
*Figura 2.2: Rappresentazione di un alveolo e la sua fornitura di sangue. (Da Morrow and Schmidt, 1964)*

## **2.2 I lobuli e i lobi**

Gruppi di alveoli sono localizzati in unità funzionali, chiamate lobuli (Figura 2.3), i quali sono drenati da dotti comuni ed incapsulati da tessuto connettivo.

Una serie di lobuli aderisce assieme dando origine al lobo, il quale è drenato da un grande dotto e circondato da una larga capsula di tessuto connettivo.

Nella bovina il tessuto connettivo appare bianco perlato e il tessuto secretorio è di color carne o giallo-arancio. Queste piccole differenze possono essere viste a occhio nudo in una sezione di ghiandola mammaria. Non è vero che i vasi linfatici nel tessuto connettivo circondano i piccoli lobuli. I setti del tessuto connettivo interlobulare hanno occasionalmente fasci di muscoli lisci sparsi irregolarmente e anche alcune cellule muscolari lisce isolate. Questi muscoli raramente entrano in contatto con lo strato esterno degli alveoli nel lobulo.



*Figura 2.3: Alveoli della ghiandola mammaria organizzati in lobuli e circondati da capsule di tessuto connettivo. (Da Schmidt, 1971.)*

### **2.3 I dotti**

I lobi si connettono a dotti che a loro volta drenano in dotti più larghi, i quali si uniscono ed entrano nella cisterna della ghiandola sopra al capezzolo. Il sistema dei dotti e la cisterna della ghiandola trasportano il latte dal tessuto secretorio ai capezzoli, il latte viene liberato dalla macchina mungitrice, dalla mano o dal vitello. Questo permette alla mammella di secernere un grande volume di latte il quale è stoccato solo nel tessuto secretorio.

La presenza di lobi e lobuli e dei loro dotti porta all'identificazione di dotti intralobulari (dentro al lobulo), dotti interlobulari (tra i lobuli), dotti intralobari (dentro ai lobi), e dotti interlobari (tra i lobi).

Il rivestimento dei dotti dipende dalla loro localizzazione nella ghiandola mammaria. I dotti larghi nella porzione inferiore dei quarti anteriori sono concentrati sulla superficie laterale, mentre la distribuzione dei dotti è più uniforme nella parte superiore dei quarti anteriori e nei quarti posteriori. I dotti larghi hanno la tendenza ad essere corti e ampi e i dotti piccoli ad essere più arrotondati. Solitamente da 10 a 12 dotti portano nella cisterna della ghiandola, ma possono essere anche 20, e in rari casi anche di numero maggiore. I dotti piccoli, gli intercalari e i dotti intralobulari consistono in una membrana basale con un rivestimento di cellule epiteliali colonnari che danno al lume del dotto una distinta apparenza arrotondata.

L'altra superficie della membrana basale è circondata da cellule mioepiteliali. I dotti interlobulari hanno la stessa struttura e l'apparenza generale dei dotti intralobulari tranne che la loro struttura luminare non è arrotondata per la presenza di pieghe longitudinali.

I dotti larghi differiscono dai piccoli dotti perché hanno due o più strati di cellule nel loro rivestimento. Uno strato di cellule cuboidali restano sulla membrana basale e queste sono coperte da uno strato interno di cellule colonnari.



I dotti con due strati di rivestimento sono incapaci di secernere latte.

#### **2.4 Il capezzolo e la cisterna della ghiandola**

Il capezzolo e la cisterna della ghiandola, come nei dotti larghi, sono foderati da due strati di epitelio. Lo strato profondo è composto da cellule cubiche e lo strato superficiale è composto da cellule cilindriche. Queste cellule restano sullo strato di tessuto connettivo libero. Un misto di fibre muscolari sono predominanti in questa area ed è presente qualche fibra muscolare longitudinale. Alcune piccole ghiandole accessorie sono situate nella cisterna della ghiandola le quali sono spesso situate nella parete della cisterna e hanno l'apparenza generale di lobuli di tessuto secretorio. Le ghiandole accessorie sono fatte da piccole strutture simili ad alveoli con un lume e un singolo strato di cellule cubiche che sono incorporate nella tunica propria. Le grandi ghiandole accessorie hanno un dotto foderato da due strati epiteliali che conducono al capezzolo.

La cisterna del capezzolo è foderata da due strati di epitelio che restano sopra la membrana propria del tessuto connettivo ondulato. Questo è distinto dalla più profonda tunica propria per la mancanza di cellule nella membrana propria. Le rosette di Furstenburg nella bovina sono coperte con dell'epitelio come quelle della cisterna del capezzolo.

#### **2.5 I capezzoli-rivestimento epiteliale, muscoli, e strutture**

L'epitelio che riveste il capezzolo è simile all'epidermide della pelle del capezzolo eccetto per lo strato corneo del meato del capezzolo che è molto più spesso. All'interno della ghiandola mammaria c'è una transizione da epitelio multistrato che riveste il meato del capezzolo a epitelio a singolo strato che riveste il lume dell'alveolo. Il materiale che riveste il canale del capezzolo è cheratina, la quale gioca un ruolo importante nella prevenzione dell'entrata di batteri causanti mastiti. La linea sotto la cheratina nei meati del capezzolo è come quella dell'epidermide.

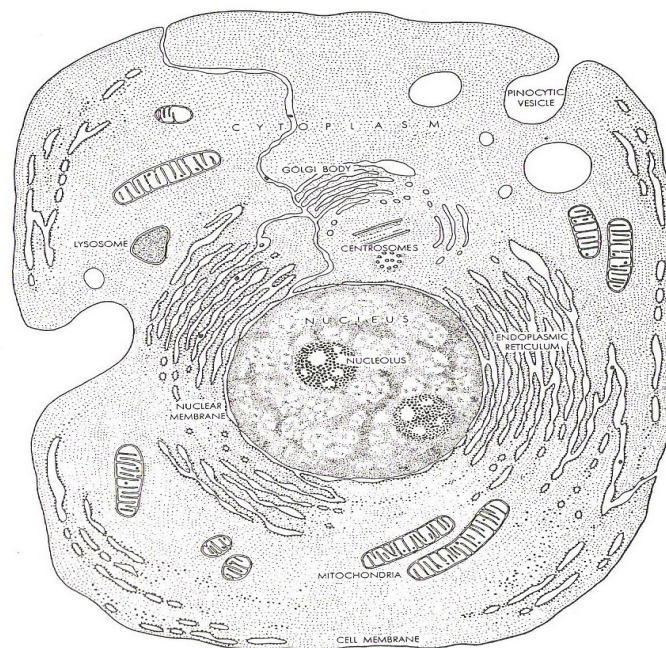
Le componenti del muscolo del capezzolo della bovina sono di due tipi: muscoli interni longitudinali, situati sotto l'epitelio delle eminenze papillari, sono abbondanti e sono situati in piccoli fasci, sovrapposta su questi, è la linea circolare di fibre muscolari che attraverso il muscolo sfintere mantiene il meato del capezzolo chiuso. Questo sfintere è tenuto chiuso da una costante tensione dell'impulso del nervo del sistema nervoso simpatico.

#### **2.6 La citologia della ghiandola mammaria**

Le cellule epiteliali sono simili a molte altre cellule che si trovano nel corpo, avendo simili organelli e componenti strutturali come le altre cellule (Figura 2.4). La cellula epiteliale è circondata dalla membrana plasmatica che è tra 75 e 100 Å di larghezza.

La membrana plasmatica ha un numero di pori, carrier, e pompe di energia dai quali il citoplasma all'interno della cellula comunica con l'ambiente esterno. Ogni cellula epiteliale ha un nucleo che ha un diametro di 5-7 micron. Le proteine sono sintetizzate all'interno dei ribosomi del reticolo endoplasmatico. La sintesi delle proteine si muove dal lume del reticolo endoplasmatico all'apparato del Golgi, dal quale sono rilasciate nel lume degli alveoli.

Micrografie elettroniche hanno mostrato il rilascio di goccioline di lipidi e proteine dalle cellule epiteliali mammarie. Goccioline di proteine sono racchiuse in lisce vescicole allineate che migrano attraverso l'apice della cellula e poi si aprono sulla superficie cellulare, rilasciando delle goccioline nel lume senza rotture della membrana plasmatica. Le particelle di lipidi si uniscono per dare gocce più grandi che migrano dalla base all'apice della cellula. Durante il rilascio della goccia lipidica nel lume degli alveoli, la membrana plasmatica stringe al di sotto la goccia lipidica; e si uniscono per prime le gocce che sono state rilasciate nel lume. In questo modo, il citoplasma non è esposto al lume.



*Figura 2.4: Rappresentazione di una tipica cellula (Da Brachet, 1961).*

### 3. SVILUPPO DELLA GHIANDOLA MAMMARIA

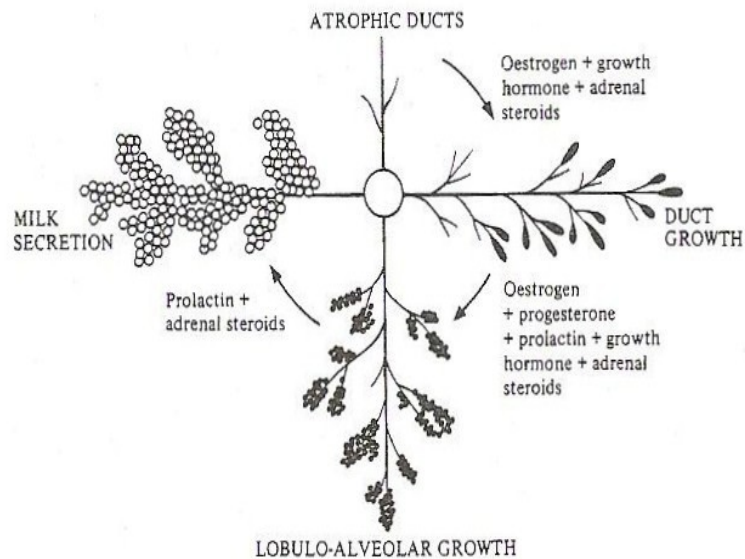


Figura 3.1: Gli ormoni coinvolti nella crescita della ghiandola mammaria e nella iniziazione della secrezione del latte (Da Cunningham, 2002)

#### 3.1 Le fasi della lattazione [Da Sherwood et al., 2006]

- **Mammogenesi:** il termine indica la variazione del volume del parenchima mammario, la modificazione delle caratteristiche istologiche, il controllo endocrino dall'embrione fino alla nascita del nuovo individuo e al suo sviluppo. Essenziali in questa fase sono l'estradiolo e il progesterone.
- **Lattogenesi:** indica l'inizio della lattazione, consiste nel controllo endocrino del differenziamento cellulare e nella sintesi dei principali componenti del latte. Inizia 4-6 giorni prima del parto e generalmente termina 4 giorni dopo il parto. Importanti in questa fase sono l'estradiolo, la prolattina, i glucocorticoidi e l'ormone della crescita.
- **Galattopoiesi:** indica il mantenimento della lattazione. Inizia dopo il parto e prosegue fino all'inizio del periodo di asciutta. Importante in questa fase è il controllo ormonale e la rimozione del latte. L'estradiolo, la prolattina e i glicocorticoidi sono fondamentali durante la galattopoiesi.

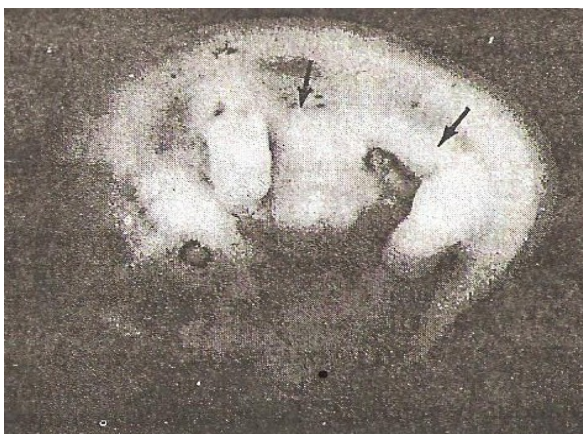
##### 3.1.1 Lo sviluppo prenatale della ghiandola mammaria della bovina

La prima crescita mammaria nel feto si presenta come un'area di ectoderma sollevata da entrambi i

lati della linea mediana nella regione inguinale. Quando quest'area di ectoderma si restringe si parla di banda mammaria. La banda si restringe ulteriormente a formare la linea mammaria. Le gemme mammarie si sviluppano lungo la linea mammaria e corrispondono al numero di ghiandole mammarie e ghiandole accessorie. Le gemme sono formate dalla congregazione di cellule della linea mammaria in una collezione definita di cellule di ectoderma a formare un nodulo epiteliale. Le gemme mammarie inoltre scendono nel mesenchima a formare il sistema secretorio e i dotti della ghiandola mammaria. La gemma della ghiandola mammaria è prima lenticolare, poi emisferica, e alla fine di forma sferica (Raynaud et al., 1961).

[Da Schalm et al., 1975]

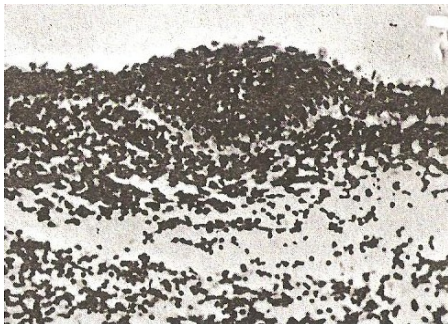
- La linea mammaria: I primi segni dello sviluppo mammario si osservano durante il primo mese di vita dell'embrione e consistono in un singolo strato di cellule cuboidali che si formano dall'ectoderma e si differenziano dalle sottostanti di tessuto mesenchimale. Lo strato di cellule appiattite forma la banda mammaria nella regione inguinale. La formazione della linea mammaria avviene circa alla quarta o quinta settimana di vita fetale e costituisce una struttura già visibile macroscopicamente in embrioni di lunghezza compresa fra 1,5 e 1,9 cm; appare sotto forma di una banda biancastra che, in entrambi i lati, va dalla radice degli arti anteriori a quella degli arti posteriori (Figura 3.2). L'epidermide primitiva (cute) è costituita da due strati di cellule piatte, fatta eccezione per la regione corrispondente alla linea mammaria che, in corrispondenza della cresta, può presentare sei strati di cellule, i quali diminuiscono di numero da entrambi i lati fino al punto in cui si verifica la fusione con la normale epidermide a due strati.



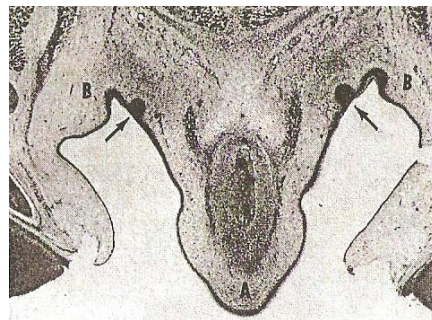
*Figura 3.2: Embrione bovino di 1,7 cm di lunghezza. La linea mammaria (freccie) appare come una linea bianca situata tra le gemme degli arti anteriori e posteriori. La maggiore opacità della cute primitiva presente in questa zona costituisce il risultato della formazione di una banda di cellule epidermiche pluristratificate (Da Schalm et al., 1975).*

- La cresta, il disco prolifero e la gemma mammaria: evolvono l'uno verso l'altro, si riscontrano fin da quando l'embrione ha raggiunto la lunghezza di 1,7 cm e possono

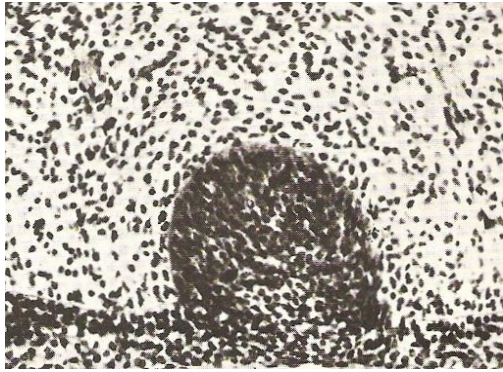
completare la propria evoluzione dalla cresta alla gemma, quando l'embrione raggiunge la lunghezza di 3,0 cm. La cresta mammaria è una struttura biconvessa, a forma di disco, che compare all'intero della linea mammaria, nel punto che sarà in futuro occupato da ciascun capezzolo (figura 3.3), e il numero corrisponde a quello degli stessi, essendo uguale o superiore alla norma a seconda che esistano o meno capezzoli soprannumerari. La porzione rimanente della linea mammaria è inerte e le corrispondenti cellule pluristratificate possono fondersi con i nuovi strati di cellule epidermiche della cute embrionale in via di sviluppo. La cresta mammaria, a forma biconvessa, si espande per proliferazione delle proprie cellule e si invagina dando luogo ad una struttura indicata come *disco prolifero*, dal quale si forma una gemma mammaria cupuliforme (figura 3.4). Pertanto la primordiale ghiandola mammaria è di derivazione ectodermica e le mammelle sono quindi di origine cutanea. Nello studio della gemma mammaria l'ectoderma penetra per proliferazione nello spazio corrispondente al primitivo mesenchima, ma i due tipi di cellule restano nettamente separati per la presenza di una membrana basale chiaramente definita (Figura 3.5). Dal mesenchima derivano i vasi sanguigni, i nervi ed il tessuto di sostegno, mentre l'ectoderma continua ad invaginarsi ed a formare le cisterne ed i dotti primitivi della ghiandola prenatale.



*Figura 3.3: Sezione trasversa della regione inguinale di un embrione bovino di 2 cm. Ingrandimento della cresta mammaria. (Da Schalm et al., 1975)*

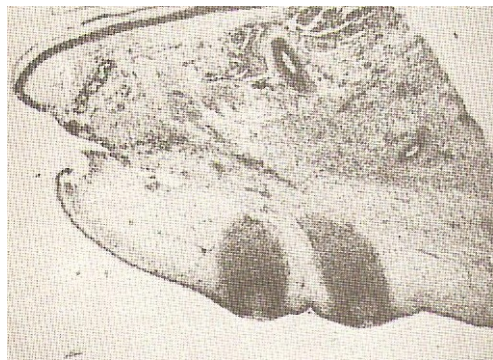


*Figura 3.4: Sezione trasversa della regione inguinale di un embrione bovino di 3,8 cm. Una gemma mammaria (frecce) compare in entrambi i lati alla base del tubercolo genitale (A) in prossimità dell'attacco mediale dell'arto posteriore (B). (Da Schalm et al., 1975)*

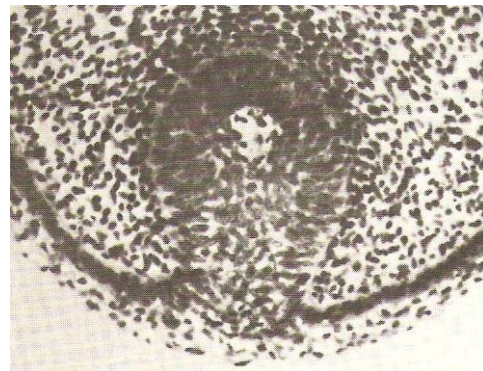


*Figura 3.5: Gemma mammaria ingrandita della figura 3.4 (Da Schalm et al., 1975)*

•L'evaginazione dei capezzoli: avviene durante il secondo, terzo mese di vita embrionale ma questo stadio può avere inizio fin da quando l'embrione raggiunge la lunghezza di 3,0 cm ed appare chiaramente definito ad 8,0 cm. L'evaginazione del capezzolo primitivo sembra verificarsi in conseguenza di una pressione sulla gemma provocata dall'attiva proliferazione delle cellule mesenchimali circostanti (Figura 3.5). Si osserva in tal modo una sorta di competizione per lo spazio disponibile, che spinge la gemma mammaria verso l'esterno dove si forma una papilla conica o capezzolo primitivo. Durante tale periodo di evaginazione, nella femmina si forma un "corpo ghiandolare" ben definito (Figura 3.6), mentre nel maschio esso assume soltanto un'estensione limitata (Figura 3.7). Tale differenza di volume del corpo ghiandolare rimane come un aspetto distintivo dello sviluppo della ghiandola nei due sessi.



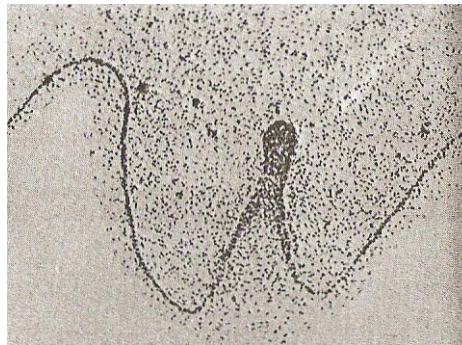
*Figura 3.6: Lato destro di una sezione sagittale di una mammella in via di sviluppo, appartenente ad un embrione bovino femmina di 10,5 cm. (Da Schalm et al., 1975)*



*Figura 3.7: Sezione sagittale di una metà di mammella in via di sviluppo di un embrione bovino, maschio di 9,5 cm. (Da Schalm et et al., 1975)*

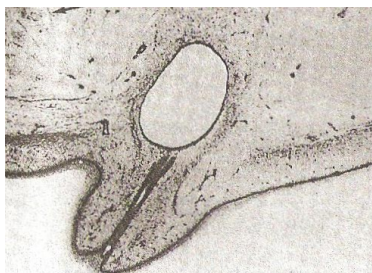
•Il primo abbozzo mammario: la gemma mammaria si allunga e le corrispondenti cellule centrali e

distali si corneificano, mentre quelle che costituiscono il margine dorsale proliferano, dando luogo alla formazione di una struttura cilindrica provvista di un piccolo rigonfiamento terminale (Figura 3.8). Lo sviluppo verso l'alto dell'abbozzo mammario inizia quando l'embrione è lungo circa 12,0 cm e tale processo appare completo nei feti di 17,0-19,0 cm di lunghezza. Allo stesso tempo si vanno formando i primitivi vasi sanguigni all'interno del mesenchima che circonda l'abbozzo mammario. Raramente, nel feto bovino, si osserva la formazione di due abbozzi mammari a partire da una singola gemma mammaria; in questo caso si verifica un'anomalia dell'adulto, rappresentata dalla suddivisione della cavità del capezzolo in due cisterne di volume uguale o diverso.



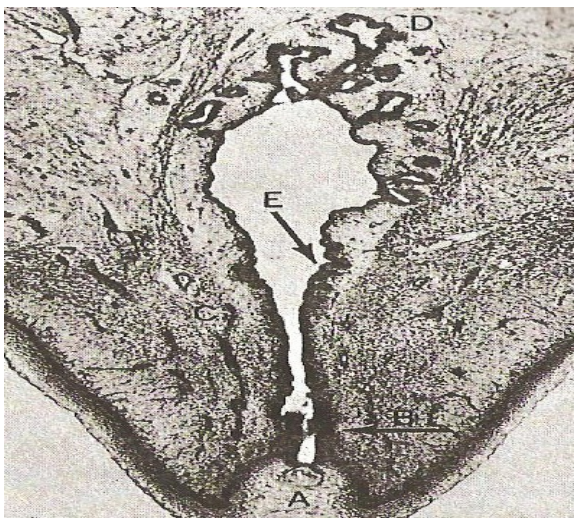
*Figura 3.8: Formazione dell'abbozzo primario dal margine superiore di una gemma mammaria in via di sviluppo di un embrione bovino di 9,5 cm. (Da Schalm et al., 1975)*

- Canalizzazione della gemma mammaria e formazione delle cisterne del capezzolo e della ghiandola: la canalizzazione della gemma mammaria si può osservare in feti di 17,0-21,0 cm di lunghezza e si completa generalmente quando essi raggiungono la lunghezza di 23,0 cm. (Figura 3.9). Lungo la linea centrale della gemma si apre una fenditura, alla cui formazione fa seguito un moto di allontanamento delle cellule dalla zona centrale alla fenditura stessa. La separazione delle cellule che costituiscono l'abbozzo mammario risulta massima nella metà dorsale, ove si forma un'ampia cisterna cavernosa della ghiandola mentre, nel capezzolo, la cisterna appare più stretta e tubulare.



*Figura 3.9: Canalizzazione della gemma mammaria e formazione della cisterna della ghiandola in un feto bovino femmina di 19 cm. (Da Schalm et al., 1975)*

•Gli abbozzi mammari secondari: in numero di 10-12, essi si sviluppano dalla parte della cisterna della ghiandola subito dopo il completamento della canalizzazione (Figura 3.10). Questi abbozzi secondari diventeranno i dotti galattofori, destinati al trasporto del latte secreto dalla ghiandola matura, verso la cisterna. Altri abbozzi di limitato sviluppo si formano dalla cisterna del capezzolo e delle porzioni inferiori della parete della cisterna mammaria. Questi ultimi, nella mammella matura, costituiranno i così detti lobuli accessori. A loro volta, gli abbozzi secondari danno luogo ad ulteriori proliferazioni verso l'esterno che è il primitivo sistema dei dotti che continua a formarsi fino alla nascita del vitello. A questo punto tale sistema è localizzato solo esclusivamente in corrispondenza della regione del corpo della mammella adiacente alla base del capezzolo.

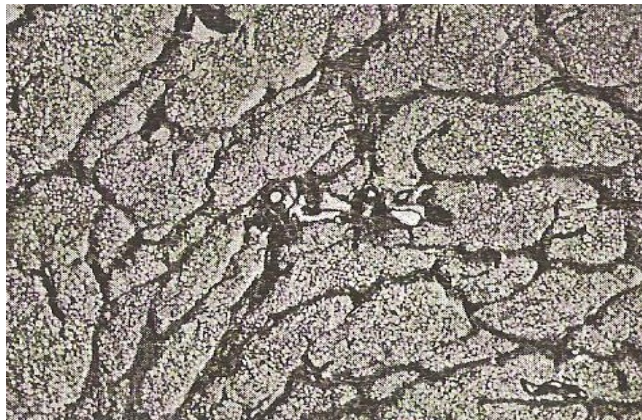


*Figura 3.10: Sezione di ghiandola mammaria di feto bovino di 31 cm. La punta del capezzolo ricorda chiaramente l'originaria gemma mammaria (A) che è completamente cornificata e chiude la ghiandola. Subito al di sopra della gemma mammaria si osserva un breve canale rivestito di un epitelio pluristratificato. E' questo il primitivo canale striato (freccia B). Un muscolo sfintere liscio si formerà intorno al canale striato per regolarne l'apertura e la chiusura della ghiandola matura. Si è iniziata la formazione del plesso vascolare della parete del capezzolo (C). Esso darà luogo all'erezione del capezzolo durante la mungitura. Abbozzi secondari canalizzati (D) si dipartono dalla cisterna della ghiandola dirigendosi verso l'alto. Sono presenti altri piccoli abbozzi alla congiunzione fra le cisterne del capezzolo e della ghiandola (E). Questi ultimi, nella ghiandola matura, formeranno le ghiandole accessorie in corrispondenza della parete delle cisterne del capezzolo e della mammella. (Da Schalm et al., 1975)*

•Differenziazione del corpo della ghiandola: la differenziazione delle strutture mesenchimali facenti parte del corpo della ghiandola inizia in feti di circa 13,0 cm di lunghezza e continua per



tutto il resto della gestazione. La cute ed il tessuto sottocutaneo formano una stretta fascia che avvolge la mammella in via di sviluppo. Verso la fine del 4° mese di gestazione, sulla cute di rivestimento cominciano a formarsi follicoli piliferi, che però non compaiono in corrispondenza della cute del capezzolo. Il tessuto sottocutaneo (tela sottocutanea) in via di differenziazione, si dirige verso l'alto oppure si continua con lo stroma in via di sviluppo situato intorno alla cisterna mammaria ed agli abbozzi secondari. Alla fine del 4° mese, la massa ghiandolare si presenta come un tessuto molto lasso, intersecato da un delicato stroma di connettivo primordiale e da capillari primitivi. Cellule, riunite in ammassi di forma sferica, si formano in tutto lo spessore di tale tessuto lasso e si differenziano in isole di grasso. Per tutto il rimanente periodo della gestazione, queste ultime vanno a sostituire gradualmente il mesenchima primitivo emettendo delle espansioni periferiche. Alla nascita, il capezzolo è ben sviluppato e si vedono i profili definiti del capezzolo e della cisterna della ghiandola. Il sistema vascolare di base, come anche il sistema linfatico, è comparabile a quello nella mammella matura. La pelle e anche i peli che coprono la mammella sono comparabili a quelli in un adulto. Il tessuto adiposo e il tessuto connettivo costituiscono distinti cuscinetti adiposi o cuscini circondati da setti di tessuto connettivo (Figura 3.11).



*Figura 3.11: Porzione del corpo della ghiandola di una vitella alla nascita. Tale architettura permane fino a quando non viene sostituita, nella ghiandola matura, dai dotti e dagli alveoli secernenti. Gli isolotti di cellule adipose rappresentano i futuri lobuli e lo stroma di tessuto connettivo trasporterà vasi, nervi e dotti, all'interno dei lobuli adiposi man mano che si sviluppa il sistema lobulo-alveolare sotto l'influenza degli ormoni sessuali durante i cicli estrali nella manza vergine e, in seguito, durante la gravidanza. (Da Schalm et al., 1975)*

### 3.1.2 Sviluppo mammario postnatale e fino alla pubertà

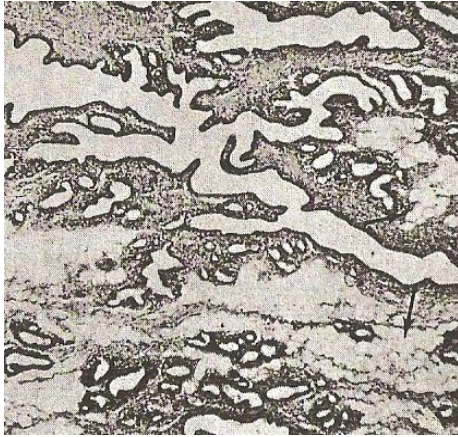
La crescita della ghiandola mammaria dalla nascita alla pubertà è dovuto maggiormente ad un aumento di tessuto connettivo e dalla deposizione di grasso nella mammella; tuttavia, ha luogo anche una limitata crescita del tessuto secretorio. Il cambiamento della mammella da crescita isometrica ad allometrica si verifica nelle bovine a 6-7 mesi di età. Questa misura si basa sul contenuto di DNA della ghiandola mammaria (un indicatore della proliferazione cellulare). Nelle vitelle, i dotti continuano a crescere ed assumono la forma di quelli che si trovano nella mammella matura. I quarti continuano a crescere di taglia, questo è parzialmente dovuto alla deposizione di tessuto adiposo, fino a quando i quarti anteriori e posteriori si avvicinano gli uni agli altri ed infine si uniscono alla base. Oltre ad un accrescimento in peso della mammella delle vitelle dalla nascita alla pubertà, c'è un accrescimento di capacità della mammella (*Turner, 1952*). La stima mediante palpazione dell'accrescimento della ghiandola mammaria dalla nascita a 6 mesi di età ha permesso di predire la produzione di latte nei futuri animali adulti. Un'alta correlazione è stata trovata tra l'aumento di crescita ghiandolare e la produzione di latte dell'animale maturo. Tuttavia, la correlazione non è risultata elevata, poiché anche l'ambiente gioca un ruolo importante nella produzione di latte della bovina. (*Legates et al., 1960*) (*Swett et al., 1955*). L'estradiolo svolge una funzione primaria nello stimolare lo sviluppo dei dotti lungo lo stroma di tessuto connettivo del corpo adiposo che costituisce il corpo della mammella immatura. Infatti, durante il periodo compreso fra la nascita e la pubertà, si osserva una relativa quiescenza nello sviluppo della ghiandola mammaria. Quando però le ovaie si avviano alla maturità, si osserva la produzione di estradiolo che provoca un certo incremento dei tessuti costituenti i dotti, situati intorno alla base del capezzolo.

A 4 mesi di età per le femmine di razza Jersey ed a 6 mesi per le Holstein, si possono rilevare notevoli differenze nella estensioni dei dotti. Tuttavia, dopo 6 mesi, le differenze individuali nello sviluppo del sistema dei dotti galattofori non sono più sufficientemente nette da consentire una effettiva selezione delle vitelle provviste di un potenziale ereditario alla produzione di latte.

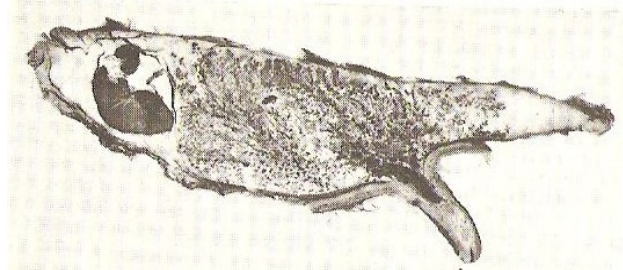
### 3.2.3 Sviluppo della ghiandola mammaria nella bovina adulta

Al momento della maturità sessuale l'immissione di estradiolo in circolo stimola l'accrescimento dei dotti nella ghiandola mammaria in via di sviluppo. Tale accrescimento è meno evidente durante l'anestro, tuttavia, l'ormone del corpo luteo, il progesterone, può svolgere una certa azione sui dotti consentendo forse uno sviluppo, sia pure molto limitato, delle cellule secretorie. Dopo molti cicli estrali si osserva che la trama dei dotti si è estesa a tutto il corpo adiposo (Figura 3.10) e, inoltre, che i dotti stessi sono dilatati e separati da un tessuto di sostegno bene evidente (Figura 3.11).

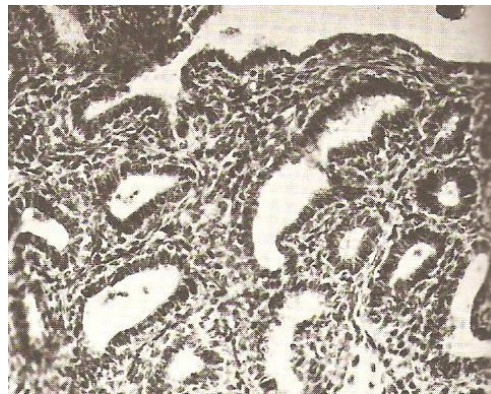
Le manze vergini possono secernere una piccola quantità di liquido (Turner, 1930) contenente tracce di lattosio, caseina e grasso (Hammond, 1927).



*Figura 3.12: Dimostrazione dell'entità dello sviluppo dei dotti nella mammella di una vitella di 6 mesi di età. Rimane da sostituire un notevole numero di cellule adipose (frecche) da parte del sistema dei dotti e dello stroma ancora in via di sviluppo. (Da Schalm et al., 1975 )*



*Figura 3.13: Sezione sagittale di una mammella di una manza vergine di 18 mesi di età. Colorata con ematossilina (Da Schalm et al., 1975).*



*Figura 3.14: Sezione istologica della zona della cisterna della ghiandola della figura 3.10 (Da Schalm et al., 1975).*

## 4. REGOLAZIONE ENDOCRINA DELLA BIOLOGIA MAMMARIA

### 4.1 La relazione tra il numero di cellule e la produzione del latte

Da molti anni è stata riconosciuta una positiva relazione tra le dimensioni della ghiandola mammaria e la produzione di latte (*Linzell, 1966*). Questo è semplice da dimostrare nelle capre, ma è meno evidente nelle bovine, perché è difficile ottenere dati affidabili sulle dimensioni delle loro mammelle. Tuttavia, per ottenere dei calchi di mammelle bovine, può essere usata una schiuma di poliuretano a presa rapida (*Dewhurst et al., 1993*): una tecnica relativamente semplice per misurare le dimensioni totali della mammella. Comparando diversi gruppi di animali, si è ottenuta una ragionevole relazione tra il volume delle mammelle, misurato in questo modo, e la produzione di latte, ma ulteriori calcoli hanno rilevato che si è sottostimata la taglia delle mammelle delle giovani manze e sovrastimata quella delle bovine più vecchie, molte delle quali possiedono mammelle pendule (*Knight and Dewhurst, 1994*).

Il volume della mammella è una misura grezza della massa di tessuto totale, e non è in grado di dare informazioni relative alle proporzioni di tessuto secernente e non secernente. Differenti tipi di tessuto possono essere distinti attraverso tecniche di analisi di immagine come i raggi-X, la tomografia computerizzata (CT), la scansione e la risonanza magnetica (MRI). La CT è stata usata per la scansione delle mammelle delle manze (*Sorensen et al., 1987*), e non c'è possibilità di usare altri metodi in vivo per le bovine da latte per il semplice fatto che sono molto grandi. Un approccio alternativo è quello di misurare la composizione del tessuto attraverso un'analisi biochimica o istologica, utilizzando delle biopsie mammarie, ottenibili mediante uno strumento bioptico (*Magnum; C. R. Bard, Covington, GA, USA*), che permette di ripetere le misurazioni con un disturbo relativamente piccolo per la bovina.

Se la produzione di latte è una funzione del numero di cellule epiteliali mammarie (*Knight, 2000*), si potrebbe utilizzare il contenuto di DNA della mammella (una misura altamente correlata con il numero di cellule) piuttosto che con il volume della mammella per predire la produzione di latte (*Kniht, 2000*). In uno studio più recente, tuttavia, si è osservato che tale relazione non è sempre vera, sebbene la relazione tra numero di cellule epiteliali mammarie e l'attività metabolica per cellula e la produzione di latte è stata confermata (*Knight., 2000*).

Per quanto esposto sopra, appare evidente che un aspetto della fisiologia mammaria importante per l'allevatore è sapere quando il numero di cellule epiteliali mammarie viene a determinarsi nella specie bovina.

Nel capitolo 3, abbiamo descritto le fasi di sviluppo della ghiandola mammaria, definite nel loro

insieme “mammogenesi”. Abbiamo osservato che ci sono due fasi distinte: la prima precede il concepimento, mentre la seconda è rappresentata dalle ondate cicliche di proliferazione, secrezione ed involuzione durante i ricorrenti cicli di lattazione. La parte più importante della prima fase è la crescita allometrica, che si osserva attorno alla pubertà. Senza un appropriato sviluppo mammario in questa fase, ci potrebbero essere delle ripercussioni a lungo termine sulla produzione del latte (Sejrsen, 1994). Si è osservato, infatti, che le manze, che raggiungono troppo presto la pubertà, spesso hanno una produzione di latte ridotta.

#### **4.2 Il ruolo degli ormoni “classici” nello sviluppo mammario**

Gli ormoni correlati con lo sviluppo della mammella sono:

- Ormoni ovarici: a) l'estradiolo è un estrogeno prodotto dalle ovaie, è un ormone steroideo, produce e mantiene i caratteri sessuali secondari femminili. A livello della mammella stimola la formazione dei dotti e anche limitatamente degli alveoli. L'estradiolo ad alte concentrazioni può provocare un anormale sviluppo lobulo-alveolare.
- b) Il progesterone è uno steroide ed è sintetizzato dalle ovaie e dal surrene. La sua azione principale, è permettere la creazione delle condizioni adatte alla fecondazione della cellula uovo e al suo annidamento nella mucosa uterina; a livello mammario modifica l'effetto stimolante dell'estradiolo provocando la formazione degli alveoli a partire dai dotti che si sono formati per lo stimolo indotto dall'estradiolo.
- Ormoni ipofisari: a) la prolattina (PRL) è un ormone polipeptidico prodotto dall'ipofisi anteriore, la sua secrezione è stimolata da crescenti livelli di estradiolo. La PRL esercita un'azione trofica a livello delle cellule e degli alveoli mammari, regola la crescita dei lobuli alveolari, promuove lo sviluppo della mammella e la secrezione del latte nelle femmine.
- b) Il GH o somatotropina è prodotto dall'ipofisi anteriore, è il principale responsabile della regolazione della crescita complessiva dell'organismo ed è importante anche nel metabolismo intermedio. Il GH promuove l'accrescimento dello scheletro e dei tessuti molli nei quali induce l'aumento del numero di cellule (iperplasia) e delle loro dimensioni (ipertrofia). Stimola la divisione cellulare e impedisce l'apoptosi, stimola la sintesi proteica che è la principale componente delle cellule e ne inibisce la degradazione.
- Ormoni tiroidei (T3 o triiodotironina e T4 o tetraiodotironina o tiroxina): sono due ormoni iodati prodotti dalle cellule follicolari della tiroide. Sono importanti regolatori del metabolismo basale ma hanno anche una funzione di crescita in quanto esercitano azioni sul GH e sull'IGF-I; stimolano la secrezione di GH e aumentano la produzione di IGF-I.
- Il fattore di crescita -1 insulino simile (IGF-I) conosciuto anche con il nome di somatomedina C, è

un ormone di natura proteica con una struttura molecolare simile a quella dell'insulina. Questo potente ormone è prodotto soprattutto a livello epatico, ma anche nei condrociti che regolano la sintesi di cartilagine, nei fibroblasti e in molti altri tessuti, tra i quali anche quello mammario. Una volta prodotto, L'IGF-I è liberato in circolo, dove si lega con speciali proteine chiamate IGF-BP (proteine di trasporto dell'IGF-I). L'IGF-I ha attività insulina simile e promuove la proliferazione e il differenziamento cellulare. Accanto all'IGF-I ci sono altre due proteine, chiamate IGF-II ed IGF-III con attività analoga all'IGF-I. Molte azioni del GH sono mediate dall'IGF-I ; si suppone che l'IGF-I prodotto localmente nei tessuti bersaglio possa agire in modo paracrino mediando per lo meno alcuni degli effetti indotti dal GH.

- La famiglia del fattore di crescita dell'epidermide (EGF) è rappresentata da proteine che agiscono attraverso il recettore dell'EGF (ErbB-I), il quale è uno specifico recettore ad alta affinità localizzato nella membrana plasmatica e anche a livello del tessuto mammario bovino. La sintesi di DNA nel tessuto mammario è in parte stimolata dall'EGF nelle cellule epiteliali indifferenziate di manze tra i 4 e i 6 mesi di età (Peri e altri, 1992).

- La famiglia del fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) consiste in almeno 15 fattori di crescita polipeptidici strutturalmente correlati. I FGFs sono ampiamente espressi durante tutto lo sviluppo della ghiandola mammaria bovina; in particolare l'FGF-I presenta attività mitotigenica in cellule epiteliali indifferenziate della mammella in manze tra i 4 e i 6 mesi di età (*Sadowski et al., 1993*).

- La famiglia del fattore di crescita-B trasformante (TGF-B) è composta da almeno 5 proteine multifunzionali correlate, che possono influenzare un'ampia varietà di funzioni cellulari come la formazione della matrice extracellulare, la differenziazione e la crescita dipendentemente dal tipo di cellule e di tessuti. Il TGF-B I è presente nel siero delle manze prepuberali, nelle membrane delle cellule epiteliali mammarie ed esiste uno specifico recettore legante il TGF-B (*Purup et al., 1999; Plaut et al., 1995*). Tali osservazioni fanno ipotizzare un ruolo del TGF-B I nella regolazione della crescita e dello sviluppo della ghiandola mammaria.

#### **4.3 I meccanismi locali di regolazione dello sviluppo mammario nelle manze prepuberali**

Alla luce di quanto esposto, i meccanismi endocrini che regolano lo sviluppo mammario acquistano un notevole interesse pratico al fine di elaborare strategie per la modulazione dello sviluppo mammario. Alcune ricerche, infatti, hanno mostrato che questa può essere la conseguenza di una bassa concentrazione nel sangue dell'ormone della crescita (GH) e del fattore -I di crescita insulina simile (IGF-I). In ultima analisi, ciò si tradurrebbe in una riduzione della proliferazione delle cellule epiteliali mammarie nel periodo prepuberale (*Weber et al., 1999*).

#### 4.3.1 L'asse somatotropico

Le interazioni tra gli ormoni sistemici e la locale produzione di fattori di crescita fondamentalmente regolano lo sviluppo mammario. Mentre l'importanza degli ormoni ovarici e pituitari nella mammogenesi è ben conosciuta, i meccanismi degli effetti dei fattori di crescita non sono completamente capiti. Dati sperimentali propongono che la produzione locale dell'IGF-I e l'associazione alle IGF-I binding proteins mediano la risposta della ghiandola mammaria all'ormone della crescita (GH) e probabilmente agli estrogeni. Nella figura 4.1 A, si nota come il GH dà alla manza prepuberale acuti stimoli di proliferazione delle cellule epiteliali mammarie e un aumento di massa parenchimale, ma anche il più piccolo degli effetti del segnale del GH è probabilmente mediato attraverso le cellule dello stroma mammario, attraverso la produzione paracrina di IGF-I. Per esempio, Berry et al., (2003) hanno sostenuto che l'espressione dell'IGF-I mRNA è stato aumentato da parte del cuscinetto di grasso mammario delle manze con ghiandola mammaria intatta, ma non nel cuscinetto di grasso della ghiandola dalla quale il tessuto parenchimale era stato rimosso chirurgicamente. Questo suggerisce che probabilmente le interazioni tra l'epitelio e lo stroma della ghiandola mammaria regolano la produzione locale di IGF-I e anche di altri membri di questo importante asse di molecole. Berry et al., (2003) hanno confermato che per la ghiandola mammaria della bovina le cellule dello stroma sono la fonte della produzione locale di IGF-I. Parecchie altre evidenze sia in vivo, che in vitro studiano e supportano l'ipotesi che la produzione locale dell'asse IGF-I di molecole mediano l'azione dei classici ormoni mammogenici. Il GH non ha effetto sulla proliferazione cellulare delle cellule epiteliali nella mammella bovina espiantata o nelle cellule mammarie bovine in coltura, mentre è chiaro che l'IGF-I è un potente mitotigenico mammario. L'aumento dell'espressione dell'IGF-I è correlato con un periodo di rapido sviluppo mammario e gli effetti mitotigenici del tessuto mammario bovino estratto sono bloccati con aggiunta di antibiotici anti-IGF-I. In aggiunta, Ellis et al., (2000) mostrano che gli organoidi della cellula mammaria prelevati dal parenchima, raccolti da molte regioni distali della ghiandola mammaria delle manze prepuberali hanno ben risposto all'IGF-I in coltura e che questa sensibilità corrisponde con l'aumento di specifiche leganti di radiomarcatori dell'IGF-I.

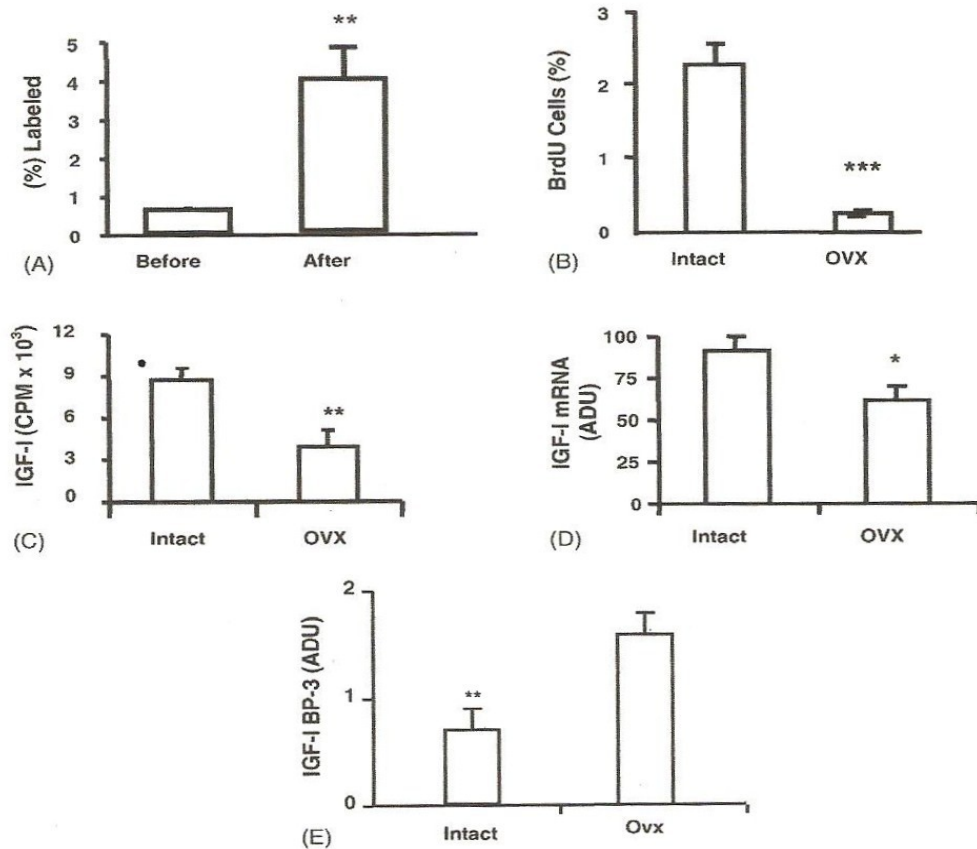


Figura 4.1: La proliferazione delle cellule epiteliali mammarie è aumentata dopo il trattamento con il GH (A) ma ridotto (B) in manze ovariectomizzate (OVX). La mancanza di crescita cellulare coincide con l'abbassamento del legame dell'IGF ai microsomi mammari (C) l'abbassamento della sintesi dell'IGF-I mRNA (D), ma l'aumento locale della sintesi dell'IGF-I BP-III (E). Valori significanti sono indicati dagli asterischi come segue: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (Da Askers et al., 2005)

#### 4.3.2 Le IGF binding proteins

Le proteine leganti l'IGF-I (IGFBPs) trasportano l'IGF-I. Si è notato che IGFBP-II, -III, e -V sono espresse nel tessuto mammario bovino. I tessuti stromali e parenchimali esprimono IGFBP-III e IGFBP-II, ma IGFBP-V è espresso principalmente nello stroma. Nelle manze trattate con l'ormone della crescita o con l'estradiolo, l'espressione della proteina IGFBP-III è ridotta, portando così ad un aumento di IGF-I libero. Tuttavia, è chiaro che nella mammella in circostanze diverse, l'IGFBPs può aumentare o inibire gli effetti dell'IGF-I. In cellule mammarie bovine (cellule MAC-T) transfettate per produrre IGFBP-III endogeno, gli effetti mitotigenici dell'IGF-I sono aumentati. In contrasto, l'aggiunta di IGFBP-III esogeno all'estratto di mammella ha ridotto la loro abilità di stimolare la proliferazione delle cellule mammarie. Come rivisto da Blum e Baumrucker (2002), sembra probabile che le proteine leganti, specialmente IGFBP-III, abbiano un numero di effetti biologici non direttamente legati alla capacità di modificare l'azione dell'IGF-I.



Secondo questi autori, IGFBP-III è abbondante nelle secrezioni mammarie che si accumulano durante lo sviluppo mammario. Nonostante le limitate informazioni disponibili per definire l'esatto ruolo dell'IGF-I durante la mammogenesi prepuberale, è chiaro che la famiglia dell'IGF-I e delle molecole ad essa correlate, giocano un ruolo significativo sulla modulazione dello sviluppo mammario.

Un recente studio ha affermato che l'IGF-I fornisce una considerevole porzione dell'attività mitotigenica disponibile nel siero e nel tessuto mammario, o individualmente o attraverso interazioni con altri fattori di crescita. Inoltre si è visto che l'attività mitotigenica dell'estratto mammario può essere bloccato con l'IGFBP-III. Tuttavia, una moderata correlazione negativa tra l'attività mitotigenica e l'IGFBP-III contenuto negli estratti suggerisce che la produzione locale di IGFBP-III media la risposta dell'IGF-I. E' molto probabile che la produzione locale di IGFBP-III inibisca la crescita cellulare mammaria, mediante un meccanismo che prevede il legame con l'IGF-I, oppure mediante un meccanismo indipendente dall'azione dell'IGF-I.

#### 4.3.3 L'ovaio

Il trattamento con estradiolo in ruminanti con l'ovaio intatto o in animali ovariectomizzati stimola marcatamente la proliferazione del parenchima mammario. Woodward et al., (1993) hanno dimostrato che la timidina triziata (marcatore della proliferazione cellulare) aumenta 46 volte nei dotti mammari a partire da 96 ore dopo l'iniezione con estradiolo, mentre il progesterone non aveva avuto effetti sull'indice di proliferazione.

Negli ultimi anni, l'importanza dell'estradiolo è diventata chiara nelle manze in cui l'ovariectomia, in età anche molto giovane, ha marcatamente compromesso lo sviluppo mammario.

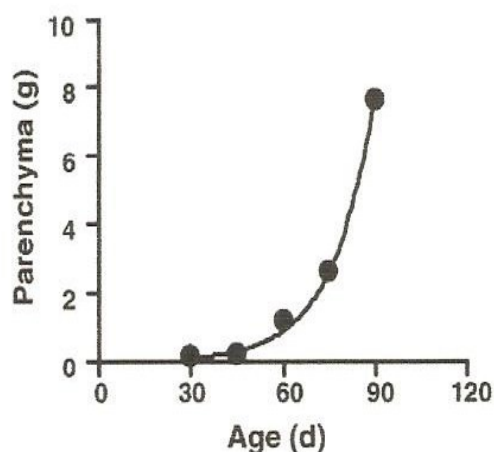
Purup et al., (1993) sono stati i primi a riesaminare l'impatto dell'ovaio nello sviluppo mammario peripuberale alla luce delle conoscenze più recenti dell'asse GH-IGF e delle loro interazioni con gli steroidi ovarici. Nelle manze ovariectomizzate a 2.5 è stata osservata un'enorme riduzione del tessuto parenchimale mammario e una piccola ma significativa riduzione delle concentrazioni ematiche di estradiolo. Il livello dell'estradiolo nelle manze, tuttavia, è veramente basso, ed è discutibile se la riduzione della massa del tessuto parenchimale può essere dovuto a questa piccola riduzione nella concentrazione del siero (0.1 pg/ml). Inoltre, trattamenti con il GH non hanno avuto effetti sullo sviluppo mammario nelle manze ovariectomizzate.

In esperimenti successivi (*Purup et al., 1995*), non si è osservata una significativa differenza nell'affinità di legame o nel numero dei recettori per l'IGF-I nel tessuto.

La maggior parte degli studi disponibili in letteratura si sono focalizzati in manze più grandi, di circa 4 mesi di età. In contrasto con i precedenti esperimenti quando le vitelle erano

ovariectomizzate a 2.5 mesi di età e poi macellate a 4 mesi di età, lo sviluppo mammario totale era stato ridotto e c'era una corrispondente diminuzione della proliferazione di cellule epiteliali (Figura 4.1 B), dell'espressione dei recettori dell'IGF-I (Figura 4.1 C), e della sintesi locale dell'IGF-I (Figura 4.1 D). Inoltre, si era osservato un aumento dell'accumulo di IGFBP-III e della sintesi di mRNA del IGF-I BP-III (Figura 4.1 E).

A conferma della limitata descrizione di Purup et al., (1995), si può affermare che le manze ovariectomizzate presto a 2.5 mesi di età non hanno avuto una successiva crescita mammaria. Le manze ovariectomizzate tra i 2.5 e i 3.0 mesi di età hanno ridotto la crescita mammaria, ma lo sviluppo mammario non è stato completamente compromesso. Questo suggerisce che l'attività ovarica nel corso di un ridotto periodo di sviluppo è cruciale per il seguente sviluppo mammario. Si è recentemente iniziato a focalizzare l'attenzione sui cambiamenti nello sviluppo mammario nel primissimo periodo del post parto. La figura 4.2 mostra lo sviluppo del tessuto parenchimale mammario tra i 30 e i 90 giorni di età. A 30 giorni di età, si può osservare solo una piccola striscia di tessuto parenchimale nella mammella che è difficile da sezionare dal tessuto stromale circostante. Il grado di sviluppo del tessuto in questo momento appare simile a quello che si osserva nei tori maturi. Nella regione adiacente ad ogni capezzolo, i dotti mammari radiano verso le pareti del corpo in una piccola sistemazione che corrisponde con la futura cisterna della ghiandola. Questa piccola quantità di tessuto parenchimale in media pesa circa 150 mg per ghiandola. Da approssimativamente 75 gironi di età, una massa di tessuto arrotondata simile ad una noce cresce diventa molto evidente alla palpazione. Da 90 giorni di età, questa massa di tessuto cresce approssimativamente di 10 g.



*Figura 4.2: Crescita del parenchima mammario in giovenche prepuberali Holstein n=2 vitelle per punto (Da Askers et al., 2005).*

#### 4.3.4 Le cellule staminali

Qualunque sia la fonte di estradiolo (locale o sistemico), o l'intermediario attivo (IGF-I o altri fattori di crescita), il segnale endocrino o paracrino durante la mammogenesi deve da ultimo causare un aumento del numero di cellule parenchimali. Come in altri tessuti somatici, lo sviluppo mammario dipende dal cambiamento del numero e dell'attività delle cellule staminali mammarie. L'esistenza delle cellule staminali mammarie può essere dedotta considerando il ciclo dello sviluppo mammario, dalla crescita dei dotti, lo sviluppo alveolare, la differenziazione delle cellule secretorie, all'involutione che si verifica in modo ciclico durante le lattazioni multiple. Dati specifici sui ruminanti sono limitati, ma Ellis e Capuco, (1997) hanno identificato una popolazione di cellule dalla colorazione chiara presenti nelle ghiandole mammarie delle bovine, queste possono includere cellule staminali mammarie. Ellis e Capuco, (1997) hanno eseguito un'analisi istologica della proliferazione cellulare nella parte esterna, mediale, e nelle zone della cisterna parenchimale di manze Holstein prepuberali mediante bromodexyuridine (BrdU) a 2, 5, e 8 mesi di età. Cellule chiare, scure, e di colorazione intermedia sono state osservate nelle sezioni istologiche. Le cellule chiare comprendevano solo circa il 10% delle cellule parenchimali, ma stimate per circa il 50% della proliferazione cellulare. Le cellule di colorazione intermedia comprendevano circa il 60% del totale e stimate per circa il 43% delle cellule proliferate. Le cellule scure comprendevano il 30% del totale della popolazione di cellule parenchimali ma solo il 7% della proliferazione cellulare. Questi dati danno una conferma quantitativa all'ipotesi che le cellule chiare sono la popolazione primaria di cellule proliferative. Inoltre è rilevante che la porzione di cellule chiare, scure, e intermedie si sono

modificate in modo sostanziale tra le giovenche di 2 e 5 mesi di età. Le cellule scure sono in pratica assenti in vitelle di 2 mesi, ma comprendono circa il 30% della popolazione di cellule in manze più mature. Alterazioni precoci nel numero delle cellule staminali possono cambiare la popolazione cellulare disponibile ad entrare nei successivi stadi di sviluppo. Per esempio, come potrebbero i segnali dall'ovaio prepuberale avere impatto sullo sviluppo delle popolazioni di queste presunte cellule staminali mammarie? Può essere che effettivi trattamenti possano essere progettati per la somministrazione durante questa precoce finestra di sviluppo. Anche un relativo minor cambiamento nel numero assoluto di cellule staminali o progenitrici può essere tradotto con ampie differenze nel successivo sviluppo della ghiandola e nella potenziale produzione di latte.

#### 4.3.5 Le proteine della matrice extracellulare

Come l'epitelio mammario avanza nel cuscinetto di grasso, il tessuto mammario è circondato da tessuto stromale, il quale consiste in fibroblasti, adipociti, capillari, e componenti della matrice

extracellulare (ECM). Conseguentemente, il tessuto stromale deve essere rimodellato o degradato per permettere la penetrazione delle strutture dell'epitelio mammario. Un aspetto dello sviluppo della ghiandola mammaria delle manze, che non è stato studiato, è il ruolo dell'ECM nell'orientamento dei rami dei dotti e nella morfogenesi. Tuttavia, animali prematuri e modelli di coltura cellulare suggeriscono che le proteine dell'ECM giocano un ruolo distintivo nello sviluppo mammario e nella proliferazione cellulare. In particolare, la fibronectina, la laminina, e il collagene possono essere importanti per lo sviluppo della ghiandola mammaria della manza. La laminina e il collagene di tipo IV sono i maggiori componenti della membrana basale, delle strutture essenziali richieste per una corretta funzione mammaria, mentre la fibronectina è una proteina adesiva e aiuta l'unione delle cellule alla matrice extracellulare della membrana basale. Le proteine dell'ECM possono anche modulare la reattività dell'epitelio mammario alla stimolazione ormonale.

Berry et al., (2002) hanno osservato differenze nella distribuzione di molte proteine della matrice extracellulare nel tessuto mammario tra manze intatte e ovariectomizzate. La struttura istologica differiva per il parenchima da animali intatti nei quali era contenuto in abbondanza con complesse ramificazioni di unità di dotti terminali epiteliali (TDU), mentre le TDU degli animali ovariectomizzati erano strutture di dotti molto maggiori con piccole o assenti ramificazioni. Nelle manze ovariectomizzate, le fibre di collagene erano abbondanti e molto diffuse nello stroma intra-lobulare. Il collagene di tipo IV era primariamente depositato nella lamina basale dei dotti maturi, mentre la fibronectina e la laminina erano presenti in tutto lo stroma parenchimale, sia negli animali intatti che ovariectomizzati. Usando il Western blotting, la fibronectina era molto abbondante nel parenchima nei dintorni del cuscinetto di grasso ed era significativamente maggiore nel parenchima delle manze ovariectomizzate. La laminina era molto abbondante nel parenchima di animali intatti rispetto a quella negli animali ovariectomizzati, ma era simile tra il parenchima e il cuscinetto di grasso. Questi risultati forniscono un'iniziale evidenza che la fibronectina, la laminina, e il collagene partecipano nella regolazione dello sviluppo mammario della manza prepuberale. Recentemente si è trovato che le cellule mammarie coltivate su fibronectina crescono molto più lentamente e raggiungono una densità finale inferiore rispetto a cellule cresciute sul collagene, sulla laminina, o sulle piastre di coltura.

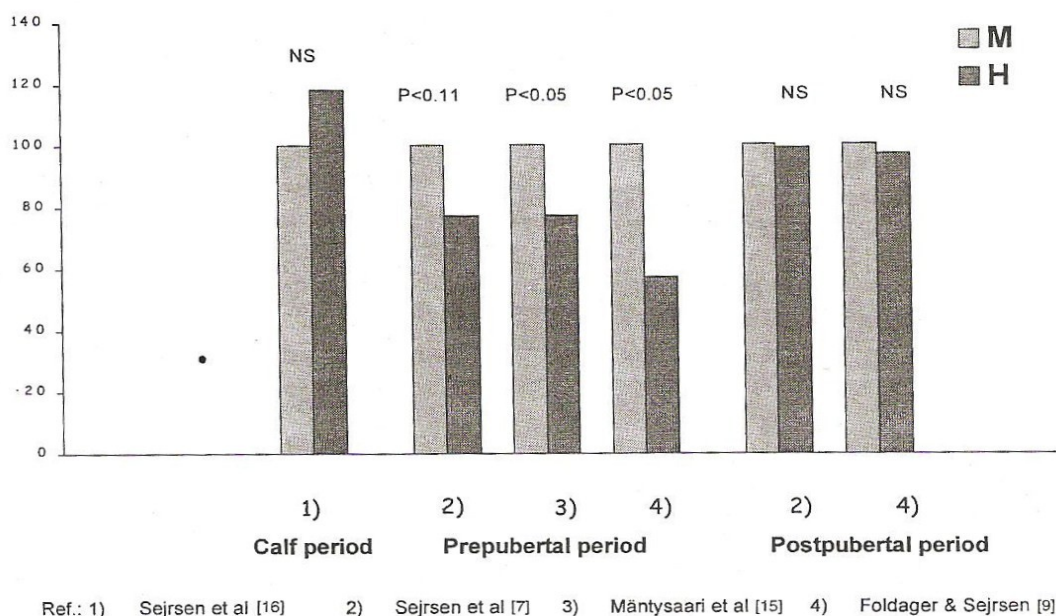
Interrelazioni tra il microambiente, l'asse IGF-I delle molecole, per regolare lo sviluppo mammario sono diventate progressivamente più complesse e involute. Per esempio, Liu et al., (2003) hanno riportato che il collagene di tipo 1° alfa agisce come una IGFBP-III.

## 5. IL LIVELLO ALIMENTARE MODIFICA LA CRESCITA MAMMARIA

### 5.1 L'elevato aumento di peso e le implicazioni sulla crescita mammaria e sulla potenziale produzione di latte

#### 5.1.1 Gli effetti del livello alimentare sulla crescita mammaria

Lo sviluppo mammario in bovine allevate con un alto livello alimentare è incompleto, le ghiandole mammarie di queste bovine presentano chiare differenze di forma e dimensioni rispetto a ghiandole di bovine allevate con un moderato livello alimentare (*Herman et al., 1946*). Il periodo di sviluppo prepuberale è critico per la potenziale capacità della manza di produrre latte nel corso della sua vita produttiva (*Sejrsen et al., 1978*). Si è osservato che la crescita della ghiandola mammaria è inalterata dal livello alimentare prima dei 90 kg di peso vivo (*Sejrsen et al., 1998*) (*Figura 5.1*). Il livello alimentare non è solo influenzato dal livello energetico, ma anche dalla quantità di proteina e dalla sua degradabilità, ma gli effetti negativi del livello alimentare non sono modificati dalla quantità di proteina by-pass. La crescita mammaria risulta inalterata dal livello proteico nelle manze alimentate con un livello alimentare elevato tra i 135 e i 320 kg di peso corporeo (*Whitlock et al., 1999*).



*Figura 5.1: Crescita mammaria in manze alimentate moderatamente (M) o elevatamente (H) nei diversi periodi di sviluppo (Come varia H dato M= 100) (Da Sejrsen et al., 2000).*

### 5.1.2 Le basi fisiologiche che spiegano gli effetti del livello alimentare

Il GH è richiesto per lo sviluppo della mammella prepuberale e allo stesso tempo è alterato dal livello alimentare. I livelli di GH circolanti sono ridotti da un alto livello alimentare e il livello di GH nel sangue è positivamente correlato con la crescita mammaria (Sejrsen et al., 1983). Inoltre, la somministrazione di GH esogeno aumenta la crescita mammaria. Tuttavia, il tessuto mammario delle manze prepuberali non è legato al GH, e il GH “in vitro” non stimola la proliferazione delle cellule della mammella prepuberale, sebbene il tessuto contenga il mRNA del recettore del GH (Purup et al., 1995).

Molte evidenze sperimentali suggeriscono che gli effetti del GH sulla crescita mammaria nei ruminanti è mediata dall'IGF-I. Il livello circolante di IGF-I è stimolato dal trattamento con il GH, l'IGF-I si lega ai recettori per l'IGF nel tessuto mammario e questo altera la proliferazione cellulare in vitro (Purup et al., 1993). Inoltre, l'effetto mitotigenico del siero nella proliferazione delle cellule mammarie “in vitro” è strettamente correlato alla concentrazione di IGF-I nel siero.

Tuttavia, l'IGF-I aumenta, non decresce come il GH, dato un livello alimentare elevato. Così, gli effetti “in vitro” sembrano essere in conflitto con i dati “in vivo”, dove la crescita mammaria è positivamente correlata con il livello sierico del GH e negativamente correlata con i livelli sierici dell'IGF-I.

Questi effetti paradossali tra i risultati “in vivo” e “in vitro” possono essere spiegati dal cambiamento nel sangue delle concentrazioni delle IGFBP in relazione al livello alimentare (Vestergaard et al., 1995). Quindi, la riduzione della sensibilità del tessuto mammario all'IGF-I è la più logica spiegazione alla riduzione della crescita mammaria dovuta all'alto livello alimentare. L'effetto negativo del livello alimentare sulla crescita mammaria può essere causato dall'aumento locale della produzione di IGFBP-III che inibisce l'effetto dell'aumento del livello di IGF-I.

### 5.1.3 Il livello alimentare e la produzione di latte

L'elevato livello alimentare durante il periodo prepuberale può causare una riduzione permanente della potenziale produzione di latte futura (Figura 5.2).

Gli effetti negativi del livello alimentare possono verificarsi con molte combinazioni di diete.

Van Amburgh e altri (1998) hanno inoltre concluso che la produzione di latte è inalterata dal livello alimentare a cui la bovina è sottoposta tra i 100 e i 300 kg di peso corporeo.

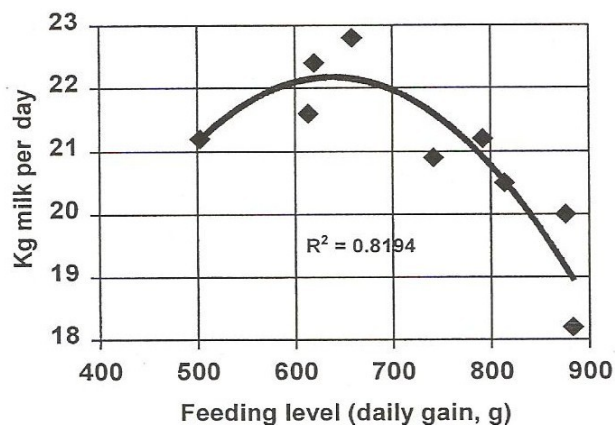


Figura 5.2: Effetto del livello alimentare prepuberale sulla successiva produzione di latte (Da Hohenboken et al., 1995).

#### 5.1.4 La capacità di crescita genetica e la produzione di latte

Esiste una relazione positiva tra la capacità di crescita e la produzione di latte. La capacità di crescita delle manze selezionate per la produzione di latte è più alta rispetto alla capacità di crescita di manze non selezionate. La capacità di crescita genetica è strettamente e positivamente correlata con la produzione di latte (Figura 5.3). Quindi l'ottimale incremento di peso giornaliero, e il livello alimentare adeguato, dovrebbe essere modulati in base alla potenzialità genetica delle manze per la produzione di latte.

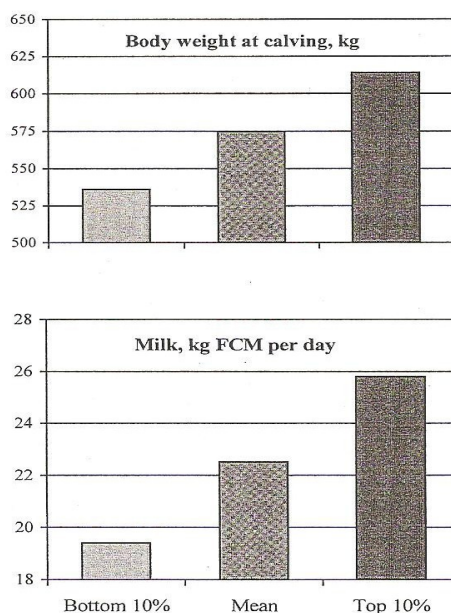


Figura 5.3: Peso corporeo atteso al parto e produzione di latte in relazione alla variazione genetica di capacità di crescita (Calculation based on data from Hohenboken et al., 1995).

## **5.2 Gli effetti a lungo termine dell'assunzione di latte intero prima dello svezzamento sulla produzione di latte futura**

Le vitelle alimentate ad libitum con latte intero (LI) durante il primo periodo di vita aumentano drammaticamente il loro peso corporeo rispetto alle vitelle nutrite con un regime standard di latte ricostituito (LR) (*Shamay et al., 2005*). Inoltre, la differenza di peso corporeo, maggiore nelle manze alimentate con LI, suggerisce una maggiore deposizione di grasso. Il LR associato ad un alto livello alimentare aumenta l'incremento corporeo giornaliero senza aumentare la deposizione di grasso (*Diaz et al., 2001; Blome et al., 2003; Brown et al., 2005a*). L'incremento del livello alimentare con LR insieme con l'aumento della concentrazione proteica provoca una diminuzione della deposizione di grasso e un aumento della crescita corporea magra (*Bartlett et al., 2006*); in contrasto, un alto livello alimentare in associazione con LI aumenta la deposizione di grasso. Inoltre certi studi sostengono che l'aggiunta di proteina durante il periodo prepuberale ha effetti inconsistenti sulla crescita delle manze; tuttavia, altri studi mostrano un maggior tasso di crescita aumentando la proteina nella dieta (*Pirlo et al., 1997; Moallem et al., 2004; Shamay et al., 2005*). I pareri contrastanti sugli effetti del supplemento di proteina può essere ascritto alle diverse risorse energetiche nelle razioni delle manze, come è stato osservato da Casper e altri (1994).

L'incremento di peso giornaliero non differisce tra manze LI e manze LR dopo lo svezzamento, e il vantaggio di peso corporeo raggiunto allo svezzamento persiste fino al primo parto. Lo stesso modello di crescita è anche dimostrato da Shamay e altri (2005), i quali hanno osservato che le differenze di peso corporeo allo svezzamento persistevano più a lungo durante il periodo di allevamento. Little e Kay (1979) e Macdonald e altri (2005) hanno riportato gli effetti a lungo termine dell'accelerazione del tasso di crescita durante il periodo prepuberale sul peso corporeo e sulla seguente lattazione.

Le manze alimentate con LI in media producono il 10% in più di latte delle manze alimentate con LR durante la prima lattazione, mentre le manze allevate con il supplemento di proteina producono una media il 12% di latte in più rispetto all'altro gruppo. Questi risultati sono in accordo con Shamay e altri (2005), nei quali le manze alimentate con LI e un supplemento di proteina nella dieta durante il periodo prepuberale producevano la maggiore quantità di latte.

Sejrsen e altri (2002) hanno affermato che la positiva correlazione tra peso corporeo e produzione di latte è attribuibile alla relazione positiva tra capacità di crescita, la quale è correlata alla potenzialità genetica, e alla produzione di latte: le manze selezionate per la produzione di latte hanno un'alta capacità di crescita.

Le manze LI producono molto più latte delle LR, questo porta alla conclusione che un elevato tasso di crescita dalla nascita allo svezzamento con un regime "ad libitum" di LI abbia effetti



positivi a lungo termine sulla produzione di latte.

L'evidente effetto del latte somministrato alle vitelle sul tasso di crescita è presente fino allo svezzamento mentre successivamente, le differenze nel tasso di crescita sono minori. La crescita mammaria prima della pubertà è inalterata dal livello alimentare (*Sejrsen et al., 1998*).

L'alimentazione con LR con elevato apporto di proteina e concentrazione energetica elevata incrementa il grasso extra parenchimale ma aumenta anche la massa parenchimale mammaria, DNA, e RNA. Quindi, è possibile concludere che determinati effetti sul tasso di accelerazione di crescita sono correlati alla fase prepuberale (crescita allometrica) dello sviluppo mammario ma non a quella dalla nascita allo svezzamento (crescita isometrica).

### **5.3 La regolazione nutrizionale e somatotropica**

La crescita prepuberale e lo sviluppo della ghiandola mammaria dipendono dalla presenza in circolo di peptidi e ormoni steroidei. Si è notato che questi ormoni lavorano in modo coordinato con i fattori locali per influenzare la crescita dell'epitelio mammario. Nel caso dell'IGF-I, la risposta di crescita è modulata dalle IGFBPs che possono anche esercitare effetti sulla crescita indipendenti dall'IGF (*Jones et al., 1995*).

Come riportato in precedenza (cap. 5.1) la somministrazione di GH a manze prepuberali stimola lo sviluppo mammario (*Purup et al., 1993*). Il trattamento con il GH con un basso livello alimentare fa decrescere la risposta mitotigenica degli estratti mammari. In contrasto, con un alto livello alimentare, il GH stimola la risposta mitotigenica degli estratti mammari. I trattamenti con l'ormone della crescita con alti livelli alimentari hanno aumentato nel tessuto i livelli di IGF-I insieme con la risposta mitotigenica degli estratti, implicando che la locale disponibilità di IGF-I può giocare un ruolo nella induzione del GH alla crescita mammaria in manze con un tasso di crescita standard (*Purup et al., 1993*). Tuttavia, con un basso livello alimentare, il GH non cambia la concentrazione di IGF-I nei tessuti estratti. Così, i cambiamenti dei livelli di IGF-I nel tessuto mammario non sembrano spiegare gli effetti del GH con basso livello nutrizionale sulla risposta mitotigenica. E' probabile che i fattori di crescita sintetizzati nel tessuto mammario contribuiscano in complesso alla risposta mitotigenica (*Sadowski et al. 1993*).

L'effetto negativo della crescita rapida sullo sviluppo della ghiandola mammaria delle manze prepuberali è ben stabilita (*Sejrsen et al., 1997*). Una rapida crescita riduce la risposta mitotigenica degli estratti di tessuto mammario di manze prepuberali rispetto a manze accresciute più lentamente. Questo suggerisce che i locali cambiamenti delle concentrazioni del fattore di crescita sono importanti per la crescita dell'epitelio mammario durante questo periodo di sviluppo.

I livelli di IGF-I nel tessuto mammario non si modificano in risposta al livello alimentare, a

differenza della risposta mitotigenica. Tuttavia, un alto livello alimentare aumenta i livelli dell'IGFBP-III negli estratti del tessuto mammario delle manze prepuberali. Il livello di IGFBP-III in questi estratti di tessuto mammario è correlato negativamente con la risposta mitotigenica di questi estratti, e ciò suggerisce un ruolo per l'IGFBP-III nella mediazione dell'effetto negativo della rapida crescita sulla produzione di latte (Purup *et al.*, 1999). Inoltre, un'aggiunta di IGFBP-III inibisce l'effetto stimolatore dell'IGF-I nella mitotigenesi (Weber *et al.*, 1999). In conclusione, il livello alimentare e il GH esogeno possono modulare lo sviluppo mammario prepuberale, potenzialmente attraverso la mediazione della produzione locale di fattori regolatori.

#### 5.4 Regolazione ontogenica e nutrizionale

Nelle bovine, lo sviluppo mammario tra la nascita e la pubertà è caratterizzato dalla crescita di un parenchima ricco di epitelio (PAR) dentro al cuscinetto di grasso mammario (MFP). Questa proliferazione e l'accumulo di cellule epiteliali mammarie richiede la presenza di estradiolo (Wallace 1953, Purup *et al.*, 1993). L'estradiolo stimola il gene dell'IGF-I, espresso in maggior misura nel cuscinetto di grasso mammario (MFP) rispetto al parenchima ricco di epitelio (PAR) (Meyer *et al.*, 2006a). Il massimo grado di proliferazione delle cellule epiteliali si verifica nella regione del PAR adiacente all'MFP (Capuco *et al.*, 2002). Per queste ragioni, si studia l'espressione dei membri della famiglia ER (recettori per l'estradiolo) e cioè ER alfa (recettore che codifica l'estradiolo), ER beta, e l'ERR alfa e i geni che rispondono all'estradiolo e cioè IGF-I e il recettore per il progesterone (PR).

Con l'aumento del peso corporeo l'ER alfa e l'IGF-I decrescono linearmente sia nel PAR che nel MFP (Meyer *et al.*, 2006a) (Figura 5.4).

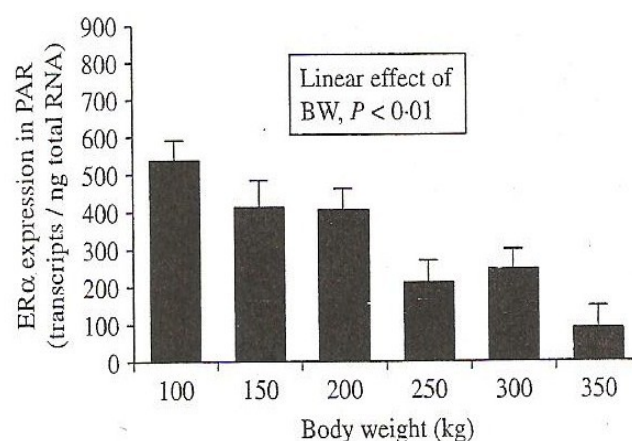


Figura 5.4: Effetto del peso corporeo sull'espressione del gene del recettore che codifica l'estradiolo alfa (ER alfa) dentro al parenchima mammario (PAR) (Da Meyer *et al.*, 2007)

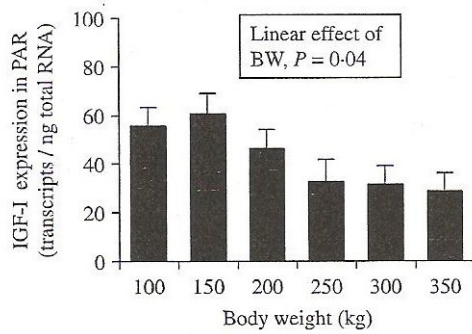


Figura 5.5: Effetto del peso corporeo sull'IGF-I nel PAR. (Da Mayer et al., 2007)

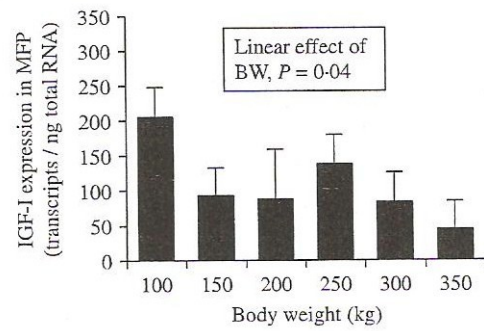


Figura 5.6: Effetto del peso corporeo sull'IGF nel MFP. (Da Mayer et al., 2007)

L'espressione dell'ERR alfa e del PR decresce con l'aumento del peso corporeo nel PAR ma non nel MFP (Meyer et al., 2006a) (Figura 5.5; 5.6).

L'alimentazione stimola l'espressione del ER alfa e del ERR alfa nel PAR ma non ha effetto sull'IGF-I o sul PR nel PAR o nel MFP (Meyer et al., 2006a). Si pensa che l'ER alfa e l'IGF-I giochino un ruolo nella regolazione dello sviluppo della proliferazione delle cellule epiteliali mammarie. Recentemente è stato dimostrato che l'MFP è altamente recettivo all'estradiolo, questo suggerisce che l'MFP possiede le abilità per influenzare l'azione paracrina degli ormoni e quindi coordinare gli effetti dell'estradiolo nel PAR.

## 6. CONCLUSIONI

Dai risultati esposti nella presente tesi risulta che l'alimentazione delle manze durante il periodo prepuberale ha dei riflessi importantissimi sullo sviluppo corporeo e anche sulla futura carriera produttiva.

L'effetto dell'alimentazione si manifesta già prima dello svezzamento, e il tipo di latte somministrato è in grado di influenzare lo sviluppo della ghiandola mammaria. Nelle reali condizioni di allevamento il latte più utilizzato per i vitelli è quello ricostituito in quanto costa meno rispetto al latte intero perché contiene grassi più economici. Un'ottima alternativa è il colostro in eccesso che non può essere commercializzato ma che rappresenta un eccellente ed economico alimento.

Il periodo dallo svezzamento fino alla pubertà è però quello decisivo; le manze alimentate con un livello alimentare troppo elevato, e quindi con un tasso di crescita molto veloce, avranno una mammella voluminosa ma con meno tessuto secernente rispetto a quelle alimentate con un livello alimentare moderato. Questo probabilmente è dovuto ad una bassa concentrazione nel sangue dell'ormone della crescita (GH) che si traduce in una diminuzione della proliferazione delle cellule epiteliali mammarie. Inoltre, un elevato livello alimentare porta un forte aumento locale della produzione di IGFBPs (proteine di trasporto dell'IGF-I) e in particolare l'IGFBP-III sequestra l'IGF-I e inibisce così il suo effetto positivo sulla crescita mammaria.

E' anche importante ricordare che il piano alimentare deve essere modulato in base alle esigenze delle bovine; animali selezionati per produrre latte hanno bisogno di maggior alimento per crescere rispetto ad altri non selezionati. In ogni caso dopo la pubertà il livello alimentare non influenza più la crescita mammaria delle bovine.

Quindi si può affermare che alla nascita le vitelle destinate alla rimonta dopo l'assunzione del colostro per acquisire l'immunità passiva è bene alimentarle con latte intero invece che con quello ricostituito in quanto presenta effetti positivi sulla crescita mammaria e sulla futura produzione di latte.

Dopo lo svezzamento, attuato introducendo il mangime di avviamento che poi sostituirà del tutto il latte, l'alimentazione delle vitelle fino a 6 mesi di età è decisiva per la loro carriera produttiva; la somministrazione di una miscela di concentrati (ricca di proteine) è consigliabile, una dieta a base di solo fieno in questo periodo di vita porta ad uno sviluppo stentato, magrezza, addome eccessivamente voluminoso; ottimale in questo periodo potrebbe essere l'unifeed destinato alle vacche in lattazione.

Da 6 a 8 mesi è preferibile una razione variata, con più alimenti, integrata quando occorre, con

concentrati e sempre integrata con minerali e vitamine. La quantità di concentrati da somministrare deve essere valutata per le manze in base allo stato di ingrassamento raggiunto in quel momento onde evitare accumulo di tessuto adiposo che avrebbe effetti negativi sulla futura produzione di latte. Nella pratica d'allevamento si può utilizzare un misto tra unifeed per bovine in lattazione e unifeed per bovine in asciutta, spostandosi con l'aumento di peso del bestiame sempre più verso la dieta per la manza che con animali che crescono bene può coincidere con quella d'asciutta. Le diete per le manze devono limitare l'apporto di amido il quale stimola l'adipogenesi anche a livello mammario. Quindi il ricorso a silomais deve essere limitato mentre la somministrazione di foraggio di ottima qualità (ricco di energia e proteina) dovrebbe avvenire ad libitum.

Il ritmo medio di accrescimento dallo svezzamento alla prima fecondazione (la manza raggiunge la pubertà a 7-8 mesi di età se alimentata in modo adatto) dovrebbe essere compreso fra i 600 e gli 800 g/d.

A livello operativo, l'allevatore presta poca attenzione all'alimentazione del bestiame da rimonta, perché lo ritiene un "peso improduttivo" ma non dovrebbe essere così, anzi la formulazione della dieta e la qualità degli alimenti per le manze dovrebbero essere curati per assicurare condizioni ottimali nei confronti dello sviluppo corporeo, della fertilità e dello sviluppo morfo-funzionale della mammella e di conseguenza animali così allevati in età adulta produrranno più latte.

## 7. BIBLIOGRAFIA

### a) Testi consultati:

- *Bittante G., Andrighetto I., Ramanzin M. (2008) Tecniche di produzione animale; capitolo 1. Liviana.*
- *Bortolami Ruggero - Emilio Callegari – Viscardo Beghelli (2006) Anatomia e Fisiologia degli Animali Domestici; capitolo 8. Edagricole.*
- *Capra V. (1982) A b c dell'allevatore: La vacca ed il vitello. Terza edizione Edagricole.*
- *Cowie A. T.- Forsyth I. A.(1959) Hormonal Control of Lactation. Monographs on Endocrinology. Hart. Springer - Verlag Berlin – Heidelberg - New York.*
- *Cunningham James G., DVM, PhD (2002) Textbook of Veterinary Physiology Third Edition; capitolo 38. W. B. Saunders Company.*
- *Monetti P. G. (1998) Appunti di Bovinocoltura; capitolo 2. Cristiano Giraldi Editore.*
- *National Academy of Sciences. National Research Council. Supplement (1966) Hormonal Relationships and Application in the Production of Meats, Milk, and Eggs.*
- *Schalm O. W. / Carroll E. J./ Jain N. C. (1975) Le Mastiti della Bovina; capitolo 2, 3. Edizione italiana a cura di Franco Scatozza. Edagricole.*
- *Schmidt G. H.(1971) Biology of Lactation. Cornell University; capitolo 2, 3, 4. W. H. Freeman and Company San Francisco.*
- *Sherwood Lauralee (2008) Fisiologia umana, dalle cellule ai sistemi; capitolo 18, 19. Zanichelli.*
- *Sherwood Lauralee – Hillary Klandorf – Paul Yancey (2006) Fisiologia degli Animali, dai geni agli organismi; capitolo 16. Zanichelli.*

•Stanga I. *Cavaliere del Lavoro (1925) L'allevamento della vitella lattifera. Libreria Editrice Etna.*

**b) Pubblicazioni scientifiche:**

•Akers R. Michael, McFadden Thomas B., Purup Stig, Vestergaard Mogens, Sejrsen Kristen, and Capuco Anthony V. (2000). *Local IGF-I Axis in Prepubertal Ruminant Mammary Development. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, Vol 5, No. 1.*

•Akers R.M., Ellis S.E., Berry S.D. (2005). *Ovarian and IGF-I axis control of mammary development in prepubertal heifers. Domestic Animal Endocrinology 29 259-267.*

Forsyth Isabel A. (1991). *The mammary gland. Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism- Vol. 5, No. 4, December.*

•Herman HA, Ragsdale AC. (1946). *The influence of quantity and quality of nutrients on the growth of dairy heifers. J Anim Sci;5:398.*

Hohenboken WD, Foldager J, Madsen P, Andersen BB. (1995). *Breed and nutritional effects and interactions on energy intake, production and efficiency of nutrient utilization in young bulls heifers and lactating cow. Acta Agric Scand, Sect. A, Anim Sci;45:92.*

•Jones JI, Clemmons DR. (1995). *Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. Endocrine Rev;16:3-34.*

•Knight C. H. (2000). *The importance of cell division in udder development and lactation. Elsevier: Livestock Production Science 66 169-176.*

•Kleinberg David L., Fledman Mark, and Ruan Weifeng (2000). *IGF-I: An Essential Factor in Terminal End Bud Formation and Ductal Morphogenesis.. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, Vol. 5, No. 1.*

•Meyer M J, Rhoads R P, Capuco A V, Connor E E, Hummel A, Boisclair Y R and Van Amburgh M E (2007). *Ontogenic and nutritional regulation of steroid receptor and IGF-I transcript abundance in the prepubertal heifer mammary gland. Journal of Endocrinology 195, 59-66.*

•Moallem U., Werner D., Lehrer H., Zachut M., Livshitz L., Yakoby S., and Shamay A. (2010).

*Long-term effects of ad libitum whole milk prior to weaning and prepubertal protein supplementation on skeletal growth rate and first-lactation milk production. American Dairy Science Association.*

•Purup, S., Vestergaard, M. and Sejrsen, K. Dept. Involvement of Growth Factors in the Regulation of Pubertal Mammary Growth in Cattle. *Of Animal Nutrition and Physiology, Danish Institute of Agricultural Sciences, Research Centre Foulum, DK-8830 Tjele, Denmark.*

•Purup S. (1995). *Growth hormone and mammary gland development in heifers. In Danish with English summary. Ph.D. Thesis. Danish Inst Anim Sci, Denmark.*

•Purup S, Sejrsen K, Akers RM. (1993). *Influence of estradiol on insulin-like growth factor I IGF-I stimulation of DNA synthesis in vitro in mammary gland explants from intact and ovariectomized prepubertal Holstein heifers. Livest Prod Sci;35:182.*

•Purup S, Sejrsen K, Foldgar J, Akers RM (1993). *Effect of exogenous bovine growth hormone and ovariectomy on prepubertal mammary growth, serum hormones, and acute in vitro proliferative response of mammary explants from Holstein heifers. J Endocrinol;139:19-26.*

•Purup S, Vestergaard M, Weber MS, Plaut K, Akers RM, Sejrsen K. (2000). *Local regulation of pubertal mammary growth in heifers. J Anim Sci;78 Suppl 2.*

•Sandowski Y, Peri I, Gertler A. (1992). *Partial purification and characterization of putative paracrine/autocrine bovine mammary epithelium growth factors. Livest Prod Sci;139:35:35-48.*

•Sejrsen K. (1978). *Mammary gland development and milk yield in relation to growth rate in the rearing period in dairy dual purpose heifers. Acta Agric Scand;28:41.*

•Sejrsen K, Huber JT, Tucker HA. (1983). *Influence of amount fed on hormonal concentrations and their relationship to mammary growth in heifers. J Dairy Sci;66:845.*



- Sejrsen K, Purup S. (1997). *Influence of prepubertal feeding level on milk yield potential of dairy heifers: a review. J Anim Sci;75:828-35.*
  
- Sejrsen K, Purup S, Martinussen H, Vestergaard M. (1998). *Effect of feeding level in calves and prepubertal heifers. J Dairy Sci;81 Suppl1:377.*
  
- Sejrsen K., Purup S., Vestergaard M., Foldager J. (2000). *High body weight gain and reduced bovine mammary growth: physiological basis and implications for milk yield potential. Domestic Animal Endocrinology 19 93-104.*
  
- Teresa L. Wood, Monica m. Richert, Malinda A. Stull, and Michael A. Allar (2000). *The Insulin-Like Growth Factors (IGFs) and IGF Binding Proteins in Postnatal Development of Murine Mammary Glands. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, Vol. 5, No. 1.*
  
- Thorn Stephanie R, Purup Stig, Vestergaard Mogens, Sejrsen Kris, Meyer Matthew J, Van Amburgh Micheal E and Boisclair Yves R (2008). *Regulation of mammary parenchymal growth by the fat pad in prepubertal dairy heifers: role of inflammation-related proteins. Journal of Endocrinology 196, 539-546.*
  
- Van Amburgh ME, Galton DM, Bauman DE, Everett RW, Fox DG, Chase LE, Erb HN. (1998). *J Dairy Sci ;81:527.*
  
- Vestergaard M, Purup S, Sejrsen K. (1995). *Influence of bovine growth hormone and feeding level on growth and endocrine status of prepubertal heifers. J Anim Sci;73 Supp 1:148.*
  
- Weber M.S., Purup S., Vestergaard M., Akers R.M., Sejrsen K.(2000). *Nutritional and somatotropin regulation of the mitogenic response of mammary cells to mammary tissue extracts. Domestic Animal Endocrinology 18 159-164.*
  
- Weber MS, Purup S, Vestergaard M, Sondergaard-Andersen J, Akers RM Sejrsen K. (1999). *Contribution of insulin-like growth factor-I IGF-I and IGF-binding proteins-3 IGFBP-3 to mitogenic activity in bovine mammary extracts and serum. J Endocrinol;161:365-73.*

•Whitlock BK, VandeHaar MJ, Tucker HA. (1999). Influence of dietary protein on prepubertalmammary gland development in rapidly-grown heifers. *J Dairy Sci*;82 Supp 1:52.

## **8. RINGRAZIAMENTI**

Desidero innanzitutto ringraziare i miei genitori che mi hanno permesso di raggiungere questo traguardo; ringrazio mia sorella Aurora, amici e parenti, in particolare Alessandra, per il sostegno e il grande aiuto che mi hanno dato durante la preparazione di questa tesi. Desidero ringraziare con affetto il mio fidanzato Michele per essermi stato vicino ogni momento durante il mio percorso di studio. Vorrei esprimere la mia sincera gratitudine ai miei compagni di corso, in particolare Chiara, per la loro amicizia durante questi tre anni di laurea. Infine ho desiderio di ringraziare il Professore Gianfranco Gabai per i preziosi insegnamenti e per le numerose ore dedicate alla mia tesi.

