



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e  
Ambiente Dipartimento di Territorio e Sistemi Agro-Forestali

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Animali

INFLUENZE DEL RITMO CIRCADIANO SULLA  
FISIOLOGIA DELLE BOVINE DA LATTE E CONSEGUENZE  
SULLE TECNICHE DI ALLEVAMENTO

INFLUENCES OF CIRCADIAN RHYTHM ON DAIRY COWS  
PHYSIOLOGY AND CONSEQUENCES ON BREEDING  
TECHNIQUES

**Relatore**

Prof. Elisa Giaretta

**Laureanda**

Elisa Cuccato

**Matricola n.** 1220922

ANNO ACCADEMICO 2021-2022



# INDICE

RIASSUNTO .....	5
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUZIONE .....	7
2. REGOLAZIONE FISIOLÓGICA .....	9
3. SISTEMA CIRCADIANO .....	9
4. OROLOGI BIOLOGICI.....	10
5. REGOLAZIONE CIRCADIANA ORMONALE .....	13
5.1. VASOPRESSINA.....	13
5.2. ACETILCOLINA .....	13
5.3. ORMONE ADRENOCORTICOTROPO.....	14
5.4. CORTISOLO.....	14
5.5. INSULINA e GRELINA .....	15
5.6. GH.....	15
5.7. ORMONI TIROIDEI.....	15
5.8. MELATONINA, PROLATTINA ED EFFETTO FOTOPERIODO .....	16
6. REGOLAZIONE CIRCADIANA DEI PARAMETRI FISIOLÓGICI.....	18
7. REGOLAZIONE CIRCADIANA DELL'ALIMENTAZIONE.....	20
7.1. TEMPO DI ALIMENTAZIONE.....	20
7.2. VARIAZIONI RUMINALI.....	21
7.3. METABOLISMO NUTRIENTI.....	22
7.4. NEFA e BHB.....	22
8. ORMONI E ATTIVITÀ RIPRODUTTIVA .....	25
9. REGOLAZIONE CIRCADIANA DELLA RIPRODUZIONE .....	26
9.1. NUCLEO SOPRACHIASMATICO .....	26
9.2. NEURONI GnRH.....	26
9.3. NEURONI KISSPEPTINA .....	27
9.4. IPOFISI.....	27
9.5. FUNZIONE UTERINA.....	27
9.6. FUNZIONE OVARICA .....	28
9.7. CONCLUSIONI .....	28

10. FISIOLOGIA DELLA LATTAZIONE.....	29
11. REGOLAZIONE CIRCADIANA DELLA LATTAZIONE.....	30
11.1. MELATONINA.....	31
11.2. PARAMETRI ANTIOSSIDANTI, INDICATORI IMMUNITARI e ORMONI .....	31
11.3. LEGAME TRA ALIMENTAZIONE e PRODUZIONE DI LATTE.....	32
12. MONITORAGGIO DELLE VARIAZIONI DEL RITMO CIRCADIANO IN ALLEVAMENTI DI BOVINE DA LATTE.....	33
12.1. MALATTIE.....	33
12.2. FASE CICLO RIPRODUTTIVO .....	33
13. TECNOLOGIE IN AIUTO DELL'ALLEVATORE .....	34
13.1. SISTEMI DI LOCALIZZAZIONE E RACCOLTA AUTOMATICA DEI DATI FISIOLOGICI DELL'ANIMALE .....	34
13.2. AMS.....	35
13.3. ALIMENTAZIONE AUTOMATICA.....	35
BIBLIOGRAFIA .....	36

## RIASSUNTO

L'allevamento della bovina da latte vede nella produzione di latte la sua principale fonte di redditività. Massimizzare la produzione di latte e rispettare il benessere animale sono quindi gli scopi principali perseguiti dalle tecniche di allevamento attuate. Le diverse attività fisiologiche vengono influenzate da numerosi fattori esterni ed interni all'animale, e risultano regolate dal ritmo circadiano, un sistema in grado di ottimizzare il coordinamento temporale delle varie funzioni metaboliche al fine di far fronte ai cambiamenti a cui va incontro l'animale, siano essi di natura ambientale, patologica o fisiologica.

Scopo di questa trattazione è quello di analizzare cause e conseguenze del ritmo circadiano e il ruolo che esso ricopre nella fisiologia degli animali destinati alla produzione di latte, in relazione anche alle varie tecniche di allevamento adottate nelle stalle al giorno d'oggi.

## ABSTRACT

Dairy farming sees milk production as its main source of profitability. Maximizing milk production and respecting animal welfare are therefore the main goals pursued by the breeding techniques implemented. The different physiological activities are influenced by numerous factors external and internal to the animal, and are regulated by the circadian rhythm, a system capable of optimizing the temporal coordination of the various metabolic functions in order to cope with the changes that the animal undergoes, be they of an environmental, pathological or physiological nature.

The purpose of this discussion is to analyze causes and consequences of the circadian rhythm and the role it plays in the physiology of animals intended for milk production, also in relation to the various farming techniques adopted in farms today.

## 1. INTRODUZIONE

L'allevamento della bovina da latte ha raggiunto al giorno d'oggi livelli produttivi elevati. Le statistiche ufficiali dell'Associazione Italiana Allevatori (AIA) per l'anno 2021 hanno evidenziato una produzione media in Italia di 9564 kg di latte/vacca a lattazione, corrispondenti a 31.36 l/vacca/giorno se si considera una lattazione standard di 305 giorni. Questo dato ha subito nel corso degli anni un aumento significativo, che vede oggi più che raddoppiata quella che era la produzione di latte media del 1962 (4127 kg/vacca/lattazione). All'origine di questo notevole aumento produttivo vi sono senza dubbio il miglioramento genetico e il progresso tecnologico.

Il primo ha portato all'aumento della capacità produttiva delle bovine attraverso la selezione di animali geneticamente più performanti, che grazie all'applicazione dei vari protocolli di selezione dei riproduttori ha garantito il progresso genetico degli animali presenti nelle stalle italiane. Alla selezione genetica si è affiancata la progressiva sostituzione delle razze tipiche del territorio italiano con animali più performanti, naturalmente predisposti ad una produzione maggiore di latte.

Un ulteriore slancio alla produzione è stato dato dal progresso tecnologico e scientifico, che ha consentito un miglioramento delle condizioni e delle tecniche di allevamento applicate nelle stalle italiane, modificando nel corso degli anni le modalità di alimentazione, stabulazione, gestione sanitaria e della riproduzione degli allevamenti.

Se inizialmente l'obiettivo primario era quello di massimizzare la redditività degli allevamenti attraverso l'aumento delle produzioni, negli ultimi anni l'attenzione si è spostata verso il benessere animale, tematica centrale nelle politiche agrarie comunitarie del prossimo decennio.

Già Hughes nel 1976 definisce il benessere animale come “uno stato di salute completo, sia fisico che mentale, in cui l'animale è in armonia con il suo ambiente”. Qualche anno dopo, nel 1979, il Farm Animal Welfare Council ha delucidato il concetto di Hughes attraverso la formulazione della teoria delle cinque libertà che stanno alla base della tutela del benessere animale:

1. libertà dalla fame, dalla sete e dalla cattiva nutrizione;
2. libertà dai disagi ambientali;
3. libertà dalle malattie e dalle ferite;
4. libertà di poter manifestare le caratteristiche comportamentali specie-specifiche;
5. libertà dalla paura e dallo stress.

Risulta evidente come l'uomo e le tecniche di allevamento da lui attuate condizionino notevolmente lo stato di benessere degli animali allevati durante tutte le fasi del ciclo produttivo a cui vanno incontro.

Il benessere animale è importante non solo dal punto di vista etico, ma anche da quello produttivo, in quanto va a influenzare il metabolismo e la fisiologia dell'animale, con ripercussioni sullo stato di salute e sulla qualità e quantità della produzione, sia essa di carne o latte.

Comprendere i meccanismi metabolici e fisiologici che stanno alla base del corretto funzionamento del “sistema” animale e i fattori che vanno ad inficiare su di esso diventa quindi fondamentale per ottimizzare produzione e stato di benessere animale e sviluppare nuove tecnologie innovative per il settore zootecnico.

In questa trattazione verrà analizzato uno dei principali meccanismi di regolazione dell’organismo, il sistema circadiano, con l’obiettivo di comprendere quali sono i fattori che influiscono su di esso e le ripercussioni che ha sulla fisiologia e la produzione animale, con uno sguardo alle condizioni ambientali esterne che ne orientano il funzionamento. Il tutto in un’ottica di applicabilità nella gestione dell’allevamento della bovina da latte.



## 2. REGOLAZIONE FISIOLÓGICA

La fisiologia animale è la scienza che studia le funzioni degli organismi animali e mira a conoscere le cause, le condizioni e le leggi che determinano e regolano i fenomeni vitali (Sherwood, Klandorf, & Yacey, 2006, p.1). Alla base della fisiologia vi sono i meccanismi di regolazione delle funzioni metaboliche dell'organismo, che hanno come obiettivo quello di mantenere lo stato di benessere dell'animale indipendentemente dalle condizioni ambientali e dalla fase del ciclo di vita in cui esso si ritrova.

Sono stati identificati due principali tipi di regolazione che interagiscono tra loro, l'omeostasi e l'omeoresi.

Con il termine omeostasi si definisce la tendenza naturale di un organismo vivente a mantenere uno stato di equilibrio stabile indipendentemente dalle interazioni con l'ambiente esterno (Ray & Phoha, 2005). Si tratta di un meccanismo di regolazione a breve termine, che consente agli organismi di funzionare in una serie di condizioni ambientali e adattarsi ad esse. Agisce attraverso circuiti di feedback avviati da segnali esterni che innescano una serie di processi metabolici finalizzati a riportare l'organismo all'equilibrio.

L'omeoresi è invece un meccanismo di regolazione a lungo termine che esprime il potenziale genetico dell'animale all'interno di un dato ambiente al fine di perseguire il fine evolutivo della specie (Sauvant & Lovatto, 2005). È caratterizzato da una natura cronica, essendo basato su regolazioni che richiedono ore o giorni, ed influenza più tessuti simultaneamente.

Uno dei principali sistemi di regolazione dell'omeostasi e dell'omeoresi è il sistema circadiano, che genera ritmi fisiologici e comportamentali di 24h al fine di sincronizzare in modo ottimale i processi fisiologici e comportamentali dell'organismo tra loro e in relazione agli stimoli ambientali e nutrizionali esterni (Sjaastad, Sand, & Hove, 2013, p. 247).

## 3. SISTEMA CIRCADIANO

Il sistema circadiano, sviluppatosi in tutti gli organismi al fine di adattare il corpo ai cicli quotidiani del giorno e della notte, si basa su orologi biologici interni. Questi generano i ritmi circadiani, cicli di 24 ore che stanno alla base delle variazioni fisiologiche e comportamentali a cui va incontro l'organismo durante la giornata. Tra i principali aspetti regolati dai ritmi circadiani vi sono la temperatura corporea, il ritmo sonno-veglia, la secrezione ormonale, l'attività quotidiana (Sjaastad, Sand, & Hove, 2013, p. 247-249).

All'interno di ogni ritmo circadiano si possono individuare tre caratteristiche principali:

- periodo, di circa 24 ore nei mammiferi, che corrisponde al tempo che trascorre tra due picchi;

- fase, che riflette dove si verificano il picco e il minimo del ritmo;
- ampiezza, ovvero la differenza tra il picco e il minimo del ritmo.

Variazioni di queste tre caratteristiche base di ogni ritmo portano a sfasamenti (spostamento della fase, dovuto principalmente a cambiamenti nell'esposizione alla luce), variazioni dell'ampiezza (che riflettono la forza del pacemaker da cui è indotto il ritmo) e cambiamenti di periodo (allungamento o accorciamento).

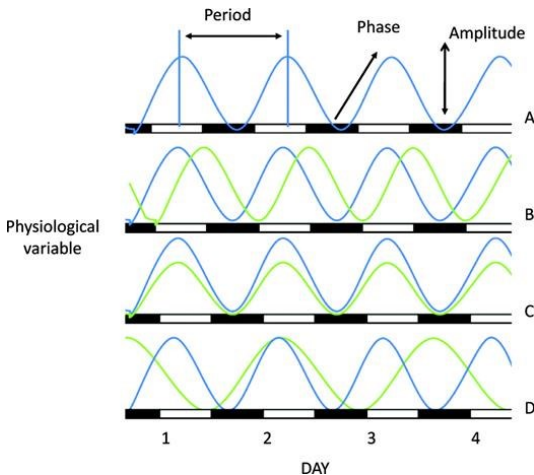


Figura 1.

Caratteristiche dei ritmi circadiani e variazioni che possono subire. B) spostamento della fase; C) variazione dell'ampiezza; D) cambiamento del periodo. (Casey e Plaut 2012)

#### 4. OROLOGI BIOLOGICI

Alla base dei ritmi circadiani vi sono gli orologi biologici molecolari, presenti in ogni cellula dell'organismo.

Ogni orologio biologico è costituito da tre componenti che ne regolano il funzionamento:

- input, cioè lo stimolo che innesca il funzionamento dell'orologio. Si tratta solitamente di eventi temporali o variazioni ambientali che si verificano regolarmente a cui gli orologi sincronizzano i ritmi circadiani, ad esempio stimolazione luminosa, legame dell'ormone ai recettori cellulari.
- device, o orologio stesso, composto da un circuito di feedback molecolare di trascrizione e traduzione, con componenti positive e negative, che porta ad un'espressione oscillante dei geni all'interno della cellula.

Nei mammiferi, i geni responsabili della regolazione del circuito di feedback sono geni conservati (geni che rimangono simili in organismi distanti tra loro dal punto di vista evolutivo). I principali sono i geni CLOCK e ARNTL (o BMAL1), che costituiscono l'anello positivo del circuito di feedback, e PER e CRY, componenti negative del circuito. La stimolazione del ritmo avviene grazie all'azione dell'eterodimero formato da CLOCK:ARNTL, che agisce come fattore di

trascrizione dei geni di output dell'orologio legandosi all'E-box. Inoltre, CLOCK:ARNTL guida anche l'espressione genica dei geni che agiscono da repressori del ritmo (PER:CRY).

L'espressione del gene ARNTL è regolata anche da due dei suoi bersagli trascrizionali, i recettori nucleari Rev-erba e Rora, che agiscono rispettivamente da promotori e inibitori andando a competere per lo stesso elemento promotore.

- output, ovvero il bersaglio del gene cellulare dell'orologio, che subirà le modifiche dettate dal ritmo circadiano innescato.

Questi ritmi circadiani dell'espressione genica si traducono in variazioni giornaliere delle funzioni cellulari, metaboliche e fisiologiche, che portano al coordinamento e alla sincronizzazione dei vari sistemi e organi dell'animale (Casey, Plaut e Boerman 2022).

Il principale orologio biologico è l'orologio circadiano centrale, che si trova nei nuclei soprachiasmatici (SCN) dell'ipotalamo. È composto da più oscillatori circadiani, che nel loro insieme generano output che regolano i ritmi fisiologici e comportamentali e sincronizzano gli orologi periferici presenti nei vari organi (Sherwood, Klandorf, & Yacey, 2006, p.263).

Le oscillazioni ritmiche dell'orologio principale non sono esattamente di 24 ore, ma vengono regolate da segnali ambientali (zeitgeber) che si verificano regolarmente e impediscono la deriva fuori fase del ritmo (Sherwood, Klandorf, & Yacey, 2006, p.258).

Il più importante tra i segnali ambientali che regolano l'orologio principale è il ciclo luce-buio, che si basa sulla capacità della retina di percepire lo stimolo luminoso e inviarne informazione al SCN. Altri stimoli che fungono da input per l'orologio principale sono l'attività fisica, la disponibilità di cibo, lo stress, le condizioni ambientali. Il SCN integra poi tra loro queste informazioni e le traduce in segnali ormonali e autonomici (regolati cioè dal Sistema Nervoso Autonomo), che andranno a regolare il funzionamento degli orologi periferici fungendo da input per questi ultimi.

Nello specifico, il SCN comunica con il resto del corpo attraverso tre principali vettori: la rete neuronale, attraverso il contatto diretto con altre regioni del Sistema Nervoso, con molecole chimiche di segnalazione o indirettamente impostando ritmi riposo-attività e alimentazione-digiuno che fungono da zeitgeber principali per la sincronizzazione del ritmo (Gnocchi e Bruscalupi 2017).

A livello periferico, gli orologi molecolari ricevono gli input inviati dall'orologio principale, e generano output specifici per ciascun tessuto, in grado di regolarne la funzionalità.

La sincronizzazione degli orologi periferici è provocata dal trascinarsi diretto che il SCN opera attraverso segnali neuronali ed ormonali, dai ritmi alimentazione-digiuno e dalla temperatura corporea.

Il controllo neuronale viene garantito dal Sistema Nervoso Autonomo, un sistema involontario costituito da una branca simpatica e da una parasimpatica, tra loro opposte nelle funzioni.

La branca simpatica, detta anche “combatti e fuggi”, si attiva in situazioni di allerta e comporta la mobilitazione delle riserve corporee. Le sue principali funzioni sono di aumento della frequenza cardiaca, aumento della pressione arteriosa, vasocostrizione e diminuzione dell’attività digestiva. Durante la sinapsi, i neuroni pre-gangliari liberano acetilcolina, mentre i post-gangliari liberano noradrenalina. Unica eccezione in cui sono assenti i neuroni post-gangliari è la midollare del surrene, le cui cellule secernono direttamente adrenalina o noradrenalina in risposta.

La branca parasimpatica del SNA è detta anche “digestione e riposo”, e ha come obiettivo quello di conservare e ristabilire le riserve corporee. Le risposte del parasimpatico possono essere riassunte nell’acronimo SLUDD (salivazione, lacrimazione, urinazione, digestione, defecazione). Il neurotrasmettitore liberato durante le sinapsi è acetilcolina (Sjaastad, Sand, & Hove, 2013, p. 148-155).

I ritmi alimentazione-digiuno influenzano la regolazione degli orologi di diversi organi periferici quali cuore, fegato, reni e pancreas, in quanto la maggior parte dei geni coinvolti nella regolazione delle vie metaboliche che coinvolgono questi organi sono espressi in modo circadiano. I ritmi alimentazione-digiuno possono agire anche indirettamente nella regolazione dei ritmi periferici, attraverso la sintesi di ormoni quali colecistochinina, leptina, grelina, ossintomodulina e peptide YY (Gnocchi e Bruscalupi 2017).

## 5. REGOLAZIONE CIRCADIANA ORMONALE

Tra i principali strumenti usati dall'organismo come output degli orologi biologici vi sono gli ormoni. A sua volta, la sintesi ormonale è regolata dagli orologi molecolari e interagisce con i fattori esterni per mantenere l'omeostasi fisiologica. Essendo sintesi endocrina e ritmi circadiani strettamente interconnessi, le disregolazioni circadiane possono avere conseguenze notevoli sull'attività ormonale e fisiologica dell'organismo.

Gli ormoni sono sostanze chimiche secrete da cellule endocrine, che vengono poi liberate nel circolo sanguigno e trasportate alle cellule bersaglio, dove legano recettori specifici. Possono essere sostanze idrosolubili (peptidi o derivati da aminoacidi, come le catecolamine) che legano recettori di membrana, oppure liposolubili (steroidi, tiroidei o eicosanoidi) che legano recettori intracellulari (Sjaastad, Sand, & Hove, 2013, p. 212-219).

Diversi ormoni presentano oscillazioni giornaliere. I principali che sono stati studiati sono melatonina, cortisolo, steroidi gonadici, prolattina, ormone tiroideo e ormone della crescita. A questi si aggiungono alcuni ormoni sensibili ai nutrienti, la cui sintesi è cioè influenzata dai livelli di principi nutritivi assorbiti e che vengono regolati in parte da stimoli ambientali (tempo di alimentazione, cicli luce-buio).

### 5.1. VASOPRESSINA

La vasopressina (ormone antidiuretico, ADH) è prodotta dai nuclei paraventricolari e supraottici dell'ipotalamo, e trasportata all'ipofisi posteriore, da dove viene poi rilasciata nel sistema circolatorio. Ha come bersaglio i reni, andando a favorire il riassorbimento di acqua nei reni al fine di prevenire la disidratazione. Ha inoltre funzione di regolatore autocrino e stimolatore dell'attività neuronale (Sjaastad, Sand, & Hove, 2013, p. 222).

La sintesi della vasopressina è regolata direttamente dall'orologio centrale (Gnocchi e Bruscalupi 2017).

### 5.2. ACETILCOLINA

L'acetilcolina (ACh) è un neurotrasmettitore, ormone coinvolto nella trasmissione degli impulsi nervosi sia a livello di Sistema Nervoso Centrale che di Sistema Nervoso Periferico (Sjaastad, Sand, & Hove, 2013, p. 112).

Viene rilasciata durante la veglia e l'attività motoria, mentre si ha un rilascio ridotto durante il sonno. Non vi sono tuttavia studi sufficienti a chiarire il ruolo che questo ormone svolge nella regolazione dei ritmi circadiani (Gnocchi e Bruscalupi 2017).

### 5.3. ORMONE ADRENOCORTICOTROPO

L'ormone adrenocorticotropo (ACTH) è rilasciato dalle cellule corticotrope dell'ipofisi ed è responsabile del rilascio di glucocorticoidi dalla corteccia surrenale. Tra le funzioni principali dell'ACTH vi è quella di regolazione del metabolismo epatico, oltre ad essere un precursore dell'aldosterone (Sherwood, Klandorf, & Yacey, 2006, p.286).

La sua immissione in circolo è repressa dalla luce, ed è probabilmente influenzata dal SCN attraverso le connessioni dell'ipofisi al nucleo paraventricolare (Gnocchi e Bruscalupi 2017).

### 5.4. CORTISOLO

Il cortisolo è un ormone appartenente alla famiglia degli ormoni glucocorticoidi. Questi ormoni sono prodotti nella zona fascicolare della corticale del surrene. Il cortisolo è un ormone catabolico che stimola la degradazione di grassi e proteine, la gluconeogenesi e inibisce l'utilizzo di glucosio, provocando quindi un aumento della concentrazione di glucosio ematico e della produzione di energia. La sintesi di cortisolo è regolata dai ritmi circadiani, stimolata da ACTH, da una ridotta concentrazione di glucosio ematico, dallo stress (Sherwood, Klandorf, & Yacey, 2006, p.284-286).

Il cortisolo viene rilasciato per molte ore dopo aver incontrato un fattore di stress e una volta raggiunta la concentrazione richiesta di cortisolo, questo esercita un feedback negativo sull'ipotalamo, restituendo l'omeostasi sistemica. I livelli di picco di questo ormone vengono raggiunti circa 30 minuti dopo il risveglio: questo picco precoce è noto come risposta al risveglio del cortisolo. I livelli diminuiscono durante il giorno, fino al raggiungimento del livello più basso che si verifica durante la prima fase del sonno. Si evidenziano però degli aumenti del livello di cortisolo in prossimità dell'orario previsto per l'alimentazione. Tuttavia, l'esposizione prolungata a fattori di stress può portare alla sovrastimolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi, con conseguente fluttuazione dei livelli di cortisolo ematico (Jones e Gwenin 2021).

Queste variazioni cicliche dipendono dai segnali ipotalamici: il nucleo soprachiasmatico dell'ipotalamo riceve segnali dalla retina che gli permettono di sincronizzarsi col ritmo solare e, mandando input all'adenoipofisi tramite CRH (ormone di rilascio della corticotropina) e AVP (vasopressina), modula la secrezione circadiana di ACTH, svolgendo una funzione di pacemaker per la sintesi di cortisolo.

I glucocorticoidi possono modulare l'espressione dei geni controllati dall'orologio in fegato, reni e tessuti adiposi. Sono stati inoltre identificati come modulatori chiave per la risincronizzazione dell'orologio centrale (Gnocchi e Bruscalupi 2017).

## 5.5. INSULINA e GRELINA

Insulina e grelina sono due ormoni fondamentali nella regolazione metabolica, e la loro secrezione ed attività sono strettamente regolate dai meccanismi circadiani (Gnocchi e Bruscalupi 2017).

L'insulina è un ormone anabolico secreto dalle cellule beta del pancreas endocrino. È una proteina prodotta a partire dalla proinsulina. La sua produzione è stimolata da un'elevata glicemia, da elevati livelli di amminoacidi e di acidi grassi nel sangue. Inoltre, il suo rilascio è indotto dal peptide inibitorio gastrico, stimolato dal SNA parasimpatico e inibito da SNA simpatico. Anche la somatostatina inibisce il rilascio di insulina. Le principali funzioni dell'insulina sono di riduzione della glicemia, della concentrazione di acidi grassi e amminoacidi nel sangue (Sjaastad, Sand, & Hove, 2013, p. 244-246).

L'orologio centrale controlla la secrezione di insulina; a sua volta l'insulina, insieme al glucosio, è in grado di influenzare il funzionamento dell'orologio circadiano (Gnocchi e Bruscalupi 2017).

La grelina è secreta dalle cellule parietali dello stomaco all'avvicinarsi dell'orario di alimentazione presunto, secondo l'orologio circadiano periferico dello stomaco. L'azione principale della grelina è infatti quella di stimolare l'appetito (Gnocchi e Bruscalupi 2017).

## 5.6. GH

Il GH, o ormone della crescita, viene rilasciato dall'adenoipofisi su stimolo del GHRH (ormone di rilascio del GH). Può avere un effetto diretto o mediato dalle IGF-1 (somatomedine) rilasciate dal fegato. Gli effetti diretti del GH riguardano l'aumento del numero e del volume delle cellule dei tessuti molli, aumento della sintesi proteica e di lipolisi e glicolisi; l'effetto mediato dalle IGF-1 riguarda invece uno stimolo della crescita del sistema scheletrico. Secrezioni anomale di GH possono portare ad una crescita anomala dell'organismo. Quando la risposta viene raggiunta, le IGF-1 inibiscono il rilascio di GH e GHRH e stimolano la produzione di GHIH (somatostatina). La secrezione di GH è stimolata da situazioni di stress e malnutrizione o da altri ormoni, mentre è inibita da situazioni di obesità (Sjaastad, Sand, & Hove, 2013, p. 227-229).

L'esame della secrezione di GH nelle vacche in lattazione è di particolare interesse a causa dell'effetto positivo del GH sulla produzione di latte. Le concentrazioni periferiche di GH seguono un ritmo circadiano, con il picco massimo che si verifica verso le 6:30 e il minimo intorno alle 18:20 (Lefcourt, et al. 1995).

## 5.7. ORMONI TIROIDEI

Gli ormoni tiroidei sono prodotti su stimolo di TRH (ormone di rilascio della tireotropina) e TSH (tireotropina) e sono tiroxina (T4, 98.5%) e triiodotironina (T3, 1.5%), ormoni liposolubili prodotti a

partire da iodio e tirosina. Lo iodio (ioduro nel sangue) si lega alla tirosina (aminoacido presente nella tireoglobulina, Tg), portando alla formazione di MIT (I+Tg) e DIT (2I+Tg). Successivamente tramite leganti covalenti si legano tra loro MIT+DIT=T3 e DIT+DIT=T4, che entrano nel circolo sanguigno legati alla tireoglobulina. La secrezione degli ormoni tiroidei è stimolata da TRH, TSH e dalle basse temperature, mentre è inibita da alti livelli degli ormoni tiroidei in circolo (meccanismo a feedback negativo), aumento della temperatura corporea, malnutrizione e digiuno. Le principali funzioni degli ormoni tiroidei sono di aumento del metabolismo basale, crescita e sviluppo del Sistema Nervoso Centrale nel feto e durante l'infanzia, vasodilatazione, aumento della frequenza respiratoria e aumento della velocità di conduzione degli impulsi nervosi (Sjaastad, Sand, & Hove, 2013, p. 231-235).

Le concentrazioni medie di triiodotironina e tiroxina plasmatiche seguono ritmi circadiani simili con minimi (05:00-13:00 h) e massimi (17:00-02:00 h) separati da 12 ore. La triiodotironina raggiunge il picco 2 ore prima della tiroxina. Il ritmo circadiano della tiroxina precede il ritmo circadiano della temperatura corporea di circa 2 ore, e questo dimostra come la secrezione di ormoni tiroidei contribuisca significativamente alla termoregolazione corporea (Bitman, Kahl, et al. 1994).

## 5.8. MELATONINA, PROLATTINA ED EFFETTO FOTOPERIODO

Per comprendere l'importanza della variazione del ciclo luce-buio sulla fisiologia animale è sufficiente analizzare il meccanismo che vi è alla base.

La percezione delle informazioni legate al fotoperiodo inizia con la ricezione della luce da parte della retina, e la trasmissione dell'informazione al SCN. Quest'ultimo comunica le informazioni fotoperiodiche alla ghiandola pineale (epifisi) attraverso un percorso multisinaptico che stimola la produzione e il rilascio di melatonina, e ne regola il ritmo circadiano e stagionale di sintesi. Lo stimolo luminoso funge da inibitore della secrezione di melatonina, che si verifica invece durante la notte. La melatonina attiva a sua volta recettori specifici del cervello e dell'ipofisi che regolano la secrezione ormonale a valle (Dardente, et al., 2010).

La produzione di melatonina raggiunge quindi il picco durante la notte, tra le 24:00 e le 03:00, inducendo attività negli animali notturni e riposo in quelli diurni (Gnocchi e Bruscalupi 2017).

Nei mammiferi, la secrezione di prolattina è stimolata dai fotoperiodi lunghi, mentre è inibita dai fotoperiodi corti. La variazione dei livelli di prolattina è influenzata dall'effetto regolatore che svolge la melatonina sulla pars tuberalis (peduncolo dell'ipofisi), il sito di sintesi degli ormoni ipofisari. Tra questi ormoni prodotti vi sono anche le tuberuline, fattori di rilascio della prolattina che agiscono sui lattotrofi, cellule ipofisarie responsabili della secrezione della prolattina (Dardente, et al. 2010).



La melatonina viene sintetizzata anche in alcuni tessuti periferici, come l'apparato digerente, la retina, la pelle, i linfociti e il midollo osseo, permettendo così la regolazione di altre funzioni fisiologiche attraverso segnali paracrini.

Tra le varie funzioni che va ad influenzare la melatonina vi sono la regolazione della pressione sanguigna, la modulazione del sistema immunitario e la distruzione dei radicali liberi (Gnocchi e Bruscalupi 2017).

Il fotoperiodo è quindi determinante nella sintesi degli ormoni responsabili della produzione di latte. In alcune specie (le specie monoestrali o poliestrali stagionali), il fotoperiodo influenza l'inizio della stagione riproduttiva, condizionando il rilascio di ormoni all'interno dell'asse riproduttivo al fine di adattare lo stato riproduttivo al periodo dell'anno in cui vi è la più alta possibilità di sopravvivenza per la prole e la madre (Sen e Hoffmann 2020).

In tutte le specie invece la secrezione di diversi ormoni coinvolti nella sfera riproduttiva, come l'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH), l'ormone luteinizzante (LH) e l'ormone follicolo-stimolante (FSH) è regolata dalla melatonina (Gnocchi e Bruscalupi 2017).

## 6. REGOLAZIONE CIRCADIANA DEI PARAMETRI FISIOLÓGICI

La conoscenza degli indicatori biologici che riflettono lo stato degli animali e della loro variazione nell'arco della giornata è fondamentale al fine di comprendere i cambiamenti metabolici cui l'animale va incontro per aumentare la produttività e l'efficienza dei processi fisiologici.

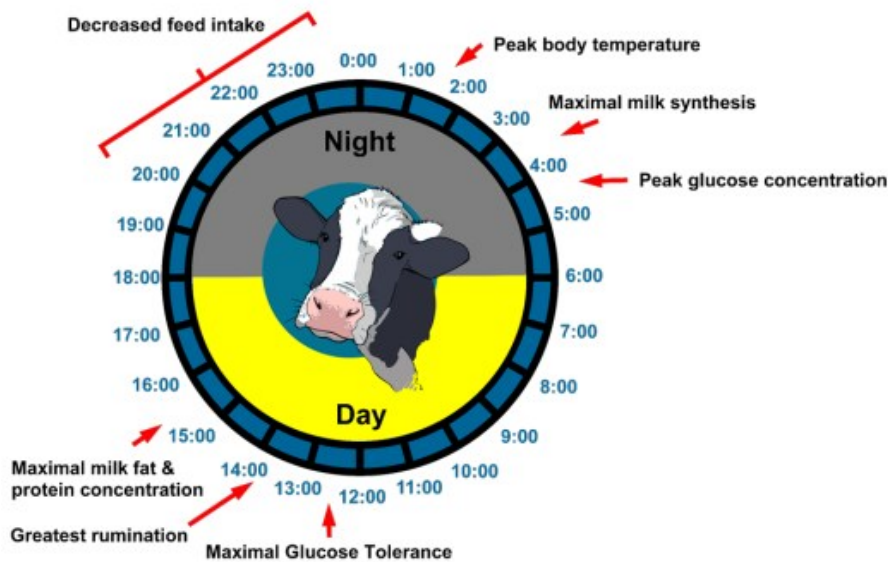


Figura 2.

Ritmo circadiano di produzione e fisiologia di una bovina nel corso della giornata (immagine modificata da Salfer 2021).

Si riportano di seguito nozioni relative alla regolazione dei principali parametri fisiologici, analizzando anche i dati ottenuti da uno studio (Giannetto e Piccione 2009) che ha monitorato simultaneamente 25 diverse variabili fisiologiche in bovine da latte, riscontrando ritmicità circadiana per 12 variabili tra quelle analizzate.

Tra le variabili che hanno mostrato un ritmo circadiano, alcune hanno evidenziato il picco nel mezzo della fase di luce. Tra queste vi sono l'attività locomotoria, la frequenza respiratoria e la concentrazione di creatinina nel sangue.

Il picco per ritmo dell'urea, NEFA e fosforo è stato raggiunto all'inizio della fase di luce.

Invece per quanto riguarda le concentrazioni nel sangue di emoglobina, glucosio, colesterolo totale, lipidi totali e magnesio, il picco è stato raggiunto durante le ore di buio.

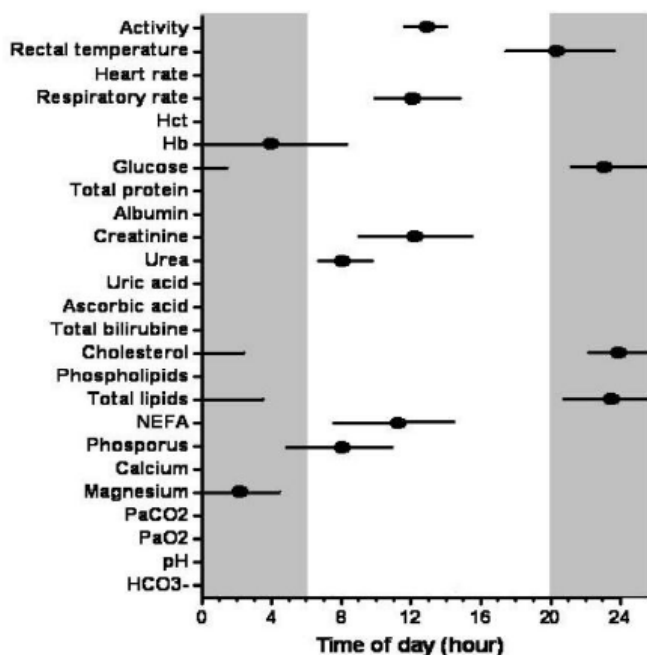


Figura 3. Acrofase dei ritmi delle principali variabili fisiologiche. Il pallino indica il momento medio di picco, le linee orizzontali rappresentano gli intervalli di confidenza al 95% delle medie. Le aree grigie rappresentano le fasi di buio (Giannetto e Piccione 2009).

La temperatura corporea segue un ritmo giornaliero costante, che raggiunge il picco durante la notte (Bitman, Lefcourt, et al. 1984). Il ritmo giornaliero della temperatura corporea dipende inoltre anche dalla stagione, con un ritmo più stazionario in estate (I. J. Salfer 2021).

Lo studio dell'attività locomotoria nelle vacche (Giannetto e Piccione 2009) ha evidenziato una concentrazione della stessa durante le ore di luce, con diversi episodi di attività durante le ore di buio di minore intensità e durata rispetto a quelli osservati nella fase di luce.

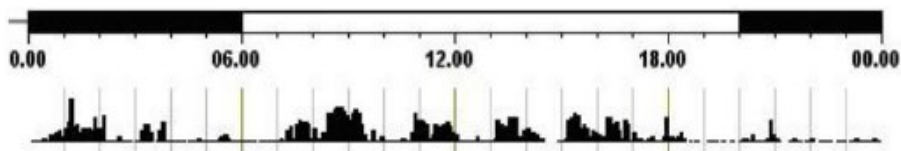


Figura 4. Attività locomotoria delle bovine registrata durante periodi consecutivi di 5 minuti, indicata dalle aste nere verticali. Le barre bianche e nere orizzontali indicano i periodi di luce e buio (Giannetto e Piccione 2009).

## 7. REGOLAZIONE CIRCADIANA DELL'ALIMENTAZIONE

È già stato evidenziato come uno dei principali fattori di variazione degli orologi dei tessuti periferici sia l'assunzione di cibo, in grado di influenzare il ritmo circadiano indipendentemente dal ciclo luce-buio. Per meglio comprendere la ritmicità circadiana della produzione, è necessario quindi approfondire come gli orologi circadiani e le funzionalità fisiologiche dell'organismo variano in funzione delle scelte alimentari adottate dall'allevatore.

### 7.1. TEMPO DI ALIMENTAZIONE

Le vacche da latte in genere trascorrono dalle 3 alle 5 ore ad alimentarsi, e consumano la maggior parte della loro razione in 8-14 pasti durante il giorno. Negli animali al pascolo, il modello di alimentazione è prevalentemente crepuscolare, con alta frequenza dei pasti che si verificano principalmente al mattino presto (6:00-10:00) e a metà pomeriggio (15:00-17:00) e alimentazione minima durante la notte (I. J. Salfer 2021). Nei sistemi di allevamento tradizionali invece il modello giornaliero di assunzione della razione è stabilito dalle scelte manageriali dell'allevatore, che stabilisce frequenza e orario di distribuzione della razione.

Uno studio (I. J. Salfer 2021) ha esaminato le conseguenze dell'applicazione di un digiuno di 8 ore durante la notte o durante la metà del pomeriggio. È stato riscontrato che le vacche sottoposte a digiuno diurno hanno avuto una risposta molto più forte al digiuno rispetto a quelle sottoposte a digiuno notturno, con un aumento di tre volte del livello di mobilitazione di grasso. Le vacche sottoposte a digiuno diurno hanno mangiato una percentuale maggiore di razione nelle due ore successive al digiuno rispetto alle altre vacche, indice di una maggiore risposta alla fame nel post digiuno. L'effetto dell'alimentazione notturna sul tasso di assunzione del mangime si verifica anche in assenza di digiuno, sebbene in misura minore rispetto a quanto rilevato con questo studio.

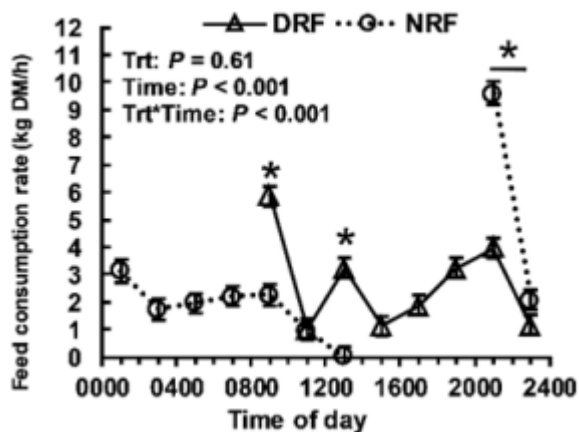


Figura 5.

Impatto del digiuno notturno (DRF) e diurno (NRF) sul modello giornaliero di assunzione della razione (I. J. Salfer 2021).

## 7.2. VARIAZIONI RUMINALI

È stato osservato (Ying, et al. 2015) come il pool ruminale di sostanza secca, amido e NDF abbia subito variazioni giornaliere nelle dimensioni, raggiungendo livelli minimi prima dell'alimentazione. Sono stati inoltre osservati chiari schemi giornalieri nei quantitativi di ammoniaca ruminale e concentrazioni di VFA (AGV, acidi grassi volatili), con un picco di ammoniaca al mattino (7:00) e un picco di VFA alla sera (19:00).

Anche il pH ruminale segue un andamento giornaliero, con un picco immediatamente prima del pasto e un minimo 10-12 ore dopo l'alimentazione.

La produzione di metano segue uno schema giornaliero simile a quello della concentrazione di VFA.

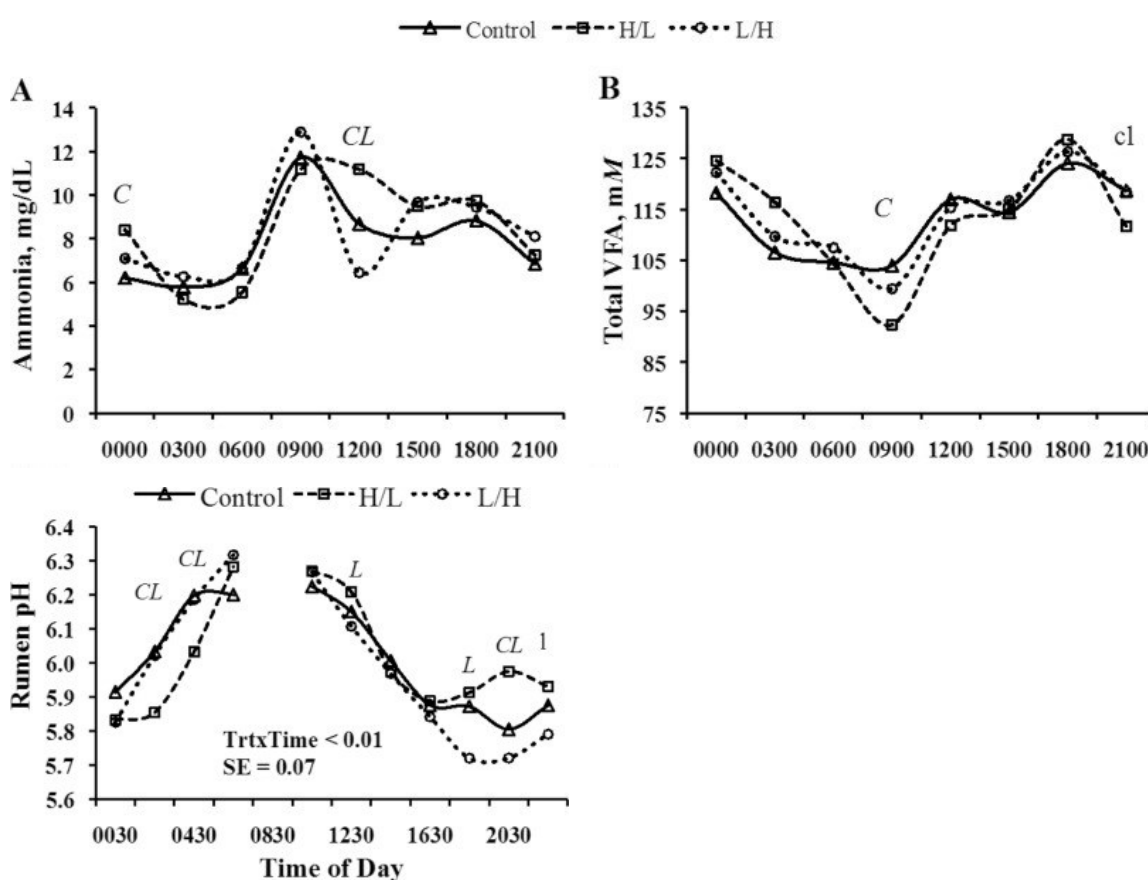


Figura 6.

Variazioni del livello di ammoniaca, VFA e pH ruminale durante la giornata. Lo studio citato aveva come obiettivo la comparazione di tre diete: controllo, dieta ad alto livello di fibra e dieta a basso livello di fibra (Ying, et al. 2015).

Il modello giornaliero di assunzione, condizionando i parametri biochimici del rumine, determina cambiamenti giornalieri nella popolazione microbica presente all'interno dei prestomaci. Vi è un aumento della popolazione batterica in seguito all'alimentazione, poiché è disponibile maggior substrato. La diversità batterica varia durante la giornata, con maggiore variabilità nei momenti

successivi all'alimentazione, ed è influenzata dalla composizione della dieta, con diete a basso contenuto di fibra che causano minore diversità batterica (I. J. Salfer 2021).

### 7.3. METABOLISMO NUTRIENTI

I ritmi circadiani, oltre a regolare l'assunzione di mangime, influenzano anche i tempi delle vie metaboliche interne dell'organismo al fine di garantire all'animale disponibilità di energia e metaboliti strutturali nei momenti della giornata di maggiore necessità. Il catabolismo (degradazione di molecole complesse in composti semplici, con liberazione di energia) è sincronizzato con il periodo attivo della giornata, al fine di fornire all'animale l'energia necessaria per il movimento. L'anabolismo (sintesi di molecole complesse a partire da composti semplici, con consumo di energia) invece si verifica durante le ore notturne, al fine di immagazzinare energia per gli usi successivi.

I ritmi della secrezione di glucagone (principale ormone catabolico) e insulina (principale ormone anabolico) non sono solamente influenzati dal tempo di alimentazione, ma seguono un ritmo giornaliero specifico. Nello studio di (Salfer, Matamoros e Harvatine, *Glucose tolerance appears to follow a daily rhythm in dairy cows* 2020), in bovine alimentate ogni 2h ore con somministrazione di alimento fresco e quindi non influenzate dal tempo di ingestione, è stato osservato un pattern giornaliero di secrezione di insulina, con un picco attorno a mezzogiorno. Questi risultati indicano un potenziale beneficio nel selezionare gli orari più efficaci di somministrazione di specifici farmaci. Ad esempio, la somministrazione orale di glicole propilenico o di glucosio per via endovenosa può essere più efficace nell'alleviare la chetosi se somministrata intorno a mezzogiorno rispetto al mattino. Futuri studi sulla "cronoterapia" nelle vacche da latte potrebbero essere utili al fine di determinare se ci sono tempi ottimali per determinate terapie. Altri studi recenti suggeriscono che anche la funzione immunitaria delle vacche da latte segue un ritmo giornaliero, fornendo ulteriore supporto all'ipotesi che potrebbero esserci effetti benefici nel trattare le vacche tenendo conto del loro ritmo circadiano (Alhussien e Dang 2018).

### 7.4. NEFA e BHB

Prendendo come riferimento uno studio (Couperus, et al. 2021) condotto con l'obiettivo di identificare e confrontare i principali biomarcatori specifici per la lattazione e le variazioni che essi subiscono, è possibile osservare come i livelli sierologici di acidi grassi non esterificati (NEFA) e beta-idrossbutirrato (BHB) siano caratterizzati da una ritmicità giornaliera, dallo stadio di lattazione e dal tempo di somministrazione dell'alimento.

Nelle vacche in tarda lattazione, il livello di NEFA subisce un forte aumento dopo l'ultima assunzione della razione, con un picco che si verifica alle 6:00, seguito da una diminuzione dopo la prima

assunzione di razione. Le diminuzioni postprandiali sono dovute all'azione dell'insulina. Nelle due-tre ore successive alla prima assunzione è stato osservato un livello basale di NEFA, per poi aumentare progressivamente di notte, successivamente all'ultima assunzione di alimento giornaliera, con un picco alle 6:00. Questa ritmicità è inoltre influenzata dallo stadio di lattazione ed è maggiormente regolata dal feed intake nelle vacche durante la fase centrale (high) e in tarda lattazione (Figura 7.) Studi aggiuntivi dimostrano inoltre come la concentrazione di NEFA sia correlata alla sintesi di latte e quindi alla fase anabolica che avviene durante la lattazione, mentre nelle vacche in asciutta (dry) la concentrazione rimane a livelli basali.

Per quanto riguarda il BHB è stata osservata una diminuzione continua dopo l'ultima assunzione di alimenti, seguita da un forte aumento successivo alla prima assunzione. In questo caso, l'aumento postprandiale è probabilmente dovuto alla chetogenesi ruminale indotta dalla razione ingerita: il propionato e il butirrato, prodotti dalle fermentazioni ruminali, vengono infatti metabolizzati a BHB.

I risultati esposti indicano come l'assunzione della razione sia uno dei fattori che maggiormente condizionano la regolazione circadiana dei livelli di NEFA e BHB nelle vacche durante la fase centrale (high) e durante la fase ultima (late) di lattazione.

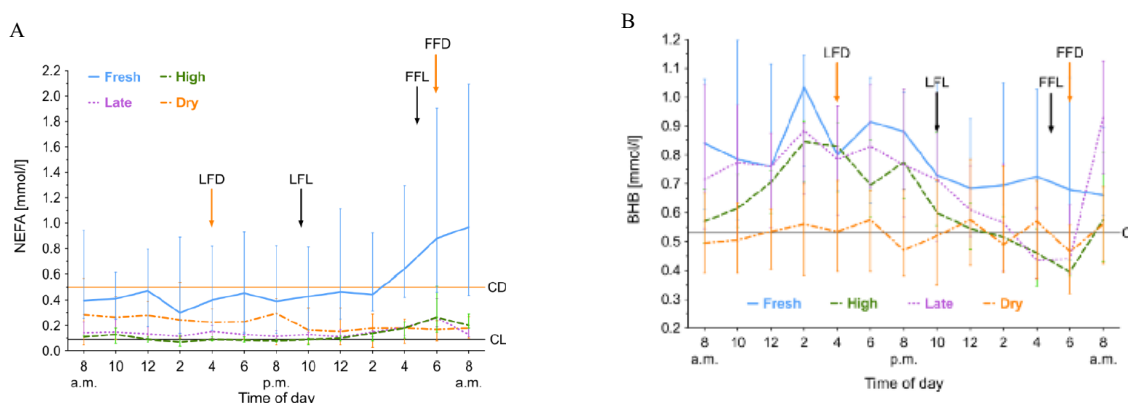


Figura 7. Variazione delle concentrazioni di NEFA (grafico A) e BHB (grafico B) nelle bovine durante le diverse fasi di lattazione (Couperus, et al. 2021).

Per quanto riguarda le bovine monitorate nella prima fase di lattazione le concentrazioni di NEFA e BHB risultano significativamente maggiori rispetto agli animali nelle altre fasi di lattazione e seguono un pattern molto diverso, e meno influenzato da quello alimentare. La concentrazione di NEFA in costante aumento e la mancanza dei cambiamenti postprandiali attesi in NEFA e BHB dimostrano le sfide metaboliche e l'instabilità della vacca in prima fase di lattazione.

In un'ottica di applicabilità dei risultati alle tecniche gestionali dell'allevamento, concentrazioni elevate del livello basale di NEFA e BHB potrebbero essere indice precoce di patologie metaboliche quali chetosi e lipidosi epatica. Queste patologie rappresentano tutt'oggi alcune tra le principali cause

di malattia riscontrate nelle prime fasi di lattazione, comportando effetti negativi per la salute delle bovine e la produzione di latte. Risulta evidente come riuscire a prevenire e individuare precocemente queste malattie sia il principale metodo di salvaguardia del benessere delle bovine e della produzione lattea. Nello studio, rispetto ai dati ottenuti, viene quindi suggerito il prelievo di sangue per misurazioni singole entro tre ore dalla prima assunzione di alimento fino a due ore dopo l'ultima assunzione della giornata.



## 8. ORMONI E ATTIVITÀ RIPRODUTTIVA

È già stato evidenziato come la secrezione di diversi ormoni coinvolti nella sfera riproduttiva, l'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH), l'ormone luteinizzante (LH) e l'ormone follicolo-stimolante (FSH), sia regolata dalla melatonina (Gnocchi e Bruscalupi 2017).

Per meglio comprendere le ripercussioni del ritmo circadiano sulla sfera riproduttiva femminile, è necessario approfondire la fisiologia che vi è alla base.

All'interno dell'ovaio sono prodotte le cellule uovo (oociti) e secreti gli ormoni steroidei sessuali (estrogeni e progesterone). La cellula uovo è inizialmente contenuta nei follicoli, costituiti da cellule della teca esterne e cellule della granulosa interne, che secernono estrogeni. L'aumento degli estrogeni determina l'ovulazione, cioè la liberazione delle cellule uovo dal follicolo. Le cellule del follicolo si trasformano in cellule luteiniche, che secernono progesterone.

Questo avviene nelle varie fasi del ciclo estrale, composto da una fase follicolare (proestro ed estro) e da una fase luteale (metaestro e diestro). Durante il proestro si ha la maturazione del follicolo e la secrezione di estrogeni. Questo porta all'aumento del livello di estrogeni che a loro volta stimolano la produzione di LH. Quando viene raggiunto il picco di produzione dell'LH si ha l'ovulazione (estro), ovvero la deiscenza del follicolo dominante e la fuoriuscita dell'oocita maturo. Si ha quindi l'inizio del metaestro, con la formazione del corpo luteo emorragico, la secrezione di progesterone e la trasformazione delle cellule della teca in cellule luteiniche. Nell'ultima fase del ciclo estrale, il diestro, si ha ancora la secrezione di progesterone e la maturazione del corpo luteo. Il corpo luteo maturo diventa gravidico se c'è la gravidanza; in questo caso la secrezione di progesterone continua. Se invece non è avvenuta la fecondazione, il corpo luteo diventa albicante e si innesca la luteolisi, completata nel proestro successivo; in questo caso la secrezione di progesterone si blocca. La luteolisi è indotta dalla secrezione di prostaglandine (PGF2a); in caso di gravidanza non si ha la produzione di PGF2a in quanto questa è inibita dai fattori di riconoscimento della gravidanza prodotti dal feto.

I principali ormoni coinvolti nella regolazione del ciclo estrale sono:

- GnRH, ormone di rilascio delle gonadotropine, secreto dall'ipotalamo, stimola il rilascio di gonadotropine da parte dell'adenoipofisi
- FSH, ormone follicolo-stimolante, secreto dall'adenoipofisi, induce lo sviluppo dei follicoli e la secrezione di estrogeni e di inibina (feedback negativo su FSH per mantenerne costante il livello)
- LH, ormone luteinizzante, secreto dall'adenoipofisi, è responsabile dello sviluppo finale del follicolo, dell'ovulazione (picco LH), della formazione del corpo luteo e della secrezione di progesterone
- estrogeni, secreti dalle cellule follicolari, provocano l'estro, le manifestazioni estrali, lo sviluppo uterino e la produzione di muco uterino

- progesterone, secreto dalle cellule del corpo luteo, responsabile del mantenimento della gravidanza (Sjaastad, Sand, & Hove, 2013, p. 693-707).

La sintesi di questi ormoni è regolata principalmente da due categorie di neuroni, i neuroni kisspeptina e i neuroni dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH). I neuroni kisspeptina sono adibiti a stimolare i neuroni di rilascio del GnRH, promuovendo a livello ipofisario il rilascio di FSH e LH nel flusso sanguigno (Sen e Hoffmann 2020).

## 9. REGOLAZIONE CIRCADIANA DELLA RIPRODUZIONE

La regolazione dei modelli combinati di rilascio degli ormoni riproduttivi è garantita dall'orologio circadiano molecolare, collegato ad ogni aspetto della fisiologia riproduttiva, dallo sviluppo follicolare al parto. Le alterazioni a carico dell'orologio centrale o di quelli periferici presenti nei tessuti dell'apparato riproduttivo portano a modelli irregolari di secrezione ormonale (Sen e Hoffmann 2020). In passato, è stata documentata la presenza di orologi molecolari funzionali in tutti i tessuti dell'apparato riproduttivo maschile e femminile, ad eccezione dello sperma. Di seguito vengono analizzati i ruoli degli orologi molecolari presenti nei tessuti legati alla riproduzione nelle femmine.

### 9.1. NUCLEO SOPRACHIASMATICO

È già stato in precedenza evidenziato come il SCN svolga un ruolo fondamentale nella generazione dei ritmi circadiani, in quanto sede dell'orologio principale. Inoltre, negli anni, è stato studiato che il SCN genera un segnale giornaliero in grado di moltiplicare il picco di LH e indurre l'ovulazione. Rimane tuttavia ancora poco chiaro quali siano le popolazioni neuronali del SCN coinvolte nella sincronizzazione della funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (Sen e Hoffmann 2020). Altri studi (De la Iglesia e Schwartz 2006) hanno dimostrato come lesioni al SCN aboliscono la ciclicità estrale e il picco di LH preovulatorio. Le lesioni, se gravi, possono anche provocare l'interruzione del passaggio degli assoni dei neuroni responsabili del rilascio di GnRH; piccole lesioni parziali sono risultate invece inefficaci nel causare anomalie di ritmo. Da sottolineare però come i ritmi circadiani di fisiologia e comportamento possono essere influenzati da microlesioni mirate a specifiche sottoregioni del SCN.

### 9.2. NEURONI GnRH

I neuroni GnRH svolgono un ruolo centrale di integrazione dei segnali periferici e centrali, al fine di adattare la frequenza dell'impulso GnRH per bilanciare il rilascio di FSH e LH dall'ipofisi. La

combinazione tra afferenze SCN sui neuroni GnRH, aumento dei livelli di estrogeni e stimolazione della kisspeptina è responsabile del rilascio temporizzato di GnRH e del conseguente picco di LH. Inoltre, l'orologio molecolare interno dei neuroni GnRH guida l'espressione ritmica del recettore della kisspeptina e del rilascio di GnRH (Sen e Hoffmann 2020).

### 9.3. NEURONI KISSPEPTINA

I neuroni kisspeptina, direttamente coinvolti nella riproduzione, si trovano nel nucleo paraventricolare anteroventrale (AVPV) e nel nucleo arcuato dell'ipotalamo. Questi neuroni sono regolati attraverso feedback dagli steroidi sessuali. Nello specifico, i neuroni AVPV mediano il feedback positivo promuovendo il picco di LH, attraverso la rilevazione di elevati livelli di estrogeni, mentre i neuroni del nucleo arcuato mediano il feedback negativo. Entrambe queste due popolazioni neuronali sono caratterizzate da un orologio molecolare, che non sembra però condizionare la tempistica del picco di LH e i normali schemi di rilascio di LH e FSH dall'ipofisi (Sen e Hoffmann 2020).

### 9.4. IPOFISI

Le cellule gonadotrope ipofisarie sono responsabili della secrezione di FSH e LH in risposta agli impulsi dettati dai livelli di GnRH. La presenza di un orologio molecolare in queste cellule non condiziona fortemente la loro ritmicità di funzionamento e secrezione, ma provoca solo un leggero aumento dei livelli di LH nel proestro e un aumento di FSH nell'estro, senza influenze sulla fertilità. L'orologio delle cellule gonadotrope svolge quindi un ruolo marginale nella risposta di queste cellule agli input ormonali e nella secrezione di LH e FSH (Sen e Hoffmann 2020).

### 9.5. FUNZIONE UTERINA

Nei mammiferi il travaglio si verifica solitamente durante la fase di riposo della giornata, quindi di notte per le specie diurne. I meccanismi che regolano il momento di inizio del travaglio variano in base alla specie, e includono segnali dal feto, dal SCN materno e fetale e dall'utero. A livello ormonale, l'inizio del travaglio coincide con una maggiore sensibilità dell'utero all'ossitocina e alla melatonina, ormoni responsabili delle contrazioni uterine. Il cambiamento quotidiano della sensibilità uterina a questi due ormoni suggerisce che vi sia un ruolo dei ritmi circadiani nell'adattamento della sensibilità uterina agli stimoli. L'orologio molecolare uterino sembra inoltre essere coinvolto nell'impianto dell'embrione e nel parto. Tra i regolatori dei ritmi circadiani uterini vi sono gli

estrogeni e il progesterone. Non è tuttavia chiaro quali siano le cause del cambiamento della sensibilità uterina agli ormoni nei vari stadi di vita dell'animale (Sen e Hoffmann 2020).

## 9.6. FUNZIONE OVARICA

Le gonadotropine influenzano la tempistica e l'ampiezza di espressione dei geni dell'orologio nelle cellule ovariche. Attualmente si pensa che l'orologio delle cellule follicolari regoli la sensibilità del follicolo preovulatorio e lo prepara alle successive fasi del ciclo estrale, facendo coincidere la sua maturazione con il picco di LH e causando l'ovulazione. Si ritiene inoltre che l'espressione genica nell'ovaio indotta da LH sia mediata dall'orologio circadiano, che influenza ad esempio la sintesi di prostaglandine agendo sul gene che produce COX-2 (ciclossigenasi 2), un enzima che regola la velocità di sintesi delle prostaglandine. Questo aspetto è di fondamentale importanza per il successo dell'ovulazione, in quanto è alla base dei meccanismi con cui l'orologio ovarico prepara le cellule della granulosa al picco di LH e alla successiva transizione a corpo luteo funzionale. L'orologio circadiano dell'ovaio svolge poi un ruolo importante anche nella regolazione della sintesi degli steroidi, andando ad influenzare l'espressione dei geni responsabili della sintesi di questi ormoni.

## 9.7. CONCLUSIONI

Da questa analisi si evince come nei mammiferi il sistema circadiano svolga un ruolo importante anche nell'attività della sfera riproduttiva, andando ad influenzare il funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi. Restano tuttavia ancora da chiarire nel dettaglio i meccanismi che stanno alla base della regolazione circadiana della sintesi degli ormoni sessuali e della fisiologia dell'apparato riproduttore, e di come questi a loro volta influenzino la ritmicità degli orologi centrale e periferici.

## 10. FISILOGIA DELLA LATTAZIONE

L'analisi e la comprensione dei fattori che stanno alla base della fase produttiva nella vita della bovina da latte (la lattazione) sono un aspetto importante nella valutazione della redditività dell'allevamento e dei margini di miglioramento delle tecniche applicate.

L'attitudine della bovina a produrre latte in quantità sufficiente a garantire la crescita e lo sviluppo del neonato è determinata da fattori che vanno ad influenzare le cellule secernenti del tessuto mammario e l'attività metabolica che sta alla base di questo processo fisiologico.

La lattazione a livello fisiologico può essere suddivisa in tre fasi: mammogenesi, lattogenesi e galattopoiesi (Casey, Plaut e Boerman 2022).

La mammogenesi è un processo che comporta lo sviluppo e la crescita della ghiandola mammaria in seguito a modificazioni delle caratteristiche istologiche e ormonali, e si sviluppa in tutte le fasi della vita dell'animale. Durante la vita fetale si ha la formazione delle linee e gemme mammarie (capezzoli). Fino ai primi tre mesi di vita lo sviluppo è isometrico, ovvero si ha una crescita del tessuto mammario allo stesso ritmo degli altri tessuti corporei. Dopo i tre mesi la crescita dei tessuti mammari diventa allometrica, ovvero avviene con un ritmo maggiore rispetto al resto del corpo. Con la pubertà inizia lo sviluppo dei dotti e delle ramificazioni, a discapito del tessuto adiposo che in precedenza costituiva la ghiandola mammaria. Durante la gravidanza, infine, si ha lo sviluppo completo dei lobuli e degli alveoli. La crescita allometrica avviene grazie alla secrezione di estrogeni, GH e cortisolo che si verifica all'inizio della pubertà. Nella fase prepuberale la mammogenesi è inibita da diete ricche di energia, che stimolano la produzione di tessuto adiposo, ed è stimolata da diete a ridotto contenuto energetico. Durante la gravidanza la ramificazione dei dotti e lo sviluppo degli alveoli sono stimolati dalla secrezione di estrogeni, progesterone, GH, lattogeno placentare e prolattina (Sjaastad, Sand, & Hove, 2013, p. 733-735).

La lattopoiesi è un processo di differenziazione attraverso il quale le cellule alveolari mammarie acquisiscono la capacità di secernere latte. Si verifica in prossimità del parto, in seguito alla caduta del livello di progesterone e all'aumento di estrogeni, e vede un progressivo reclutamento delle cellule epiteliali mammarie che subiscono differenziazione e iniziano a produrre le componenti del latte. Il calo del progesterone determina l'attivazione dei processi di sintesi delle varie componenti del latte e della prolattina. L'aumento degli estrogeni stimola la sintesi e la liberazione della prolattina e la sintesi di caseina e lattosio. La sintesi di prolattina stimola la produzione di proteine del latte e lattosio, e favorisce il comportamento materno. L'aumento del cortisolo stimola la crescita del reticolo endoplasmatico rugoso e dell'apparato di Golgi delle cellule epiteliali, aumentando la sintesi delle componenti del latte. L'aumento del GH provoca un aumento del flusso ematico mammario. Gli ormoni tiroidei e l'insulina infine stimolano l'approvvigionamento di substrati nelle cellule epiteliali (Sjaastad, Sand, & Hove, 2013, p. 735-737).

Il mantenimento della produzione continua di latte, la galattopoiesi, è garantito dalla rimozione del latte dalla mammella, con conseguente riduzione della pressione intralveolare. L'accumulo di latte nella mammella provoca l'aumento della pressione endomammaria e della concentrazione nel latte di una proteina, il Fattore Inibente la Lattazione (FIL), che inibisce la sintesi del latte. Rimuovendo il latte dalla mammella si stimola il rilascio di prolattina, si diminuisce la pressione intramammaria e si rimuove l'accumulo di FIL, consentendo la sintesi di ulteriore latte (Sjaastad, Sand, & Hove, 2013, p. 737).

L'emissione del latte è possibile grazie al riflesso neuroendocrino dell'eiezione, mediato dall'ossitocina. L'impulso nervoso si innesca quando vengono sollecitate le terminazioni nervose della mammella e dei capezzoli (con la suzione da parte del vitello o con il lavaggio che precede la mungitura). L'informazione tattile, tramite fibre nervose spinali, raggiunge l'ipotalamo, dove l'informazione viene trasmessa mediante sinapsi con le cellule neuroendocrine che hanno terminazioni nervose nell'ipofisi posteriore. Queste cellule producono ossitocina, che viene trasportata tramite gli assoni all'ipofisi posteriore. Quando le cellule neuroendocrine vengono stimulate, l'ossitocina viene rilasciata nel sangue e trasportata in tutto il corpo.

Nella mammella, l'ossitocina si lega ai recettori di membrana delle cellule mioepiteliali che circondano gli alveoli e alle pareti dei piccoli dotti escretori, provocando la contrazione delle cellule mioepiteliali, aumentando la pressione nel lume alveolare e inducendo l'eiezione del latte (Sjaastad, Sand, & Hove, 2013, p. 747-750).

Al momento dello svezzamento o dell'asciutta, i regolatori negativi della produzione di latte si accumulano negli alveoli e ne stimolano l'involutione. A livello sistemico si ha la riduzione degli ormoni galattopoietici, e la ghiandola mammaria viene rimodellata ad uno stato di non lattazione.

Risulta evidente come mammogenesi, lattogenesi e galattopoiesi siano strettamente coordinate con i cambiamenti ormonali a cui va incontro l'animale durante la gravidanza e il parto. L'interruzione dei fattori che regolano le varie fasi della lattazione può influire notevolmente sulla capacità della ghiandola mammaria di produrre latte e quindi sulla produttività dell'animale.

## 11. REGOLAZIONE CIRCADIANA DELLA LATTAZIONE

Gli adattamenti fisiologici e metabolici che si verificano durante la transizione della bovina attraverso i vari stadi riproduttivi includono anche alterazioni dei ritmi circadiani che regolano aspetti fisiologici e comportamentali, sia a livello di orologio centrale che di orologi periferici (fegato e ghiandola mammaria).

Tra la fine della gravidanza e l'inizio della lattazione si ha un aumento dell'espressione dei geni dell'orologio centrale e del fegato, presumibilmente indice di incremento nella sincronizzazione, coordinazione e produzione dell'orologio (Casey, Plaut, & Boerman, 2022). In contrasto con questo aumento dell'ampiezza, si attenua l'espressione dei geni dell'orologio nella ghiandola mammaria. È stato ipotizzato che gli orologi metabolici rispondano ai segnali metabolici inviati dal vitello, funzionando indipendentemente dall'orologio principale e determinando segnali fondamentali per il funzionamento della ghiandola mammaria. Durante la lattazione, infatti, la priorità diventa la sopravvivenza del neonato, e l'orologio mammario risponde alle esigenze del vitello comunicate attraverso la suzione.

Negli allevamenti moderni la mungitura sostituisce l'atto della suzione, e diventa per la bovina l'input necessario per il funzionamento dell'orologio circadiano centrale, andando a stimolare il rilascio di glucocorticoidi, ossitocina e prolattina. Questi ormoni vanno poi ad agire a livello di ghiandola mammaria, inducendo la produzione e l'eiezione del latte.

La produzione di latte segue un ritmo giornaliero, con il volume totale di latte che raggiunge il picco al mattino e le percentuali di grasso e proteine che raggiungono il picco alla sera (I. J. Salfer 2021), senza mostrare però differenze significative nella composizione del latte diurno e notturno (Teng, et al. 2021). Oltre a queste, anche altre componenti oscillano nel corso della giornata (I. J. Salfer 2021).

### 11.1. MELATONINA

I livelli di melatonina nel sangue e nel latte mostrato un ritmo circadiano. È stato osservato che i livelli di melatonina nel sangue e nel latte sono elevati durante le ore di buio e bassi nelle ore di luce. Il livello di melatonina è aumentato dopo le ore 21:00, raggiungendo un plateau alle 23:00. Il picco massimo si è verificato alle 01:00. Alle 07:00 il livello di melatonina è sceso nuovamente al livello basale (Castro, et al. 2011).

Inoltre, in estate la concentrazione di melatonina nel latte è inferiore rispetto all'inverno. Queste variazioni sono dovute alla diversa illuminazione (Teng, et al. 2021).

### 11.2. PARAMETRI ANTIOSSIDANTI, INDICATORI IMMUNITARI e ORMONI

È stato osservato che i parametri antiossidanti, gli indicatori immunitari e alcuni ormoni sono presenti nel latte a diverse concentrazioni in base al momento della mungitura. Le concentrazioni di malondialdeide (principale target citotossico, prodotto dell'ossidazione dei lipidi) sono superiori nel latte diurno rispetto a quello notturno. I livelli dei principali indicatori immunitari sono minori nel latte notturno. Il livello di interferone- $\gamma$  (citochina prodotta dai linfociti T con funzione di inibizione

della replicazione e della diffusione dei virus e rafforzamento delle cellule preposte alla difesa immunitaria) è maggiore nel latte notturno. La maggior parte degli ormoni non presenta variazioni quantitative tra il latte notturno e quello diurno, ad eccezione della melatonina (Teng, et al. 2021).

### 11.3. LEGAME TRA ALIMENTAZIONE e PRODUZIONE DI LATTE

Lo spostamento dell'orario di alimentazione alla sera ha invertito i ritmi di sintesi del latte, provocando un picco nel volume di latte alla sera e un picco delle quantità di nutrienti presenti al mattino. Questi cambiamenti nei ritmi di sintesi del latte dovuti all'alimentazione sembrano essere in parte modulati da cambiamenti che si verificano nell'orologio circadiano mammario (I. J. Salfer 2021).

Anche i tempi di assorbimento dei singoli nutrienti della razione possono influire sulla produzione di latte. Uno studio (I. J. Salfer 2021) effettuato al fine di esaminare i ritmi che stanno alla base della produzione di latte e della concentrazione di metaboliti, ha evidenziato che la durata della disponibilità delle proteine nell'intestino tenue influenza la resa di grasso nel latte. Questo suggerisce che una dieta ricca di proteine al mattino e povera di proteine la sera può avere benefici sulla produzione di latte.

Un aumento nella somministrazione di acidi grassi serali ha portato ad un aumento della percentuale di grasso nel latte. Si è tuttavia rilevato un calo del quantitativo di latte prodotto, azzerando di fatto l'aumento assoluto della quantità di grasso nel latte (Salfer e Harvantine 2019). La somministrazione di acetato non ha influenzato la produzione giornaliera di latte, ma ha avuto impatti sui ritmi giornalieri della produzione e dei componenti del latte (Matamoros, Salfer e Harvantine 2020).



## 12. MONITORAGGIO DELLE VARIAZIONI DEL RITMO CIRCADIANO IN ALLEVAMENTI DI BOVINE DA LATTE

Studi effettuati su allevamenti commerciali, con l'ausilio di sistemi di localizzazione in tempo reale dell'animale e rilevazione dell'attività fisica, hanno consentito di studiare le variazioni comportamentali dell'animale in relazione al suo stato di salute (Wagner, et al., 2021).

Sulla base dei dati forniti da questi sensori viene calcolato il tempo trascorso dall'animale a riposare, stare in piedi, camminare e mangiare. Tramite un sistema di Machine Learning può essere identificato il ritmo circadiano di queste attività basilari, includendo le variazioni dovute all'età, alla razza degli animali, alla progettazione della stalla (es. numero e luogo di riposo e alimentazione aree), variabili di gestione degli animali (es. distribuzione alimentare o mungitura tempo), dieta, stagione e altro. In questo studio (Wagner, et al., 2021) i dati di animali in calore, durante il parto o che hanno subito eventi stressanti (es. episodi di mastite, zoppie, cambi di box, cambi di alimentazione) sono stati comparati con quelli ottenuti da un campione di animali che non manifestavano eventi particolari. Incrociando questi dati, quindi, è stato possibile far luce sulla relazione tra il ritmo circadiano e episodi di stress, malattie ed eventi riproduttivi.

### 12.1. MALATTIE

Le malattie sono state ben predette con questo metodo, in particolare gli effetti provocati da zoppia, mastite e altre malattie. Variazioni del ritmo circadiano sono state riscontrate in media nelle 36 ore precedenti la manifestazione dell'evento di zoppia, in media nelle 24 ore precedenti l'evento di mastite e in media nelle 32 ore precedenti le altre malattie (Wagner, et al. 2021).

### 12.2. FASE CICLO RIPRODUTTIVO

Gli eventi studiati che riguardano la sfera riproduttiva sono stati estro e parto. Questi eventi sono facilmente identificabili da sistemi che si basano sulla registrazione della posizione e dell'attività dell'animale, in quanto l'estro comporta iperattività nella bovina, mentre l'avvicinarsi del parto induce la bovina a sdraiarsi.

Per quanto riguarda il parto, sono state rilevate anomalie nel ritmo circadiano nelle 30 ore precedenti il verificarsi dell'evento. L'estro invece ha indotto modificazioni del ritmo circadiano nel giorno stesso dell'evento (Wagner, et al. 2021).

### 13. TECNOLOGIE IN AIUTO DELL'ALLEVATORE

Abbiamo visto come le implicazioni del ritmo circadiano sulla fisiologia delle bovine sono molteplici e comprendono vari aspetti di essa. In un'ottica di ottimizzazione delle tecniche di allevamento adottate, queste considerazioni possono aiutare notevolmente gli allevatori a massimizzare produttività, benessere e stato di salute degli animali allevati.

Al giorno d'oggi vi sono in commercio vari strumenti tecnologici che permettono di monitorare costantemente i livelli di attività degli animali e i loro principali parametri fisiologici, consentendo agli allevatori di organizzare la gestione della mandria sulla base delle esigenze della stessa.

Tra questi, i più diffusi sono i sistemi di localizzazione e raccolta dei dati fisiologici in tempo reale degli animali, i sistemi di mungitura automatica e i sistemi di alimentazione automatica.

#### 13.1. SISTEMI DI LOCALIZZAZIONE E RACCOLTA AUTOMATICA DEI DATI FISIologici DELL'ANIMALE

I sistemi di localizzazione e raccolta dei dati fisiologici in tempo reale dell'animale (podometri, attivometri, collari) sono sempre più diffusi negli allevamenti di bovine da latte. Questi sistemi consentono all'allevatore di verificare il tempo trascorso dagli animali nelle varie aree della stalla, e/o le attività che svolgono in esse (alimentazione, riposo, mungitura, attività fisica).

Come evidenziato dallo studio citato in precedenza (Wagner, et al. 2021), vi è una stretta correlazione tra il ritmo circadiano e i parametri misurabili da queste nuove tecnologie.

L'identificazione delle interruzioni del ritmo circadiano potrebbe permettere all'allevatore di identificare precocemente casi di malattia o stress e consentire un suo intervento tempestivo.

Il rilevamento precoce dell'estro e del parto ottenuto grazie allo studio delle variazioni del ritmo circadiano di alcune attività quali ruminazione e attività motoria, rappresenta un fattore di rilevante importanza nella gestione dell'allevamento, in quanto consente un intervento tempestivo da parte dell'allevatore. Questo porta ad un miglioramento dell'efficacia nella gestione della riproduzione in stalla, in quanto consente di identificare la finestra migliore in cui intervenire con l'inseminazione artificiale e allerta l'allevatore sul fronte dell'assistenza al parto delle vacche.

L'identificazione di anomalie nel ritmo dovute a malattie riscontrabili nei due giorni precedenti potrebbe consentire all'allevatore di effettuare una diagnosi precoce della malattia, consentendo di ridurre gli effetti negativi sullo stato di salute dell'animale e intervenire con trattamenti rapidi e meno impattanti per l'animale. Questo, in un'ottica di riduzione dell'uso di antibiotici promosso dalle politiche europee, rappresenta un importante strumento di prevenzione e primo intervento per gli allevatori. Questi strumenti possono essere sfruttati anche in un'ottica di fenotipizzazione degli

animali sulla base della loro sensibilità agli eventi stressanti, aspetto base nella selezione di animali resilienti. Gli animali resilienti, ovvero animali in grado di trasferire i propri geni alla generazione seguente sapendo resistere alle sfide ambientali a cui vanno incontro, rappresentano l'animale tipo da allevare in stalla, al fine di minimizzare le problematiche che presentano le bovine durante la loro vita produttiva e ridurre gli interventi necessari.

### 13.2. AMS

I sistemi di mungitura automatizzata (AMS), che negli ultimi anni hanno visto aumentare l'interesse nei loro confronti da parte degli allevatori, consentono all'animale di scegliere il momento in cui essere munto. Uno studio (I. J. Salfer 2021) ha rilevato che la frequenza di visite al robot di mungitura è correlata al modello di assunzione del mangime, con le vacche che aumentavano la frequenza di visita al robot nella fascia oraria 6:00-16:00. Sono stati pochi gli studi effettuati al fine di comprendere i fattori che influenzano il momento in cui le bovine preferiscono essere munte, ma si pensa vi sia connessione con il ritmo circadiano degli animali. In prospettiva futura, migliorare la conoscenza dei ritmi circadiani di comportamento delle bovine potrebbe consentire di intervenire al fine di massimizzare il flusso delle vacche attraverso l'AMS, ottimizzando le varie fasi giornaliere che caratterizzano l'attività animale.

### 13.3. ALIMENTAZIONE AUTOMATICA

Negli ultimi anni è cresciuto l'interesse anche verso i sistemi di alimentazione automatizzata. Questi sistemi, oltre a diminuire la manodopera necessaria per l'alimentazione negli allevamenti, consentono di aumentare la frequenza di distribuzione della razione. Questo si ripercuote a livello fisiologico con una maggiore stabilità delle fermentazioni ruminali (I. J. Salfer 2021), riducendo i rischi di patologie metaboliche e squilibri nutrizionali.

I sistemi di mungitura e alimentazione automatizzati permettono all'allevatore di applicare strategie di alimentazione più mirate a soddisfare i reali fabbisogni dell'animale nel corso della giornata, in relazione anche alla quantità di latte prodotto e al ritmo circadiano che sta alla base del funzionamento della ghiandola mammaria.

## BIBLIOGRAFIA

- Alhussien, M.N., and A.K. Dang. "Diurnal rhythm in the counts and types of milk somatic cells, neutrophil phagocytosis and plasma cortisol levels in Karan Fries cows during different seasons and parity." *Biological Rhythm Research* 49 (2018): 187-199.
- Bitman, J., A. Lefcourt, D.L. Wood, and B. Stroud. "Circadian and ultradian temperature rhythms of lactating dairy cows." *Journal of Dairy Science* 67 (1984).
- Bitman, J., S. Kahl, D.L. Wood, and A.M. Lefcourt. "Circadian and ultradian rhythms of plasma thyroid hormone concentrations in lactating dairy cows." *American Journal of Physiology* 266 (1994): R1797-R1803.
- Casey, T. M., and K. Plaut. "LACTATION BIOLOGY SYMPOSIUM: Circadian clocks as mediators of the homeorhetic response to lactation." *Journal of Animal Science* Volume 90, no. 3 (Marzo 2012): 744-754.
- Casey, T. M., K. Plaut, and J. Boerman. "Circadian clocks and their role in lactation competence." *Domestic Animal Endocrinology* 78 (2022): 106680.
- Castro, N., M. Spengler, V. Lollivier, O. Wellnitz, H.H.D. Meyer, and R.M. Bruckmaier. "Diurnal pattern of melatonin in blood and milk of dairy cows." *Milchwissenschaft* 66 (2011): 352-352.
- Couperus, A. M., F. Schroeder, R. Klukas, J. Huber, T. Wittek, and J.R. Peham. "Influence of Different Lactation Stages on Circadian Rhythmicity of Metabolic Biomarkers in Dairy Cows: A Pilot Study." *Animals* 11 (2021).
- Dardente, H., et al. "A molecular switch for photoperiod responsiveness in mammals." *Current biology*, Dicembre 2010.
- De la Iglesia, H. O., and W. J. Schwartz. "Minireview: Timely Ovulation: Circadian Regulation of the Female Hypothalamo-Pituitary-Gonadal Axis." *Endocrinology* 147 (2006): 1148-1153.
- Farm Animal Welfare Council. "Press Statement." 1979.
- Giannetto, C., and G. Piccione. "Daily rhythms of 25 physiological variables in Bos Taurus, maintained under natural conditions." *Journal of Applied Biomedicine* 7 (2009).
- Gnocchi, D., and G. Bruscalupi. "Circadian Rhythms and Hormonal Homeostasis: Pathophysiological Implications." *Biology* 6 (2017).
- Hughes. 1976.
- Jones, C., and C. Gwenin. "Cortisol level dysregulation and its prevalence—Is it nature's alarm clock?" *Physiological Reports* 8 (2021).

- Lefcourt, A.M., J. Bitman, D.L. Wood, and R.M. Akers. "Circadian and ultradian rhythms of peripheral growth hormone concentrations in lactating dairy cows." *Domestic Animal Endocrinology* 12 (1995): 247-256.
- Matamoros, C., I. Salfer, and K. Harvantine. "Effect of acetate absorption on the daily rhythm of milk synthesis and plasma hormones and metabolites in dairy cows." *Journal of Dairy Science* 103 (2020).
- Ray, A., and S. Phoha. "Homeostasis and homeorhesis: Sustaining order and normalcy in human-engineered complex systems." 2005.
- Salfer, I. J., Ph. D. "Milk components, nutrition, and circadian rhythms of cows." Università del Minnesota, 2021.
- Salfer, I., and K. Harvantine. "Effect of fatty acid absorption on the daily rhythms of milk synthesis and plasma hormones and metabolites in dairy cows." *Journal of Dairy Science* 102 (2019).
- Salfer, I., C. Matamoros, and K. Harvantine. "Glucose tolerance appears to follow a daily rhythm in dairy cows." *American Dairy Science Association Annual Meeting*, 2020.
- Sauvant, D., and P. Lovatto. "Modelling relationships between homeorhetic and homeostatic control of metabolism: Application to growing pigs." In *Modelling Nutrient Utilization in Farm Animals*, by J. McNamara, J. France and D. Beever, 317-328. New York: CABI Publ., 2005.
- Sen, A., and H.M. Hoffmann. "Role of core circadian clock genes in hormone release and target tissue sensitivity in the reproductive axis." *Molecular and Cellular Endocrinology* 501 (2020).
- Sherwood, L., H. Klandorf, and P. H. Yacey. *Fisiologia degli animali: dai geni agli organismi*. Zanichelli, 2006.
- Sjaastad, O. V., O. Sand, and K. Hove. *Fisiologia degli animali domestici*. Edited by Carlo Tamanini. CEA, 2013.
- Teng, Z.W., et al. "Effects of the circadian rhythm on milk composition in dairy cows: Does day milk differ from night milk?" *Journal of Dairy Science* 104 (2021): 8301-8313.
- Wagner, N., et al. "Detection of changes in the circadian rhythm of cattle in relation to disease, stress, and reproductive events." *Methods* 186 (2021): 14-21.
- Ying, Y., L.W. Rottman, C. Crawford, P.A. Bartell, and K.J. Harvantine. "The effects of feeding rations that differ in neutral detergent fiber and starch concentration within a day on rumen digesta nutrient concentration, pH, and fermentation products in dairy cows." *Journal of Dairy Science* 98 (2015): 4685-4697.