



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse, Naturali e Ambiente

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Animali

TESI DI LAUREA TRIENNALE

**Valutazione della composizione degli acidi grassi plasmatici nella specie
bufalina durante la prima fase di lattazione in base ai livelli di
 β -idrossibutirrato**

Relatore

Prof. Enrico Fiore

Correlatore

Dott. Anastasia Lisuzzo

Laureanda:

Maria Tomiello

Matricola n.

1223106

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

RINGRAZIAMENTI

INDICE

ABSTRACT.....	1
RIASSUNTO.....	3
PREMESSA.....	5
1. COS'È UN ACIDO GRASSO.....	7
1.1 ORIGINE DEI LIPIDI.....	10
2. PROCESSO DI DIGESTIONE DEI RUMINANTI.....	11
2.1 GHIANDOLE SALIVARI.....	13
2.2 GHIANDOLE GASTRICHE.....	13
2.3 FEGATO.....	14
2.4 PANCREAS.....	14
3. DIGESTIONE NEI RUMINANTI.....	16
3.1 FERMENTAZIONE RUMINALE DEI GLUCIDI.....	16
3.2 DIGESTIONE DEI GRASSI.....	17
3.2.1 IDROGENAZIONE E PRODUZIONE DELL'ACIDO STEARICO.....	18
3.2.2 DIGERIBILITA' E ASSORBIMENTO DEGLI ACIDI GRASSI.....	19
3.2.3 ACIDI GRASSI NEL TESSUTO ADIPOSO.....	20
3.2.4 ACIDI GRASSI NEL PLASMA.....	21
3.3 DIGESTIONE DELLE PROTEINE.....	24
4. METABOLISMO.....	25
4.1 METABOLISMO DEI GLUCIDI E DEI GRASSI.....	25
4.1.1 ENERGIA OTTENUTA DAL GLUCOSIO E DAGLI ACIDI GRASSI VOLATILI.....	26
4.1.2 ENERGIA OTTENUTA DAI GRASSI.....	26
4.2 METABOLISMO DELLE PROTEINE.....	27
4.2.1 UTILIZZO DEGLI AMMINOACIDI PER PRODURRE ENERGIA.....	27
5. FABBISOGNI NUTRIZIONALI.....	29
5.1 ECCESSO DI NUTRIENTI E FORMAZIONE DI DEPOSITI ADIPOSI O LATTE.....	31
6. PATOLOGIE METABOLICHE NEL PERIODO DI TRANSIZIONE.....	32

6.1 CHETOSI.....	37
7. MATERIALI E METODI.....	41
7.1 ANIMALI E STALLA.....	41
7.2 PROCEDURE CLINICHE E DISEGNO SPERIMENTALE.....	41
7.3 ANALISI BIOCHIMICHE E DIVISIONE DEL GRUPPO.....	42
7.4 CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE ASSOCIATA ALLA GASCROMATOGRAFIA (TLC-GC).....	43
7.5 ANALISI STATISTICHE.....	46
8. RISULTATI.....	48
9. DISCUSSIONE.....	61
CONCLUSIONI.....	67
BIBLIOGRAFIA.....	69
SITOGRAFIA.....	78

ABSTRACT

Lipid classes as phospholipids (PL), free fatty acids (FFA), triglycerides (TG), and cholesterol esters (CE) may influence energy redistribution, cell metabolism and function.

The aim of this study was to assess changes in lipid classes of Mediterranean buffaloes during early lactation to investigate the metabolic alterations associated with different levels of energy deficit. The study was conducted on 63 Italian Mediterranean buffaloes, coming from a dairy farm located in Caserta, in the first 50 days in milk. The buffaloes were divided into two groups according to their serum β -hydroxybutyrate (BHB) levels: a healthy group (Group H; n=38; BHB < 0.70 mmol/L) and group at risk of hyperketonemia (Group K; n= 25; BHB \geq 0.70 mmol/L). The BCS of the animals was assessed using a 9-points scoring systems (score 4.5 = ideal BCS), using visual inspection and manual palpation of four areas of the body where the animal store fat: ribs, spine, hips and base of the tail.

The BCS is assigned to identify the amount of metabolizable energy stored as fat and muscle in a living animal.

Once the samples were obtained and the biochemical analyses were carried out, the concentration of the fatty acids was evaluated by gas chromatography.

A total of 40 plasma fatty acids was assessed in each lipid class. Of these, 6 PL (C8:0, C16:2 ω 4, C18:1 ω 7, C20:1 ω 9, C22:6 ω 3, C24:1 ω 9), 7 FFA (C18:3 ω 6, C20:1 ω 9, C20:5 ω 3, C22:2 ω 6, C22:4 ω 6, C22:5 ω 3, C24:1 ω 9), 6 TG (C10:0, C12:0, C16: 3 ω 4, C18:1 ω 7, C20:3 ω 3, C24:1 ω 9) and 5 CE (C16:1 ω 7, C16:4 ω 1, C20:3 ω 3, C22:5 ω 3, C22:6 ω 3) of 40 fatty acids of each class showed a significant difference and 2 PL (C18:1 ω 9, C20:1 ω 11), 3 FFA (C16:4 ω 1, C20:3 ω 3, C22:1 ω 9) and 1 TG (C18:2 ω 6) of 40 were tended to significance.

The changes among lipid classes suggest possible relationships with lipid metabolism and inflammation.

Furthermore, possible similarities of buffaloes at risk of hyperketonemia with ketotic cows suggest the necessity of further investigations in these ruminants.

RIASSUNTO

Classi lipidiche come fosfolipidi (PL), acidi grassi liberi (FFA), trigliceridi (TG) ed esteri del colesterolo (CE) possono influenzare la ridistribuzione dell'energia, il metabolismo cellulare e la funzione.

Lo scopo di questo studio è stato valutare i cambiamenti nelle classi lipidiche delle bufale mediterranee durante l'inizio della lattazione per studiare le alterazioni metaboliche associate a diversi livelli di deficit energetico. Lo studio è stato condotto in 63 bufale mediterranee italiane, provenienti da un allevamento situato a Caserta, nei primi 50 giorni di lattazione. Le bufale sono state divise in due gruppi in base al β -idrossibutirrato sierico (BHB): gruppo sano (Gruppo H; n=38; BHB < 0,70 mmol/L) e gruppo a rischio di iperchetonemia (Gruppo K; n=25; BHB \geq 0,70 mmol/L).

Il BCS degli animali è stato valutato utilizzando un punteggio di 9 punti (punteggio 4.5 = BCS ideale), utilizzando l'ispezione visiva e la palpazione manuale di quattro aree del corpo in cui l'animale deposita il grasso: costole, spina dorsale, fianchi e base della coda. Il BCS è assegnato per identificare il quantitativo di energia metabolizzabile, immagazzinata sotto forma di grasso e muscolo in un animale vivo.

Una volta ottenuti i campioni e aver svolto le analisi biochimiche, la concentrazione degli acidi grassi è stata valutata mediante gascromatografia.

Un totale di 40 acidi grassi plasmatici sono stati valutati in ciascuna classe lipidica. Di questi, 6 PL (C8:0, C16:2 ω 4, C18:1 ω 7, C20:1 ω 9, C22:6 ω 3, C24:1 ω 9), 7 FFA (C18:3 ω 6, C20:1 ω 9, C20:5 ω 3, C22:2 ω 6, C22:4 ω 6, C22:5 ω 3, C24:1 ω 9), 6 TG (C10:0, C12:0, C16:3 ω 4, C18:1 ω 7, C20:3 ω 3, C24:1 ω 9) e 5 CE (C16:1 ω 7, C16:4 ω 1, C20:3 ω 3, C22:5 ω 3, C22:6 ω 3) di 40 acidi grassi di ciascuna classe hanno mostrato una differenza significativa e 2 PL (C18:1 ω 9, C20:1 ω 11), 3 FFA (C16:4 ω 1, C20:3 ω 3, C22:1 ω 9) e 1 TG (C18:2 ω 6) di 40 erano tendenzialmente significativi.

I cambiamenti tra le frazioni lipidiche, ottenuti dalle analisi, suggeriscono una loro relazione con le modificazioni del metabolismo e l'infiammazione.

Inoltre, possibili somiglianze di bufale a rischio di iperchetonemia con vacche chetoniche, suggeriscono la necessità di ulteriori indagini in questi ruminanti.

PREMESSA

Negli ultimi anni, il crescente interesse per i prodotti derivati dalle bufale, ha portato a una graduale intensificazione delle condizioni di allevamento, risultando un ambiente stressante, finora sconosciuto a questa specie (De Rosa G. et al., 2005).

L'intensificazione dei sistemi di gestione per massimizzare latte, carne, selezione genetica e i superiori requisiti nutrizionali hanno portato a una maggiore incidenza di diverse patologie connesse allo squilibrio metabolico (Alarcon P. et al., 2018).

Un periodo potenzialmente critico è il periodo di transizione caratterizzato da maggiori cambiamenti fisiologici, nutrizionali, metabolici e immunologici (Raphael W. and Sordillo L.M., 2013; Fiore E. et al., 2023).

Durante questo periodo, amminoacidi, glicerolo e acidi grassi (FA) vengono mobilizzati dal muscolo scheletrico e dal tessuto adiposo (Horst E. A. et al., 2021). Di conseguenza, vengono rilasciati nel sangue acidi grassi non esterificati (NEFA) che sono utilizzati come fonte di energia dai tessuti e dagli organi periferici (Alarcon P. et al., 2018).

Un'alterazione delle funzioni del fegato o l'eccessiva lipomobilizzazione promuove la produzione di corpi chetonici, specialmente β -idrossibutirrato (BHB).

NEFA e BHB sierici o plasmatici sono biomarcatori di un eccessivo bilancio energetico negativo nelle bufale (Lisuzzo A. et al., 2022), però, una soglia specifica di BHB, che identifica i disordini metabolici come chetosi, nelle bufale non è stata stabilita (Fiore et al.). Sia NEFA che BHB possono influenzare negativamente la risposta infiammatoria e le funzioni del sistema immunitario, favorendo l'aumento di altri disturbi metabolici e riproduttivi (Alarcon P. et al., 2018; Fiore E. et al., 2023) che incidono non solo sullo stato di salute della bufala, ma anche sull'economia delle aziende allevatrici in quanto aumentano il numero di animali riformati, diminuisce il quantitativo di latte prodotto ed incrementano i costi inerenti alle specifiche terapie veterinarie.

La mobilizzazione dei lipidi dal tessuto adiposo provoca non solo le concentrazioni relative dei lipidi plasmatici totali ma anche le frazioni lipidiche come fosfolipidi (PL), acidi grassi liberi (FFA), trigliceridi (TG) ed esteri del colesterolo (CE) (Fiore E. et al., 2020; Contreras G. A. et al., 2010). Ognuna di queste frazioni ha una funzione diversa nel metabolismo animale (Kaneko J. J. et al., 2008).

Lo scopo del presente studio era di utilizzare la gascromatografia associata alla cromatografia su strato sottile (TLC-GC) per valutare le frazioni lipidiche delle bufale Mediterranee all'inizio della lattazione per studiare i cambiamenti metabolici associati ai diversi livelli di deficit energetico.

INTRODUZIONE

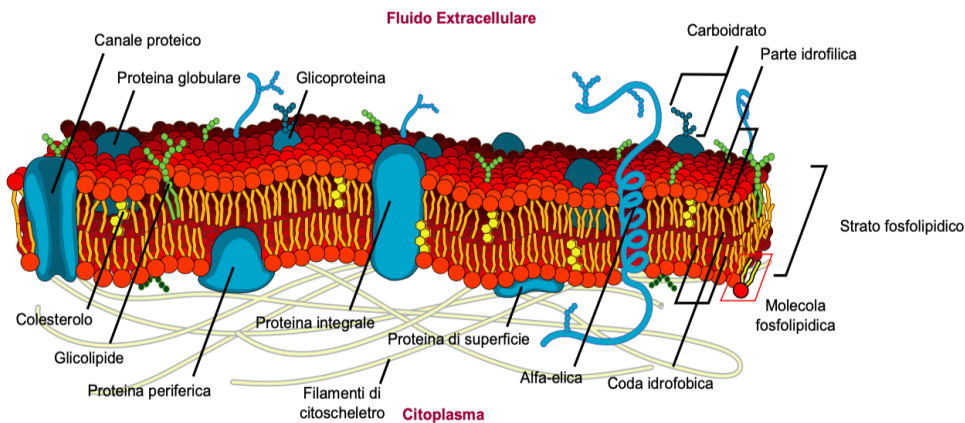
1. COS'È UN ACIDO GRASSO

Gli acidi grassi sono componenti fondamentali dei lipidi. I lipidi sono dei composti organici molto diffusi in natura e hanno diverse funzioni: energetica, strutturale e funzionale (Sherwood L. et al., 2006).

Hanno funzione energetica in quanto sono una fonte di riserva di energia degli organismi, poiché si depositano nei tessuti in grande quantità e hanno la più alta resa energetica: l'ossidazione dei lipidi produce, infatti, circa 9000 calorie per grammo (9.3 kcal/g), meno della metà (4.1 kcal/g) è la resa dei carboidrati, mentre la resa energetica delle proteine è 4.3 kcal/g. Sono usati come fonte di energia sia durante il digiuno, sia durante l'esercizio fisico, quando le riserve di glicogeno sono esaurite (Sherwood L. et al., 2006).

I lipidi hanno funzione strutturale, in quanto, strutturalmente la membrana cellulare è formata da un doppio strato lipidico, i due strati sono costituiti da molecole chiamate fosfolipidi¹ (Zerbini G. and Luzi L., 2010) che si dispongono con le teste idrofile verso l'ambiente esterno e verso il citoplasma. Le code idrofobe, di conseguenza sono in contatto tra loro. Questa disposizione minimizza la superficie delle code idrofobe in contatto con l'acqua (Figura 1.1).

Figura 1.1 Rappresentazione grafica della membrana cellulare.

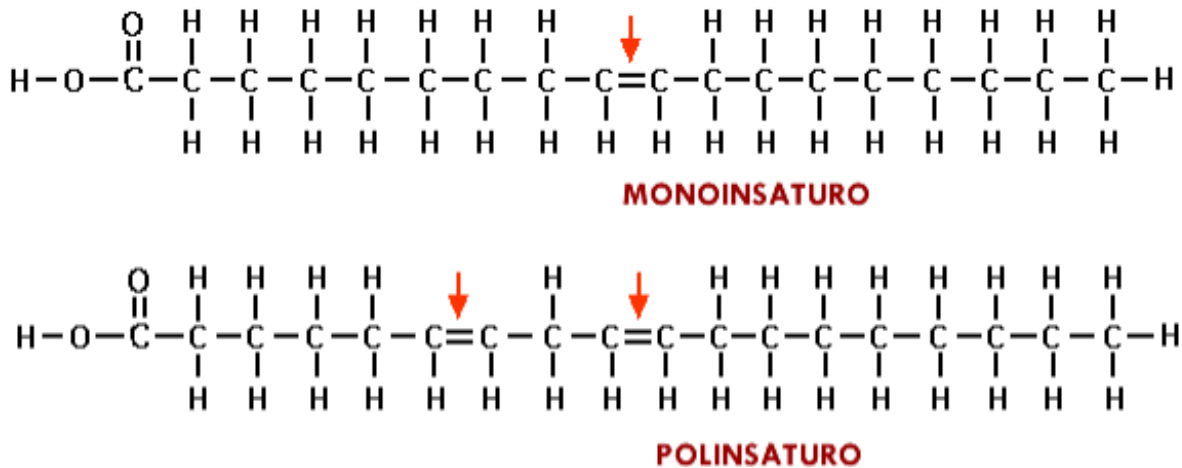


FONTE: Zerbini G. and Luzi L., 2010

Infine, sono dotati di un ruolo funzionale, in quanto si comportano da precursori nei confronti di vitamine e ormoni (prostaglandine, leucotrieni, trombossani, steroidi).

¹ FOSFOLIPIDI: contengono fosforo. Questi lipidi sono molto importanti a livello metabolico poiché entrano nella costituzione delle membrane cellulari e dei tessuti nervosi e sono coinvolti nel trasporto linfatico e sanguigno dei grassi (Bittante G. et al., 1990).

Figura 1.3 Struttura acido grasso monoinsaturo (1 solo legame) e polinsaturo (2 o più legami).



FONTE: Unipi

In base alla configurazione geometrica assunta dagli atomi di idrogeno rispetto al doppio legame, gli acidi grassi insaturi sono classificati in due differenti configurazioni:

1. conformazione *cis* se gli atomi di idrogeno sono entrambi nello stesso lato del doppio legame e la catena idrofobica quindi subisce un ripiegamento;
2. configurazione *trans* se gli atomi di idrogeno sono in lati opposti rispetto al doppio legame e la catena idrofobica mantiene una configurazione rettilinea (Siliprandi N. and Tettamanti G., 2014).

In natura è presente la conformazione *cis*, ma grazie alla microflora batterica presente nel rumine, che attua processi di bioidrogenazione, si ottiene la configurazione *trans*.

Gli acidi grassi possono essere classificati anche in base al numero di atomi di C in:

- A CORTA CATENA (1 → 4) (SCFA): sono il prodotto finale della fermentazione dei microrganismi del rumine. Sono una parte importante dell'energia che l'animale usa per il mantenimento e le produzioni, poiché le cellule ruminali utilizzano gli SCFA per produrre acidi grassi a catena lunga (LCFA) che vengono poi assorbiti e utilizzati come fonte di energia dal muscolo scheletrico e dal tessuto adiposo;
- A MEDIA CATENA (6 → 10) (MCFA): acido caproico (C6), acido caprilico (C8), acido caprico (C10). Questi acidi grassi sono facilmente assorbiti dal tratto gastrointestinale e utilizzati come fonte di energia dal fegato. Tuttavia, la quantità di MCFA prodotta dalla fermentazione batterica nel rumine è relativamente bassa;

- A LUNGA CATENA (12 → 18) (LCFA): acido laurico (C12), acido miristico (C14), acido pentadecanoico (C15), acido palmitico (C16), acido margarico (C17), acido stearico (C18). Gli LCFA sono utilizzati come fonte di energia dal muscolo scheletrico e dal tessuto adiposo. La maggior parte degli acidi grassi a catena lunga viene prodotta dalla fermentazione batterica nel rumine;
- A CATENA MOLTO LUNGA (> 20) (VLCFA): acido arachidico (C20), acido beenico (C22), acido lignocericico (C24). Gli VLCFA sono utilizzati per la sintesi di membrane cellulari e per la produzione di ormoni. Tuttavia, la quantità di VLCFA prodotta dalla fermentazione batterica nel rumine è relativamente bassa.

1.1 ORIGINE DEI LIPIDI

L'alimentazione delle bufale prevede una dieta con un'incidenza di foraggi sulla s.s. di circa il 50% (Campanile G. et al., 1997°, 1997b). La restante parte di alimentazione invece dovrebbe essere costituita da fonti proteiche vegetali (>12%), come pannelli di soia o colza, minerali e vitamine.

Per quanto riguarda i lipidi, si considera che gli alimenti normalmente impiegati, cioè razioni basate sull'impiego di foraggi, cereali e farine d'estrazione, apportino grassi in misura sufficiente (3-4%). È molto importante ricordare che un eccesso di lipidi ha un effetto negativo su alcuni ceppi batterici ruminali, quindi i livelli di lipidi grezzi totali non devono superare il 5% della s.s. della razione (Bittante G. et al., 1999).

I foraggi presentano 6-8% di lipidi soprattutto glicolipidi e fosfolipidi, particolarmente nelle foglie, da cui vengono idrolizzati principalmente i seguenti acidi grassi: acido palmitico (C16), acido palmitoleico (C16:1 cis9), acido linoleico (C18:2 cis9 cis12); acido linolenico (C18:3 cis9 cis12 cis15) ed acido oleico (C18:1 cis9). I trigliceridi invece, non essendo presenti nel foraggio, vengono aggiunti alla dieta mediante i concentrati, che contengono solitamente le seguenti percentuali dei rispettivi FA: tra il 15% ed il 20% di C16, tra l'1% ed il 5% di acido stearico (C18), tra il 25% ed il 35% di C18:1 e tra il 30% ed il 60% di C18:2 (Christie W. W., 1981).

La dieta dei ruminanti può essere integrata con grassi vegetali composti principalmente da acidi grassi insaturi. I principali oli vegetali si ottengono dal trattamento di semi di colza, di girasole, di arachide e di soia.

2. PROCESSO DI DIGESTIONE DEI RUMINANTI

L' apparato digerente dei ruminanti comprende molti organi per: prensione, riduzione meccanica, digestione chimica, assorbimento, eliminazione degli scarti.

È composto da: canale alimentare e organi digestivi accessori (Sherwood L. et al., 2006).

Il canale alimentare è un tubo che si estende dalla bocca all'ano al quale vanno aggiunti gli organi digestivi accessori, le ghiandole (salivare, gastriche, fegato, pancreas).

In questo canale possiamo distinguere a sua volta 2 porzioni. La prima porzione, detta ingestoria o prediaframmatica, si estende dalla bocca al diaframma. Ha il compito di prensione, riduzione meccanica e inizio del processo digestivo. La seconda porzione, detta digestoria o retrodiaframmatica, è deputata alla digestione chimica e all'assorbimento. Questa porzione è divisa in: 3 prestomaci, stomaco o abomaso e intestino.

Nei prestomaci (o stomaco pluricavitario composto) avviene la predigestione ad opera di batteri e protozoi che aiutano a digerire alimenti complessi. Iniziano a svilupparsi durante lo svezzamento a 8 settimane. I prestomaci sono 3: rumine, reticolo e omaso (Sherwood L. et al., 2006).

Il rumine, è il compartimento più grande, rappresenta circa il 70% della capacità totale del sistema digestivo e occupa quasi completamente la parte ventrale sinistra della cavità addominale. La capacità del rumine di una bufala varia da 80 a 200 litri. Insieme al reticolo funge da sito di fermentazione anaerobica. La fermentazione viene attuata da un insieme di microrganismi che costituiscono la microflora (batteri: sono la popolazione più numerosa, costituita da varie specie differenti, solitamente anaerobi e di molteplici capacità), microfauna (protozoi: presenti in numero minore dei batteri, ma svolgono un'intensa attività proteolitica, partecipando attivamente ai processi fermentativi) e le muffe del rumine. Questi microrganismi sono gli unici in grado di trasformare le sostanze ingerite in molecole in grado di essere assimilate dall'animale stesso. Senza questi microrganismi il ruminante non è in grado di sopravvivere (Sherwood L. et al., 2006).

La micropopolazione batterica ruminale può essere classificata in 2 gruppi: batteri cellulolitici ed emicellulolitici (attaccano le cellulose ed emicellulose delle pareti cellulari dei vegetali) e batteri amilolitici (fermentano l'amido e gli altri carboidrati di riserva).

Quasi tutti i ceppi batterici sono inoltre proteolitici, cioè attaccano le proteine dell'alimento arrivando a degradare gli amminoacidi liberi in ammoniaca e chetoacidi (DePeters E.J. and George L.W., 2014).

Nel rumine e negli altri prestomaci vengono quindi attuati sistemi che consentono lo sviluppo al meglio della microflora e microfauna tra cui: mantenimento del pH corretto, mantenimento di un'adeguata umidità, rimescolamento periodico del contenuto, allontanamento dei gas (eruttazione), sminuzzamento del foraggio più grossolano. Quest'ultima attività è completata dalla ruminazione periodica, momento fisiologico proprio dei ruminanti, caratterizzato dalla reiezione del bolo mericico in cavità orale, masticazione e successiva reintroduzione (DePeters E.J. and George L.W., 2014).

Tale prestomaco presenta un epitelio pavimentoso stratificato cheratinizzato che svolge funzioni di: protezione (lo strato di cheratina protegge contro gli ingesta fibrosi), metabolica (batteri e protozoi iniziano la predigestione), assorbimento [di molecole piccole (ioni: sodio, potassio), ammoniaca e urea]. Presenta papille che assorbono i nutrienti, come gli acidi grassi volatili² prodotti dai microrganismi ruminali, e aumentano la superficie assorbente del rumine (DePeters E.J. and George L.W., 2014).

Il reticolo funge da sito di fermentazione anaerobica come il rumine e uno dei suoi compiti primari è di separare, dalla massa fermentante, le particelle più fini, che possono proseguire nel tratto gastroenterico, mentre le particelle più grandi vengono rigurgitate e masticate nuovamente (ruminazione). È la parte più craniale dei prestomaci, posto tra il diaframma e il rumine.

Infine, l'omaso, serve ad assorbire parte della componente liquida dell'ingesta fermentata e con le sue lamine omasali controlla il flusso di digesta all'abomaso. È posto nella metà destra del piano mediale tra il rumine, diaframma e fegato.

La porzione retrodiaframmatica prosegue poi con lo stomaco o abomaso che è l'unico compartimento rivestito da mucosa ghiandolare. L'abomaso è simile in funzione allo stomaco umano con secrezione di acido cloridrico (HCl) e pepsinogeno per attuare la digestione chimica. Presenta uno sfintere che regola il flusso di digesta dall'abomaso al duodeno (DePeters E.J. and George L.W., 2014).

Infine, la sezione retrodiaframmatica termina con l'intestino. La parete intestinale è formata da: pieghe, villi (sono sulla parete delle pieghe. All'interno ci sono capillari arteriosi, venosi e linfatici che permettono il trasferimento dei nutrienti dal lume al sangue) e microvilli (rivestono le cellule epiteliali dei villi. Facilitano la digestione e l'assorbimento in quanto fungono anche da un'ulteriore digestione da parte del succo enterico).

Il succo enterico è composto da: bicarbonato (contribuisce al pH basico), muco (protegge la mucosa intestinale), enzimi [enterochinasi (attivano la tripsina), aminopeptidasi (rompono le proteine in amminoacidi), dipeptidasi (rompono le proteine) e disaccaridasi (maltasi, lattasi, saccarasi, isomaltasi. Rompono i disaccaridi, che sono già stati degradati in parte dall'amilasi, in monosaccaridi)].

Gli enzimi vengono prodotti dalle cellule epiteliali e rimangono adesi alle membrane dei microvilli quindi i nutrienti digeriti si trovano in prossimità della membrana e sono facilmente assorbibili.

È quindi un'ulteriore digestione del chimo prima di essere assorbito.

² ACIDI GRASSI VOLATILI (AGV): sono i prodotti della fermentazione più importanti:

- Acido acetico (C2): 2-2.5 kg/d. Serve nei ruminanti da latte perché è un precursore degli acidi grassi che compongono il grasso del latte;
- Acido propionico (C3): 0.8-1 kg/d. Serve negli animali in accrescimento perché è un acido che fornisce energia;
- Acido butirrico (C4): 0.5-0.7 kg/d. Viene utilizzato dall'animale per scopi energetici.

L'assorbimento avviene dopo la digestione ed è il trasporto dei nutrienti finali dal lume al sangue tramite gli enterociti (trasporto transcellulare). Mentre gli ioni e l'acqua vengono assorbiti con il trasporto paracellulare, attraverso le giunzioni strette che uniscono le cellule epiteliali, quindi è un trasporto tra due epatociti vicini (Sutton J.D. and Reynolds C.K., 2011).

Le ghiandole (salivari, gastriche, fegato e pancreas) che costituiscono gli organi digestivi accessori, sono localizzate al di fuori della parete del tubo digerente e riversano le loro secrezioni nel lume del tratto digerente attraverso specifici dotti.

2.1 GHIANDOLE SALIVARI

Le ghiandole salivari producono saliva alcalina composta da: mucina (glicoproteina con azione lubrificante), lisozima (azione antibatterica), bicarbonato e fosfati.

Questa saliva alcalina, una volta ingoiata, permette ai prestomaci di ospitare la micropopolazione in grado di digerire la cellulosa, in quanto, il bicarbonato e i fosfati contenuti tamponano le sostanze acide prodotte durante la fermentazione e mantengono il pH del rumine-reticolo.

Anche l'urea viene riciclata attraverso le ghiandole salivari e raggiunge i batteri del rumine che la utilizzano per la sintesi proteica (Sherwood L. et al., 2006).

2.2 GHIANDOLE GASTRICHE

Lo stomaco o abomaso è l'unico compartimento rivestito da mucosa ghiandolare. Lo stomaco ha la funzione di digerire proteine, lipidi e amidi.

Le ghiandole gastriche producono succo gastrico composto da: acqua, elettroliti, mucine, fattore intrinseco, acido cloridrico, enzimi (pepsinogeno, prorenina, lipasi gastrica) secreti in forma inattiva che si attivano nel lume ghiandolare. La forma inattiva è indispensabile affinché l'enzima non autodigerisca la cellula in cui è sintetizzato (Sherwood L. et al., 2006).

L'acido cloridrico viene prodotto dalle cellule parietali della mucosa gastrica, stimulate dall'arrivo del chimo nello stomaco. Ha diverse funzioni importanti:

- antibatterica;
- denaturazione delle proteine: modifica la struttura secondaria, terziaria e quaternaria, lasciando inalterata solo la struttura primaria;
- attiva il pepsinogeno in pepsina.

La pepsina è un enzima che agisce come proteasi, ovvero scinde i legami all'interno delle proteine, liberando peptidi, cioè catene più piccole di amminoacidi.

Il fattore intrinseco permette l'assorbimento della vitamina B12, essenziale per la normale formazione dei globuli rossi.

La lipasi gastrica è un enzima, presente solo nei neonati, che digerisce i lipidi del latte a livello gastrico (Sherwood L. et al., 2006).

2.3 FEGATO

Dal fegato viene secreto il succo biliare che viene immagazzinato nella cistifellea. Il succo biliare è composto per 97% di H₂O e 3% di sali inorganici (bicarbonato, cloruro, sodio, potassio) e costituenti organici (sali biliari, colesterolo, pigmenti biliari).

I Sali biliari sono coinvolti nella digestione dei lipidi, dal momento che agiscono come emulsionanti, preparandoli all'aggressione da parte delle lipasi pancreatiche (Bittante G. et al., 1990).

2.4 PANCREAS

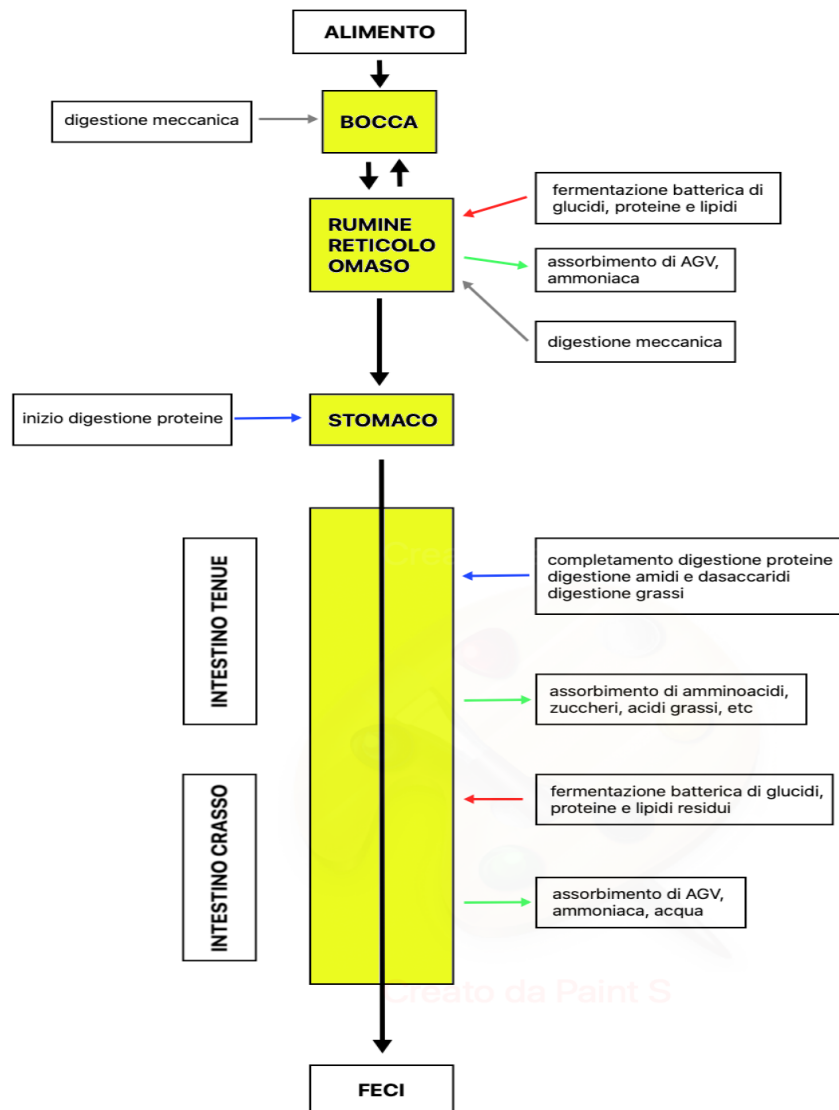
Il pancreas esocrino produce il succo pancreatico, che viene riversato nel duodeno. È composto da: acqua, ioni (bicarbonato: tampona il pH acido del chimo che arriva dall' abomaso), enzimi proteolitici, enzimi amilolitici ed enzimi lipolitici.

Gli enzimi proteolitici sono tripsinogeno, chimotripsinogeno, procarbossipeptidasi. Questi hanno la funzione di scindere le proteine predigerite dallo stomaco. Vengono secreti in forma inattiva per proteggere le cellule del pancreas (Bittante G. et al., 1990).

Gli enzimi amilolitici comprendono l'amilasi pancreatico e hanno la funzione di digerire i carboidrati.

Gli enzimi lipolitici (lipasi pancreatico) digeriscono i lipidi solo se prima vengono emulsionati dai sali biliari. Idrolizza i trigliceridi degli alimenti in monogliceridi e acidi grassi liberi (Bittante G. et al., 1990).

Figura 2.1 Schema del processo digestivo nei Ruminanti.



FONTE: Bittante G. et al., 1990

3. DIGESTIONE NEI RUMINANTI

La prima fase di digestione che avviene nel rumine è di tipo meccanico. In quanto l'organo presenta continui movimenti di rimescolamento dell'alimento, le cui parti più leggere e di maggiori dimensioni (foraggi) si dispongono in superficie, mentre quelle via via più piccole e pesanti si distribuiscono al di sotto e sono immerse nel liquido ruminale.

Il rimescolamento ha la funzione di portare la massa superficiale verso il cardias e l'esofago, per il rigurgito del bolo mericico nella bocca e la sua rimasticazione (ruminazione) per frammentarlo, cosicchè dopo la deglutizione, possa essere maggiormente esposto all'azione fermentativa, mentre le parti più fini e parzialmente digerite vengono spinte verso l'abomaso (Bittante G. et al., 1990).

3.1 FERMENTAZIONE RUMINALE DEI GLUCIDI

I glucidi, presenti nella cellulosa, emicellulosa e amido, iniziano il processo digestivo nel rumine grazie alla popolazione microbica, che porta alla formazione di zuccheri semplici (fruttosio, glucosio, xilosio), anidride carbonica e metano.

Gli zuccheri semplici sono però immediatamente utilizzati dai microrganismi per il loro metabolismo, che da origine, come prodotti finali non ulteriormente utilizzabili dai batteri, ad acidi grassi volatili (AGV): acido acetico (C2), acido propionico (C3), acido butirrico (C4). Questi vengono assorbiti attraverso la parete ruminale per essere utilizzati come fonte di energia dall'animale. Infatti, normalmente, il 60-80% dell'energia che il ruminante ricava dagli alimenti deriva dagli AGV (Bittante G. et al., 1990).

Le fermentazioni batteriche dei glucidi originano anche anidride carbonica e metano, che vengono eliminati con l'eruttazione. Il metano è una perdita di una parte dell'energia contenuta nell'alimento, che va dal 5% nelle razioni concentrate, al 10% in quelle ricche di foraggi.

Normalmente tutti gli zuccheri e oltre il 90% dell'amido sono fermentati nei prestomaci e quindi solo una quota bassa di amido oltrepassa il rumine per essere digerita nell'intestino (Bittante G. et al., 1990). Una volta giunti nell'intestino vengono digeriti dall'amilasi pancreatica, contenuta nel succo pancreatico e infine i disaccaridi vengono digeriti dalla disaccaridasi (enzima presente nel succo enterico legato ai microvilli) nei rispettivi monosaccaridi. Vengono assorbiti dagli enterociti attraverso un trasporto transcellulare. Vanno poi nel sangue che li porta al fegato, qui i monosaccaridi vengono isomerizzati a glucosio, che viene utilizzato per produrre energia (ATP) oppure viene depositato nei muscoli sotto forma di glicogeno (Bittante G. et al., 1990).

3.2 DIGESTIONE DEI GRASSI

La micropopolazione ruminale produce lipasi e quindi i trigliceridi alimentari (la maggior parte dei lipidi presenti negli alimenti vegetali assunti dal ruminante è sotto forma di trigliceridi insaturi e a lunga catena) che giungono nel rumine, vengono scissi nelle componenti principali, glicerolo e acidi grassi. Il glicerolo è metabolizzato dai batteri al fine di immediata fonte di energia con produzione di propionato, che viene assorbito attraverso le pareti ruminali e convertito in glucosio a livello epatico. Gli acidi grassi a lunga catena possono essere usati: (1) per le sintesi microbiche, (2) metabolizzati, con riarrangiamenti delle catene carboniose che comportano un aumento degli acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio e a catena ramificata, (3) in piccola parte sono salificati, principalmente con il calcio, il che consente loro di oltrepassare il rumine inalterati giungendo all'abomaso, (4) una piccola parte degli acidi grassi a catena corta, sono assorbiti attraverso le pareti ruminali (Formigoni A. et al., 2010).

La modificazione più importante che subiscono gli acidi grassi nel rumine è l'idrogenazione. È la reazione per cui gli acidi grassi insaturi vengono saturati per aggiunta di idrogeno agli atomi di carbonio interessati dai doppi legami. Per questo motivo, la maggior parte degli acidi grassi che arrivano al duodeno nei ruminanti sono saturi, indipendentemente dal grado di insaturazione dei grassi contenuti nell'alimento. Ecco perché, il grasso di deposito nel corpo dei ruminanti è più stabile e più saturo, rispetto a quello più variabile e più insaturo dei monogastrici, che assorbono gli acidi grassi alimentari senza modificarli.

Poiché, non vi è alcun assorbimento o modifica significativa degli acidi grassi a catena lunga e media nell'omaso o nell'abomaso (Moore J. H. and Christie W. W., 1984), nell'intestino dei poligastrici giungono acidi grassi saturi, lipidi contenuti nelle cellule batteriche e piccole quantità di trigliceridi sfuggiti all'attacco ruminale. Questi ultimi vengono attaccati dai sali biliari, che hanno un'azione emulsionante del grasso, aumentando così la superficie di attacco per le lipasi pancreatiche, che idrolizzano i trigliceridi in acidi grassi liberi e monogliceridi. Diventano quindi micelle più piccole, che vengono assorbite dalle cellule della mucosa intestinale (Doreau M. and Chilliard Y., 1997). Dopo aver attraversato la mucosa, una piccola parte, cioè gli acidi grassi a corta catena, vanno direttamente nei capillari sanguigni e poi tramite la vena porta al fegato, dove o diventano glucosio (se c'è bisogno di energia) o circolano legati all'albumina (acidi grassi liberi non esterificati – NEFA), ma la maggior parte, vengono ritrasformati, nelle cellule, in trigliceridi. Attraverso delle proteine, che fungono da vettore, vengono raccolti i trigliceridi, formando così i chilomicroni (proteina + trigliceride), che passano nel sistema linfatico e da questo nella circolazione sanguigna dove grazie ai capillari, i trigliceridi, raggiungono il tessuto adiposo ed il tessuto muscolare.

Le lipoproteine a più bassa densità (chilomicroni) interagiscono con il recettore endoteliale denominato lipoproteina lipasi (LPL) permettendo in tal modo il rilascio del trigliceride e la deposizione lipidica nel tessuto (Giammanco A. et al., 2015) (Bittante G. et al., 1990).

3.2.1 IDROGENAZIONE E PRODUZIONE DELL'ACIDO STEARICO

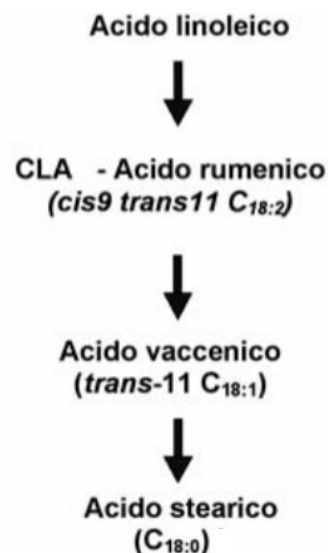
Il processo di idrogenazione è un meccanismo protettivo per i batteri del rumine, messo in opera dai batteri stessi, che procede per tappe successive che portano alla formazione di prodotti intermedi e all'acido stearico come prodotto finale, in quanto i PUFA sono tossici per il microbiota del rumine (Formigoni A. et al., 2010). I principali substrati alimentari, oggetto di idrogenazione, sono l'acido linolenico e l'acido linoleico (Koch L. E. and Lascano G. J., 2018).

La prima fase dell' idrogenazione dei lipidi è la reazione di isomerizzazione, ovvero il processo che converte il doppio legame *cis* dell'acido grasso insaturo nel suo isomero con configurazione *trans*. Nello specifico l'acido linoleico, maggiormente presente nella dieta (C18:2 *cis*9 *cis*12), è trasformato velocemente in acido rumenico (C18:2 *cis*9 *trans*11) da un gruppo di batteri di cui fanno parte i butirrivibrio, i clostridi (Jenkins T. C. et al., 2008) e le spirochete.

La saturazione ad acido stearico (C18:0), invece, avviene più lentamente, ed è operata da microrganismi non ancora completamente identificati ma metabolicamente meno attivi dei primi. Questa seconda fase prevede l'idrogenazione del doppio legame *cis* degli acidi grassi linoleico e linolenico. La rottura del doppio legame e la formazione di un legame singolo con l'atomo di idrogeno, generano l'acido vaccenico (C18:1 *trans*11). Si termina la sequenza di idrogenazione riducendo l'acido vaccenico ad acido stearico (C18) (Baumann D. E. et al., 2003).

Una piccola parte di acidi grassi intermedi, come l'acido vaccenico e l'acido rumenico (C18:2 *cis*9 *trans*11), possono defluire dal rumine senza completare il processo di idrogenazione ed essere assorbiti e successivamente depositati nel tessuto adiposo come tali (Kemp P. and Lander D. J., 1983).

Figura 3.1 Principali tappe che portano alla completa idrogenazione dei lipidi insaturi nel rumine in presenza di diversi assetti fermentativi.



FONTE: Formigoni A. et al., 2010

Il fatto che la trasformazione ad acido stearico sia relativamente più lenta della prima isomerizzazione giustifica, almeno in parte, la comparsa di questi intermedi nell'intestino. In senso più generale, questo fenomeno è l'espressione di quanto siano dinamiche anche le relazioni esistenti fra microbiota ruminale e lipidi alimentari. Il processo di formazione degli intermedi è dunque strettamente dipendente dalle popolazioni microbiche presenti nel rumine, dalla quantità di acidi grassi insaturi apportati con la dieta, e dalla velocità di transito degli alimenti nel rumine. Per tutti questi motivi, nel caso in cui la dieta contenga quantità elevate di acidi grassi insaturi e siano presenti condizioni critiche per l'attività dei microrganismi capaci di idrogenare, si ha un'elevata formazione di composti intermedi del processo (Lock A. L. et al., 2005).

3.2.2 DIGERIBILITA' E ASSORBIMENTO DEGLI ACIDI GRASSI

Spesso la quantità totale di acidi grassi che entrano nel duodeno può superare l'assunzione di acidi grassi (Bauman D. E. et al., 2003) e ciò si verifica più spesso quando l'assunzione di lipidi è bassa, ad esempio con diete ad alto contenuto di foraggio. In questo caso l'aumento è il risultato della sintesi lipidica batterica nel rumine, infatti gli acidi grassi prodotti dalla flora microbica sono 8.43 – 9.3 g per kg di sostanza secca ingerita (Schmidely P. et al., 2008). Tuttavia, il contributo dei lipidi microbici è estremamente variabile a causa degli effetti associativi di diverse diete sulla sintesi microbica (Noble R. C., 1981).

La digeribilità degli acidi grassi ha un range compreso tra il 58% e l'86% ed il loro assorbimento giornaliero in una bovina ad elevata produzione latte è stimato essere compreso tra i 247g ed i 1102g (Lock A. L. et al., 2004). Questi dati fanno riferimento alle bovine da latte poiché sono la specie più affidabile non essendo presenti studi simili sulle bufale.

Questa differenza di digeribilità è dovuta alle diverse caratteristiche dei lipidi, in quanto all'aumentare dei doppi legami vi è una maggior digeribilità. Inoltre, la digeribilità delle lunghe catene idrocarburiche sature è inferiore a quella delle catene polinsature (Baumann D. E. et al., 2003).

Invece, per quanto riguarda la capacità dei ruminanti di assorbire gli acidi grassi, questa è molto superiore a quella dei non ruminanti (Noble R. C., 1981), è maggiore soprattutto per gli acidi grassi saturi nello specifico l'assorbimento di C18:0 (282 gr/d) in quanto è il componente principale dell'alimento che defluisce dal rumine (Tabella 3.1) (Lock A. L. et al., 2006).

Inoltre, gli acidi grassi insaturi assorbiti a livello intestinale differiscono notevolmente dagli acidi grassi presenti nell'alimento, questo a riprova del processo di idrogenazione svolto dalla micropopolazione ruminale (Lock A. L. et al., 2004).

Tabella 3.1 Intake, flusso duodenale, digeribilità ed assorbimento dei differenti acidi grassi in una bovina in lattazione (Lock A. L. et al., 2006-modificato).

ACIDO GRASSO	ACIDI GRASSI INGERITI (gr/d)	ACIDI GRASSI IN DUODENO (gr/d)	DIGERIBILITA' (%)	ASSORBIMENTO (gr/d)
C16	170	161	75	123
C18	52	397	72	282
C18:1	229	162	80	128
C18:2	272	56	78	45
C18:3	77	9	77	7

Acido palmitico (C16); acido stearico (C18); acido oleico (C18:1); acido linoleico (C18:2); acido linolenico (C18:3).

3.2.3 ACIDI GRASSI NEL TESSUTO ADIPOSO

Come precedentemente detto, le lipoproteine a più bassa densità (chilomicroni), circolanti nei capillari, interagiscono con il recettore endoteliale denominato lipoproteina lipasi (LPL) permettendo in tal modo il rilascio del trigliceride e la deposizione lipidica nel tessuto (Giammanco A. et al., 2015).

Il tessuto adiposo, pertanto, è costituito per l'81,2% da trigliceridi e in minor misura da digliceridi (5,8%), colesterolo libero (5,5%), acidi grassi non esterificati (2,8%), fosfolipidi (1,2%) ed esteri del colesterolo (0,8%) (Christie W. W., 1981).

La sintesi di FFA può avvenire mediante due differenti meccanismi cellulari:

- ◆ sintesi citoplasmatica;
- ◆ sintesi mitocondriale (completa il primo meccanismo) (Chilliard Y., 1993).

Gli acidi grassi con catene fino a 16 atomi di carbonio vengono sintetizzati nel citoplasma e successivamente può avvenire l'elongazione della catena idrocarburica fino a 22 atomi di carbonio mediante la sintesi mitocondriale. (Demeyer D. and Doreau M., 1999).

La composizione degli acidi grassi presenti nel tessuto adiposo è modificata mediante desaturazione di legami singoli, con formazione di legami doppi. L'enzima regolatore è lo stearoil-CoA desaturasi che accelera la reazione di formazione di un doppio legame nelle catene idrocarburiche di acidi grassi provenienti dall'assorbimento intestinale od in alternativa in acidi grassi di nuova sintesi (Paton C. M. and Ntambi J. M., 2009).

Un altro importante cambiamento, nella composizione lipidica, effettuato dall'enzima desaturasi e dall'enzima elongasi è la formazione di acidi grassi a 20-22 atomi di carbonio (C20:4 ω 6, C20:5 ω 3), questi fondamentali in quanto precursori di mediatori dell'infiammazione.

Nella Tabella 3.2 (Vernon R. G. and Flint D. J., 1988- modificato) è evidente come gli acidi grassi saturi del tessuto adiposo siano diminuiti rispetto agli acidi grassi plasmatici ed è evidente l'azione dell'enzima-desaturasi che incrementa il quantitativo di acidi grassi insaturi. Lo studio degli acidi grassi presenti nel tessuto adiposo è importante in quanto è il principale sito di mobilizzazione lipidica nella bufala con bilancio energetico negativo.

Tabella 3.2 Quantitativo dei principali acidi grassi che compongono i lipidi presenti nel plasma e nel tessuto adiposo bovino e bufalino (valore espresso in g/100g di acidi grassi totali) (Vernon R. G. and Flint D. J., 1988- modificato)

ACIDO GRASSO	TRIGLICERIDI NEL PLASMA	TRIGLICERIDI NEL TESSUTO ADIPOSO
C16	32	24
C18	32	13
C18:1	18	44
C18:2	2	3

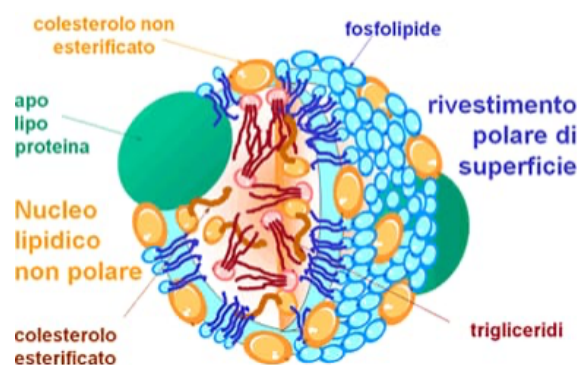
Acido palmitico (C16); acido stearico (C18); acido oleico (C18:1); acido linoleico (C18:2).

3.2.4 ACIDI GRASSI NEL PLASMA

Il plasma bovino e bufalino è formato da 0,224-0,484 grammi di lipidi per 100 ml (Christie W. W., 1981).

I lipidi, a causa della scarsa idrosolubilità, sono trasportati mediante lipoproteine: molecole di forma globulare costituite da un nucleo centrale apolare, ricco in trigliceridi ed esteri del colesterolo, e da un involucro esterno polare, formato da fosfolipidi, apolipoproteine e quantità minore di colesterolo libero (Demeyer D. and Doreau M., 1999).

Figura 3.2 Schema della struttura di una lipoproteina.



FONTE: chimica-online

Le lipoproteine plasmatiche sono classificate in 5 gruppi in base alla loro densità (rapporto grasso-proteina): chilomicroni, lipoproteine a densità molto bassa (VLDL), lipoproteine a densità intermedia (IDL), lipoproteine a bassa densità (LDL) e lipoproteine ad alta densità (HDL).

I NEFA, invece, sono trasportati in circolo mediante albumine (Demeyer D. and Doreau M., 1999).
 Le principali classi lipidiche presenti nel plasma sono: i fosfolipidi (PL), gli esteri del colesterolo (CE), i trigliceridi (TG), il colesterolo libero (CO) e acidi grassi liberi (FFA) (Christie W. W., 1981).
 Ognuna di queste classi compone, in percentuale differente, il quantitativo di acidi grassi plasmatici totali.

Tabella 3.3 Vengono indicate le concentrazioni delle differenti classi lipidiche presenti nel plasma di una bufala e le concentrazioni degli acidi grassi plasmatici derivanti dalle singole frazioni lipidiche (Tyburczy C. et al., 2008).

CLASSE LIPIDICA	LIPIDI (mg/dl)	ACIDI GRASSI (mg/dl)
<i>PL (fosfolipidi)</i>	255.1	151.6
<i>CE (esteri del colesterolo)</i>	147.2	63.0
<i>TG (trigliceridi)</i>	24.7	23.6
<i>FFA (acidi grassi liberi)</i>	3.7	3.7

Nella fase di transizione, la lipolisi causata dal bilancio energetico negativo, determina una modifica della composizione plasmatica degli acidi grassi (Douglas G. N., 2007).

Gli acidi grassi che modificano la composizione plasmatica sono gli stessi che costituiscono il tessuto adiposo, questo a causa della mobilizzazione delle riserve lipidiche (Contreras G. A. et al., 2010).

Il tessuto adiposo, come precedentemente riportato, è costituito per l'81,2% da trigliceridi e in minor misura da digliceridi (5,8%), colesterolo libero (5,5%), acidi grassi non esterificati (2,8%), fosfolipidi (1,2%) ed esteri del colesterolo (0,8%) (Christie, 1981).

Le quantità di acidi grassi totali nel plasma ($\mu\text{g/ml}$) si modificano durante il periodo di lattazione e l'asciutta, infatti sono più elevati all'inizio della lattazione ($1.641,4 \pm 513,85$) rispetto alla fine della lattazione ($1.473,67 \pm 336,05$) e in asciutta ($1.208,5 \pm 396,55$). Inoltre, la somma di SFA (acidi grassi saturi) è significativamente più alta nelle bufale in asciutta rispetto a quelle in lattazione (Figura 3.3) (Abdel-Raheem S. et al., 2010).

Nella tabella, inoltre, si nota anche una variazione della composizione dei differenti acidi grassi plasmatici: nel periodo di parto e nella prima fase di lattazione è evidente un aumento percentuale dei MUFA come il C18:1 ω 9, principale acido grasso presente nel tessuto adiposo e rilasciato in maggior misura nel plasma mediante lipolisi (Loften J. R. et al., 2014). La percentuale di SFA in asciutta è superiore rispetto alla percentuale degli stessi nei giorni di lattazione, inoltre, nel postparto si assiste ad un aumento dei PUFA appartenenti alla famiglia degli omega 6, nello specifico il C18:2,

mentre la famiglia degli omega 3 decresce nella fase precoce di lattazione (Abdel-Raheem S. et al., 2010).

Figura 3.3 Percentuale dei differenti acidi grassi nel periodo di asciutta (Dry cow) e nelle 3 fasi di lattazione: precoce (Early), media (Mid) e tardiva (Late). Valore espresso in percentuale. Il quantitativo di acidi grassi plasmatici totali (Total FA) è espresso in µg/ml.

Items	Early (n=52)	Mid (n=62)	Late (n=76)	Dry cow (n=68)
C14:0	0.66 ± 0.2 ^a	0.57 ± 0.12 ^b	0.59 ± 0.13 ^b	0.69 ± 0.21 ^a
iso C15:0	0.38 ± 0.15 ^a	0.4 ± 0.12 ^a	0.39 ± 0.12 ^a	0.31 ± 0.1 ^b
anteiso C15:0	0.48 ± 0.21 ^a	0.66 ± 0.19 ^{bc}	0.7 ± 0.21 ^b	0.62 ± 0.19 ^c
C15:0	0.70 ± 0.20 ^a	0.80 ± 0.20 ^b	0.85 ± 0.21 ^b	0.93 ± 0.26 ^c
C16:0	13.59 ± 3.06 ^a	10.82 ± 0.99 ^b	11.06 ± 1.44 ^b	13.85 ± 2.74 ^c
iso C17:0	0.26 ± 0.05 ^a	0.28 ± 0.05 ^b	0.3 ± 0.06 ^c	0.31 ± 0.07 ^c
anteiso C17:0	0.48 ± 0.15 ^a	0.64 ± 0.12 ^{bc}	0.68 ± 0.14 ^b	0.59 ± 0.16 ^c
C18:0	15.62 ± 2.08 ^a	16.23 ± 1.6 ^a	17.38 ± 1.79 ^b	19.77 ± 2.77 ^c
C20:0	0.12 ± 0.12 ^a	0.1 ± 0.05 ^a	0.12 ± 0.08 ^b	0.20 ± 0.1 ^c
C22:0	0.23 ± 0.09 ^a	0.24 ± 0.06 ^{ab}	0.27 ± 0.07 ^b	0.3 ± 0.09 ^c
C24:0	0.42 ± 0.16 ^a	0.44 ± 0.12 ^a	0.45 ± 0.12 ^a	0.51 ± 0.12 ^b
ΣSFA	32.94 ± 4.08 ^a	31.18 ± 1.81 ^b	32.8 ± 3.15 ^a	38.08 ± 3.81 ^c
C14:1	0.17 ± 0.06 ^a	0.2 ± 0.06 ^b	0.2 ± 0.06 ^b	0.15 ± 0.06 ^c
C16:1n-9	0.34 ± 0.11 ^a	0.44 ± 0.14 ^b	0.42 ± 0.12 ^{bc}	0.39 ± 0.12 ^c
C16:1n-7	1.51 ± 0.49 ^a	1.05 ± 0.32 ^b	0.98 ± 0.26 ^b	1.28 ± 0.43 ^c
C17:1	0.36 ± 0.08 ^a	0.38 ± 0.1a ^b	0.41 ± 0.1 ^b	0.39 ± 0.09 ^{ab}
C18:1n-9	10.82 ± 3.5 ^a	8.65 ± 1.53 ^b	8.84 ± 1.79 ^b	11.17 ± 3.6 ^c
C18:1n-7	0.98 ± 0.25 ^a	0.77 ± 0.15 ^b	0.81 ± 0.13 ^b	1.28 ± 0.44 ^c
C24:1	0.2 ± 0.09 ^a	0.29 ± 0.18 ^b	0.28 ± 0.18 ^b	0.27 ± 0.11 ^b
ΣMUFA	14.39 ± 4.00 ^a	11.79 ± 1.99 ^b	11.93 ± 2.14 ^b	14.93 ± 3.97 ^a
C18:2n-6	36.11 ± 6.46 ^a	36.24 ± 4.53 ^a	33.6 ± 5.43 ^b	25.17 ± 5.25 ^c
C18:3n-6	0.88 ± 0.49 ^a	1.01 ± 0.26 ^b	1.31 ± 2.37 ^b	0.84 ± 0.33 ^a
C20:3n-6	1.82 ± 0.6 ^a	2.26 ± 0.44 ^b	2.17 ± 0.44 ^b	2.3 ± 0.78 ^b
C20:4n-6	1.56 ± 0.32 ^a	1.65 ± 0.27 ^a	1.66 ± 0.32 ^a	2.07 ± 0.53 ^b
C22:4n-6	0.13 ± 0.11 ^a	0.14 ± 0.06 ^b	0.15 ± 0.08 ^b	0.19 ± 0.1 ^c
C22:5n-6	0.04 ± 0.04 ^a	0.04 ± 0.03 ^a	0.05 ± 0.04 ^a	0.05 ± 0.05 ^b
ΣPUFA n-6	40.54 ± 6.94 ^{ab}	41.34 ± 4.68 ^a	38.93 ± 4.5 ^c	30.64 ± 5.28 ^c
C18:3n-3	8.51 ± 2.21 ^a	11.42 ± 2.59 ^{bc}	11.87 ± 2.9 ^b	10.84 ± 2.82 ^c
C18:4n-3	0.33 ± 0.15 ^a	0.53 ± 0.15 ^b	0.57 ± 0.15 ^b	0.58 ± 0.22 ^b
C20:4n-3	0.99 ± 0.37 ^a	1.28 ± 0.34 ^b	1.37 ± 0.34 ^b	1.66 ± 0.57 ^c
C20:5n-3	1.22 ± 0.37 ^a	1.36 ± 0.41 ^a	1.33 ± 0.53 ^a	1.6 ± 0.6 ^b
C22:5n-3	0.93 ± 0.26 ^a	0.99 ± 0.26 ^a	1.05 ± 0.23 ^a	1.39 ± 0.39 ^b
C22:6n-3	0.14 ± 0.11 ^{ab}	0.12 ± 0.06 ^a	0.14 ± 0.05 ^b	0.26 ± 0.29 ^c
ΣPUFA n-3	12.13 ± 2.85 ^a	15.69 ± 3.41 ^b	16.33 ± 3.48 ^b	16.34 ± 3.90 ^b
Total FA ^a	1,641.4 ± 513.85 ^a	1,573.6 ± 279.4 ^{ab}	1,473.67 ± 336.05 ^b	1,208.5 ± 396.55 ^c

FONTE: Abdel-Raheem S. et al., 2010

3.3 DIGESTIONE DELLE PROTEINE

Una delle caratteristiche che contraddistingue la bufala è quella di avere una micropopolazione ruminale (composta da ceppi batterici proteolitici) in grado di attaccare e degradare le proteine alimentari, attraverso una deaminazione, in ammoniaca + chetoacidi, molto più velocemente rispetto al bovino. Rispetto a questo, inoltre, l'alimento permane per più tempo nel rumine ma per meno tempo nell'intestino (Bartocci S. et al., 1997). Questa caratteristica fa sì che siano poche le proteine che by-passano il rumine e siano direttamente utilizzabili a livello intestinale (Di Lella T. et al., 1995).

L'ammoniaca liberata dalla deaminazione viene usata dai batteri per le sintesi di nuovi aminoacidi, per formare proteine necessarie per produrre nuove cellule e per il loro accrescimento.

L'ammoniaca in eccesso si accumula nel rumine, oltrepassa la parete ruminale, entra nel circolo sanguigno e viene eliminata con le urine o va nella saliva.

Al contrario, se la proteina degradabile è insufficiente ai batteri e quindi la concentrazione di ammoniaca nel liquido ruminale è inferiore al livello normale, si ha un richiamo di azoto contenuto nell'urea della saliva e un richiamo attraverso le pareti ruminali dell'urea contenuta nel sangue, che proviene dal continuo ricambio delle proteine corporee.

Nel rumine vengono riciclate continuamente cellule batteriche che passano all'abomaso fornendo la proteina batterica che si aggiunge alla proteina alimentare non degradata (by-pass).

Nell' abomaso le proteine vengono attaccate dall'acido cloridrico che contiene vari enzimi come la pepsina, enzima proteolitico che rompe le proteine in polipeptidi e pochi aminoacidi.

Nel duodeno viene riversato:

- succo pancreatico: prodotto dal pancreas, composto da enzimi proteolitici (tripsinogeno, chimotripsinogeno, procarbosipectidasi) che scinde alcuni polipeptidi predigeriti dall'abomaso;
- liquido biliare: prodotto dal fegato;
- succo enterico: prodotto da ghiandole e dalle cellule delle pareti intestinali, contengono degli enzimi (aminopeptidasi, dipeptidasi) che scindono le catene polipeptidiche fino a liberare gli aminoacidi.

Gli aminoacidi vengono assorbiti lungo l'ultimo tratto dell'intestino tenue attraverso un trasporto attivo (Sherwood L. et al., 2006).

4. METABOLISMO

Sono tutte le reazioni chimiche che avvengono nel corpo animale e che utilizzano come prodotto di partenza i principi nutritivi assorbiti dopo la digestione e quelli analoghi provenienti dalle riserve corporee (grasso e proteine) mobilizzate da animali con deficit energetico negativo (Bittante G. et al., 1990).

4.1 METABOLISMO DEI GLUCIDI E DEI GRASSI

I glucidi, presenti nel corpo animale, sono il *glucosio* (gli zuccheri assorbiti vengono convertiti a glucosio) e il *glicogeno*, glucosio che viene immagazzinato nel fegato e muscoli.

Della categoria dei grassi si trovano i *trigliceridi*³ dei depositi adiposi, gli *acidi grassi* assorbiti dalla digestione dei lipidi e *acidi grassi volatili* derivati dalla digestione dei carboidrati.

La funzione di questi composti è essenzialmente energetica, infatti, dal loro catabolismo⁴ deriva la maggior parte dell'energia necessaria al mantenimento e alle produzioni dell'animale.

I carboidrati e i grassi assorbiti dagli alimenti, il glucosio utilizzato per ripristinare le riserve di glicogeno ed acetato e butirrato provenienti dalle fermentazioni ruminanti, se in eccesso rispetto alle esigenze energetiche dei fabbisogni di mantenimento e di produzione, vengono trasformati nei trigliceridi dei grassi di deposito, che costituiscono, quindi, una riserva di energia utilizzabile in condizioni di minor assimilazione di energia rispetto a quella necessaria. Per esempio, le riserve adipose svolgono una funzione importante nelle prime fasi della lattazione quando le bufale assumono alimenti in quantità inadeguate e ricorrono alle riserve per colmare i deficit di energia.

Importante è considerare che gli AGV acetico (C2) e butirrico (C4), vengono prodotti in quantità diversa in base all'alimentazione. È noto che la sintesi di acetato è prevalente quando sono fermentati i glucidi fibrosi come la cellulosa e le emicellulose che sono presenti, principalmente, nei foraggi, il butirrato è invece prodotto dalla fermentazione delle pectine e degli zuccheri.

Per questo motivo, se l'ingestione di glucidi rapidamente fermentabili è elevata, verrà a mancare l'equilibrio tra AGV prodotti, che saranno molti, e il potere assorbente della mucosa ruminale, quindi il pH ruminale fluttuerà più intensamente raggiungendo per molte ore valori inferiori a 5.6 - 5.8, sufficienti a provocare (i) la riduzione della digestione della fibra, a causa della morte dei batteri cellulosolitici ed emicellulosolitici, (ii) una variazione del rapporto tra acidi grassi volatili prodotti.

³ TRIGLICERIDI: sono un tipo di lipidi che si trovano nel sangue e nei tessuti adiposi degli animali. Sono costituiti da 3 molecole di acidi grassi esterificate ad un glicerolo. I trigliceridi rappresentano una fonte importante di energia per l'organismo (Grundy S. M. et al., 2005).

⁴ CATABOLISMO: è un processo metabolico in cui le molecole complesse vengono scisse in molecole più semplici, liberando l'energia contenuta nei composti di partenza. È l'opposto dell'anabolismo (Alberts B. et al., 2014).

Una dieta a base di concentrati produce molto acido propionico (C3), causando una diminuzione dell'acido acetico e butirrico. Mano a mano che aumenta la fibra, diminuisce il propionato e aumenta l'acetato e butirrato (Formigoni A. et al., 2010).

4.1.1 ENERGIA OTTENUTA DAL GLUCOSIO E DAGLI ACIDI GRASSI VOLATILI

Il glucosio, sia proveniente dagli alimenti che dalle riserve di glicogeno, è la principale fonte di energia per il metabolismo. Esso viene trasportato nel corpo attraverso la circolazione sanguigna e viene assorbito dalle cellule dei vari organi e tessuti, dove, attraverso la glicolisi e Ciclo di Krebs, viene completamente ossidato. Da ogni mole di glucosio, si ottengono 38 moli di ATP (Alberts B. et al., 2015). Nei ruminanti la quantità di glucosio assorbita con la digestione è scarsa e il metabolismo energetico dei glucidi prende origine dagli AGV. Fra questi, l'acido propionico viene trasportato al fegato dove è utilizzato per la sintesi di glucosio (2 moli di propionato → 1 mole di glucosio) il quale può produrre energia sia nel fegato stesso, sia nelle varie cellule corporee dopo essere stato trasportato dalla circolazione sanguigna.

I ruminanti ottengono la maggior parte del glucosio dall'acido propionico, ma poiché la sintesi di glucosio da tale acido richiede energia, il guadagno è di 34 ATP.

Anche l'acido acetico e l'acido butirrico, vengono trasportati nelle cellule, trasformati in acetil-coenzima A, fungendo così da base per l'avvio del ciclo di Krebs che produce 20 moli di ATP (da 2 moli di acido acetico) e 26 moli di ATP (da 1 mole di acido butirrico).

4.1.2 ENERGIA OTTENUTA DAI GRASSI

Come detto in precedenza, la maggior parte dell'energia necessaria al mantenimento e alle produzioni dell'animale deriva dai trigliceridi, dagli acidi grassi assorbiti dall'alimento e dagli AGV, e in condizione di carenza alimentare, e quindi di insufficiente rifornimento, dai trigliceridi del tessuto adiposo.

Da questi ultimi, otteniamo glicerolo e acidi grassi.

Il glicerolo ha 3 atomi di carbonio e viene, quindi, facilmente trasformato in 2 prodotti intermedi della glicolisi: *gliceraldeide 3-fosfato* e *diidrossiacetone*, che viene a sua volta convertito, con una isomerasi, in gliceraldeide 3-fosfato. Queste due molecole, di prodotto intermedio, concludono la glicolisi e portano alla formazione di 2 molecole di acido piruvico. Il piruvato, tramite la piruvato deidrogenasi, viene trasformato in acetil coenzima-A. Quest'ultimo può percorrere due strade: o entra nel Ciclo di Krebs o diventa un lipide, questo dipende dalla necessità di energia che si ha in quel momento, se ho bisogno di energia, viene attivato il Ciclo di Krebs, se non ho bisogno di ATP, l'acetil coenzima-A diventa un lipide e viene immagazzinato.

La maggior parte dell'energia viene però ricavata dalla β -ossidazione dei grassi, mediante la quale gli acidi grassi vengono idrolizzati liberando ATP e acetil coenzima-A, che può essere usato come precursore nel Ciclo di Krebs come ulteriore fonte di energia.

Tuttavia, la possibilità di avviare il Ciclo di Krebs dipende dalla disponibilità di moli di ossalacetato, che si uniscono all'acetil coenzima-A e formeranno acido citrico. Se le moli di ossalacetato non sono sufficienti, intervengono le reazioni anaplerotiche (reazioni di riempimento che fanno in modo di rimpiazzare ciò che manca), che prendono il piruvato (deriva dalla glicolisi oppure dalla deaminazione degli amminoacidi), fanno la decarbossilazione (piruvato + CO₂) e lo convertono in ossalacetato.

Di conseguenza, ne deriva che l'utilizzazione energetica dell'acido acetico e dell'acido butirrico provenienti dalle fermentazioni ruminali e degli acidi grassi provenienti dalle riserve corporee è condizionata da un'adeguata disponibilità di ossalacetato. In caso contrario, l'acetil coenzima-A non può essere inserito nel ciclo di Krebs e le molecole condensano tra di loro in corpi chetonici (acetoacetato e β -idrossibutirrato), che si accumulano nel sangue e creano intossicazione.

Questa patologia metabolica è presente quando abbiamo una ridotta ingestione di alimento e abbiamo un'alta mobilitazione di grassi corporei, come nel caso di bufale o vacche da latte ad alta produttività ad inizio lattazione.

4.2 METABOLISMO DELLE PROTEINE

Quando l'energia dai glucidi e dai lipidi alimentari non soddisfa le esigenze dell'organismo o quando vi è un eccesso di amminoacidi assorbiti rispetto alle potenzialità della sintesi proteica, gli aminoacidi vengono catabolizzati per formare energia.

4.2.1 UTILIZZO DEGLI AMMINOACIDI PER PRODURRE ENERGIA

Gli amminoacidi vengono deaminati nel rumine, ottenendo così un gruppo amminico (NH₂) e uno carbossilico (COOH).

Il gruppo amminico, attraverso la transaminasi, viene convertito in ammoniaca.

L'ammoniaca, molecola estremamente tossica, può essere usata per formare altri amminoacidi oppure, attraverso le pareti ruminali e il sangue portale, viene trasformata nel fegato in urea, molecola molto meno tossica e pericolosa.

Parte di questa urea viene eliminata nel latte e nelle urine, ma una rilevante quantità, attraverso la saliva, viene riportata nel rumine a disposizione della flora microbica, per un suo utilizzo. Si stima che il 50-70% dell'azoto ingerito venga trasformato in urea. La proporzione di azoto ingerito che ritorna nel rumine come azoto ureico è del 30- 45% (Abeles R. H. et al., 1994)

Il gruppo carbossilico, nel fegato, viene trasformato in piruvato e può percorrere diverse vie: (1) gluconeogenesi: il piruvato viene trasformato in glucosio, che servirà per tutti gli organi, oppure può diventare glicogeno e immagazzinarsi nei muscoli e fegato, (2) diventa acetil coenzima-A: esso può unirsi all'ossalacetato e iniziare il Ciclo di Krebs, oppure le molecole condensano tra loro in corpi chetonici, oppure dall'acetil coA, attraverso l'acido grasso sintasi, si ottengono gli acidi grassi che unendosi al glicerolo formeranno i trigliceridi (Sherwood L. et al., 2006).

5. FABBISOGNI NUTRIZIONALI

Il fabbisogno nutrizionale di base è il *fabbisogno di mantenimento*, corrisponde alla quantità di energia (soprattutto glucidi e lipidi), proteine, minerali e vitamine che un animale deve assumere per sostenere le funzioni fisiologiche vitali: respirazione, circolazione sanguigna, secrezioni endocrine ed esocrine, mantenimento del tono muscolare, termoregolazione, movimento, lavoro digestivo ed assorbimento.

La termoregolazione ha un ruolo importante per la bufala, in quanto, la sua origine tropicale la rende sensibile alle basse piuttosto che alle alte temperature. La sua capacità di termoregolarsi in inverno in Italia, specie nelle zone più fredde, comporta notevoli variazioni del suo assetto endocrino. Ne sono una conferma gli alti valori ematici degli ormoni tiroidei riscontrati in inverno.

In questa stagione, le bufale allevate nelle zone pedemontane della Campania, presentano valori ematici degli ormoni tiroidei più elevati di quelle in aziende limitrofe al mare (Campanile G. et al., 1995).

I principi nutritivi, e l'energia contenuta nei macronutrienti, se maggiori rispetto al fabbisogno di mantenimento, vengono utilizzati per le produzioni, cioè vengono incorporati nelle molecole sintetizzate dall'animale per aumentare la propria massa corporea (muscolo, grasso...) o contenute nelle secrezioni (latte) e sono chiamati *fabbisogni di produzione*.

Quest'ultimi sono composti da, *fabbisogni di accrescimento*, che corrispondono ai principi nutritivi e all'energia progressivamente accumulati nel corpo animale durante la crescita e dai *fabbisogni di lattazione* che corrispondono all'energia e ai principi nutritivi contenuti in un chilogrammo di latte prodotto che saranno quindi molto variabili tra specie diverse.

In particolare, è il tenore in grasso che influenza in modo rilevante il contenuto energetico del latte e quindi una stima dei fabbisogni di energia si ottiene basandosi sulla percentuale lipidica.

Nel caso della bovina, il latte standard presenta una quantità di lipidi, di proteine e di lattosio pari rispettivamente al 4,0%, al 3,1% e al 4,9%, questi valori possono oscillare a seconda del patrimonio genetico, stadio di lattazione, tipo di dieta ecc..

I lipidi possono variare, ad esempio nella Frisona italiana, dal 2,8% al 4,2% e le proteine dal 2,7% al 3,5%.

Nella bufala la percentuale di grasso oscilla, invece, dal 5,5% al 13% e quello in proteine dal 3,8% al 5,5%.

Il fabbisogno in energia, pertanto, per litro di latte di vacca varia da UFL 0,35 a UFL 0,45 ($\Delta = 28,6\%$) mentre nella bufala risulta compreso tra UFL 0,53 e UFL 1,02 ($\Delta = 92,5\%$) (Tabella 5.1).

Nelle bufale che sono in grado di produrre un latte ricco in lipidi, i surplus energetici vengono utilizzati per questo scopo, mentre in quelle che non presentano la suddetta capacità, si verifica l'accumulo di riserve corporee. Frequentemente nelle prime, una eventuale carenza di energia non si traduce nella produzione di un latte con minore tenore lipidico ma in una minore produzione di latte.

In considerazione del fatto che nella vacca l'incremento del tenore lipidico di solito non supera il 29% mentre nel caso della bufala può superare anche il 92%, scaturisce che gli eccessi energetici possono determinare ingrassamento più nella vacca (sindrome della vacca grassa) che non nella bufala; quest'ultima utilizza, infatti, in maniera più proficua gli eccessi per modificare la composizione chimica del latte (Zicarelli L., 1990).

Tabella 5.1 Fabbisogni energetici (UFL) per la produzione in funzione del tenore in proteine e grasso di un kg di latte di bufala (Zicarelli L., 1990 - modificata).

PROTEINE (G/KG)	GRASSO (G/KG)	UFL (/KG)
38	50	0.53
38	55	0.55
40	60	0.59
40	65	0.61
45	90	0.77
50	115	0.92
50	120	0.94
50	130	0.99
55	130	1.02

Tuttavia, non sempre i fabbisogni di lattazione possono essere colmati con i principi nutritivi assorbiti dal tubo digerente. Infatti, nelle bufale ad inizio lattazione, le asportazioni di principi nutritivi con il latte prodotto sono superiori alle assunzioni che l'animale riesce ad ottenere con l'alimentazione.

In questo caso, le riserve corporee si mobilitano per compensare le carenze e l'animale dimagrisce, ma esse possono ripristinarsi nella fase finale della lattazione, quando l'animale assume più principi nutritivi di quelli che perde per il mantenimento e quindi recupera il peso perso.

Infine, i fabbisogni di produzione comprendono anche i *fabbisogni di gravidanza* che corrispondono ai principi nutritivi e all'energia accumulata nel feto, nei fluidi, negli invogli fetali e nello sviluppo dell'utero e della mammella. Questo fabbisogno rimane contenuto per la maggior parte della gravidanza, mentre aumenta rapidamente nell'ultimo terzo, in quanto si ha un forte sviluppo del feto, degli organi e dei tessuti (Bittante G. et al., 1990).

5.1 ECCESSO DI NUTRIENTI E FORMAZIONE DI DEPOSITI ADIPOSI O LATTE

Come precedentemente accennato, se le sostanze nutritive assorbite dall' alimento soddisfano i fabbisogni di mantenimento, quelle in eccesso possono essere ripartite tra l'accrescimento con formazione di depositi adiposi e la produzione di latte. Il prevalere dell'uno o dell'altro dipende dalla predisposizione genetica e dall'orientamento delle fermentazioni ruminali. Per esempio, la somministrazione a vacche in lattazione di diete eccessivamente ricche di concentrati amilacei, provoca un' alta produzione nel rumine di acido propionico (C3), che determina un aumento della glicemia poiché il propionato è il principale precursore del glucosio nei ruminanti, a cui consegue un aumento dell'insulina nel sangue, la quale indirizza l'impiego dei nutrienti verso l'accrescimento e l'ingrassamento, riducendo la disponibilità mammaria del precursore dei composti del latte.

Di conseguenza, il rapporto foraggi/concentrati è importante per la salute dell'animale e per consentire un efficiente trasferimento nel latte dei nutrienti assorbiti senza disperderli negli accumuli adiposi.

Tabella 5.2 Effetto del rapporto foraggi/concentrati sul bilancio energetico delle vacche (Bittante G. et al., 1990).

	<u>RAPPORTO FORAGGI/CONCENTRATI</u>		
	<u>60/40%</u>	<u>40/60%</u>	<u>20/80%</u>
<i>ENERGIA NETTA INGERITA (MJ/D)</i>	51.3	52.9	50.0
<i>ENERGIA NEL LATTE (MJ/D)</i>	56.6	55.3	44.5
<i>ENERGIA CORPOREA (MJ/D)</i>	-5.3	-2.4	+5.5

6. PATOLOGIE METABOLICHE NEL PERIODO DI TRANSIZIONE

Il periodo di transizione è un momento estremamente delicato della vita del ruminante, importante è però sottolineare che, nel periodo di transizione, è fisiologica la mobilitazione delle riserve corporee, ma tale mobilitazione non deve essere spinta a tal punto da compromettere la salute della gestante.

Il periodo di transizione va dalle 3 settimane prima alle 3 settimane dopo il parto. L'animale in questo lasso di tempo sperimenta una serie di cambiamenti (Vazquez-Añon M. et al., 1994 ; Bell A. W., 1995): deve affrontare le ultime fasi della gestazione che presentano una maggiore richiesta di nutrienti da parte del feto, il parto (evento fisiologicamente stressante), una riduzione dell'ingestione di alimento del 30% a causa dell'ingombro fetale, la preparazione dei tessuti mammari all'inizio della lattazione, la produzione di colostro e il picco di lattazione (richiede 4-5 volte l'energia del fabbisogno di mantenimento), una variazione della dieta e infine variazioni ormonali.

Questa modificazione ormonale determina: diminuzione del progesterone, incremento dei glucocorticoidi e prolattina (stimolano la glicogenolisi epatica e la lipolisi) (Doepel L. et al., 2002), aumento dell'ormone della crescita (riduce l'effetto inibitorio dell'insulina sulla gluconeogenesi, innesca la mobilitazione delle riserve corporee dai tessuti adiposi con liberazione di acidi grassi non esterificati (NEFA) e glicerolo ed infine limitano la captazione di glucosio da parte di organi e tessuti periferici)(Bauman D. E. and Currie W. B., 1980 ; De Koster J. D. and Opsomer G., 2013), ma il cambiamento ormonale più importante è la riduzione della secrezione di insulina, che presenta un'azione anabolica nell'organismo, infatti tra le sue innumerevoli funzioni, vi sono l'aumento della sintesi di glicogeno, l'inibizione della gluconeogenesi, l'assorbimento di amminoacidi nei tessuti extraepatici e l'aumento della sintesi di trigliceridi nel tessuto adiposo con conseguente riduzione della concentrazione di acidi grassi liberi a livello ematico (FFA) (Sjaastad V. et al., 2013).

Pur essendoci una riduzione nella secrezione ormonale di insulina, questa non si traduce in un aumento della glicemia nell'animale, in quanto il glucosio ematico disponibile va a sopperire le richieste da parte del feto e della ghiandola mammaria.

Tutto questo porta l'animale ad avere un grande aumento del fabbisogno energetico e al contempo una ridotta disponibilità di energia a causa della ridotta ingestione di sostanza secca. Si ha così un bilancio energetico negativo.

Il periodo di transizione può essere suddiviso in due fasi distinte, contraddistinte entrambe da un bilancio energetico negativo: da 5 a 7 giorni prima del parto, si ha una riduzione del 30% dell'ingestione di sostanza secca (DMI) che si traduce in una perdita dal 1,7 al 2% del peso corporeo dell'animale, e da 0 a 21 giorni dopo il parto, si ha sempre un continuo e progressivo decremento del bilancio energetico (dovuto all'elevata produzione latte) associato però ad un aumento dell'ingestione nell'animale (Grant R. J. and Albright J. L., 1995).

La bufala per soddisfare le proprie esigenze, modifica il proprio metabolismo che diviene prettamente catabolico, mediante la mobilitazione delle riserve corporee dai tessuti adiposi e delle proteine, con conseguente aumento degli acidi grassi non esterificati circolanti (NEFA) nel sangue.

Queste riserve corporee hanno origine da un più breve periodo di lattazione (270 g) e un più lungo periodo di asciutta (4 mesi) rispetto alla bovina, che consente alla bufala un maggior periodo di ristoro e di accumulo di sostanze che possono essere utilizzate nella successiva lattazione (Zicarelli L. et al., 1977).

I NEFA sono indici della mobilitazione lipidica dal parto al postparto, utilizzati come un marker di un eccessivo bilancio energetico negativo. Sono la quota di acidi grassi liberi circolanti, non uniti con legame estere al glicerolo. Attraverso un prelievo di sangue, possiamo capire come variano gli acidi grassi dal parto al postparto. In questo modo capisco se la dieta somministrata è adatta. Questi valori, a differenza del BHB, possono essere misurati solo in laboratorio, di conseguenza è una misurazione più complessa.

Gli acidi grassi non esterificati possono essere utilizzati come fonte di energia nei tessuti periferici, risparmiando glucosio per la produzione di latte.

Gli acidi grassi non esterificati vanno nel fegato dove possono avvenire 3 differenti processi: (1) ossidazione completa, (2) ossidazione parziale o (3) esterificazione in trigliceridi e deposito nel fegato come riserva (Grommer R. R., 1993).

L'esterificazione è un processo attraverso il quale da 3 acidi grassi liberi e 1 glicerolo si ottiene un trigliceride. I trigliceridi sono immagazzinati negli epatociti ed asportati come lipoproteine a densità molto bassa (VLDL), che possono fungere da fonte di energia in altri tessuti.

Attraverso l'ossidazione parziale dei NEFA nel fegato, vengono prodotti: 1 molecola di glucosio e 1 corpo chetonico (acetoacetato, BHB e acetone) e quest'ultimo, come i NEFA, può essere utilizzato come fonte di energia in altri tessuti. L'ossidazione parziale viene promossa quando non c'è abbastanza energia disponibile per sostenere il mantenimento e la produzione, un fenomeno che si verifica spesso nelle bufale in parto.

Durante l'ossidazione completa, i NEFA entrano nel Ciclo di Krebs (Drackley J. K., 1999) producendo così energia (ATP) nei tessuti extraepatici quali cuore, rene, muscolo e ghiandola mammaria (Herdt T. H., 2000).

Il fegato ha una capacità limitata di sintetizzare VLDL e di ossidare completamente i NEFA. Pertanto, i NEFA sono per lo più metabolizzati attraverso l'ossidazione parziale, con conseguente aumento del livello nel plasma di BHB (Drackley J. K., 1999 ; Herdt T. H., 2000).

Il BHB o β -idrossibutirrato è un corpo chetonico, indice dell'ossidazione degli acidi grassi non esterificati nel postparto, utilizzato come marker di un eccessivo bilancio energetico negativo. Ci permette di capire le condizioni dell'animale in quel preciso momento. Ci indica l'indice di

ossidazione e la quantità di corpi chetonici prodotti, in questo modo possiamo classificare il tipo di chetosi: subclinica ($1.2 \text{ mmol/l} < \text{chetonemia} \leq 2.9 \text{ mmol/l}$) e clinica ($\text{chetonemia} > 2.9 \text{ mmol/l}$). Questo biomarker può essere misurato in stalla durante la mungitura, con un prelievo di latte, sangue (chetonemia) o urine (chetonuria).

Le bufale che non riescono a regolare la mobilizzazione del tessuto adiposo o non riescono ad asportare VLDL dal fegato, sopraffanno la capacità epatica di metabolizzare il grasso, compromettendo la funzionalità epatica causando fegato grasso (accumulo di grassi negli epatociti) e a livello ematico originano chetosi subclinica, che può portare allo sviluppo di chetosi clinica (caratterizzata da alti livelli di corpi chetonici nei fluidi) che determina un appiattimento del picco di lattazione.

La chetosi, pertanto, è responsabile di rilevanti perdite economiche per le aziende (Falchi L. et al., 2021).

L'elevata ossidazione epatica dei NEFA riduce anche l'appetito (appetito capriccioso), contribuendo ad aggravare il bilancio energetico negativo (Allen M. S. et al., 2009).

Alti livelli di BHB circolante e infiammazione del fegato influiscono negativamente sul sistema immunitario, aumentando la suscettibilità a malattie infettive come metriti⁵ e mastiti⁶, nonché una riduzione della fertilità (Kemura K. et al., 2002 ; Mordak R. and Stewart P. A., 2015).

Inoltre, l'improvviso passaggio da diete ricche di fibre e a basso contenuto energetico a diete povere di fibre e ad alto contenuto energetico, comuni durante questa fase, probabilmente contribuisce all'acidosi ruminale subacuta (SARA).

⁵ METRITE: è una grave infiammazione che coinvolge tutti gli strati dell'utero. Generalmente, si nota nel periodo fino a 21 giorni dopo il parto e ha maggiori possibilità di verificarsi nei primi giorni. La metrite può essere caratterizzata da un aumento del volume dell'utero e da una secrezione bruno-rossastra di consistenza acquosa, con presenza di pus, e può presentare un odore fetido. Può essere caratterizzata da processo febbrile, apatia, riduzione della produzione di latte e tossiemia. (Giuliodori M. J. et al., 2013).

⁶ MASTITE: infiammazione delle ghiandole mammarie. Le cause più comuni di mastite sono attribuibili a batteri, quali: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas Aeruginosa* e *Prototeca*. Tali microrganismi penetrano nella mammella attraverso lo sfintere del capezzolo, arrivando alla cisterna e, nei casi più gravi, nel tessuto mammario (Nagahata H. et al., 2007). Esiste una correlazione tra chetosi e mastite. I meccanismi difensivi della mammella operano a tre livelli. Il primo è il tentativo di eliminazione del patogeno, essenzialmente da parte dei macrofagi. Il secondo è il rilascio di sostanze infiammatorie chemioattraenti (sostanze chimiche prodotte dal corpo in caso di infiammazione o infezione che attirano le cellule del sistema immunitario verso il sito dell'infiammazione o dell'infezione (Abbas A. H. et al., 2012)) e il terzo è la migrazione, dal sangue nella mammella, dei neutrofili. In caso di chetosi, vengono ridotte alcune funzioni importanti del sistema immunitario cellulo-mediato, come la capacità fagocitaria e battericida dei macrofagi e dei neutrofili, la produzione di citochine proinfiammatorie (contribuiscono al processo di proliferazione di cellule coinvolte nei processi infiammatori e immunitari dell'organismo) e la chemiotassi. È stata anche osservata una riduzione dei leucociti ematici (cellule del sistema immunitario)(Suriyasathaporn W. et al., 2000).

Infine, la zoppia, considerata uno dei principali problemi di salute che colpiscono gli animali negli allevamenti, contribuisce anch'essa all'insorgenza di problematiche metaboliche durante il periodo di transizione. Infatti, questa patologia, determina una minore assunzione di mangime che causa un peggioramento del bilancio energetico negativo che porta ad un innalzamento dei livelli ematici di BHB. Di conseguenza, possiamo notare come una malattia può contribuire a un'altra (Fantini A., 2016).

La misurazione dei NEFA e del BHB ci fornisce preziose informazioni sul "successo" dell'adattamento al BEN. Infatti, la concentrazione dei NEFA riflette l'entità della lipolisi mentre il BHB la capacità di ossidazione dei grassi nel fegato.

Il periodo migliore per indagare la concentrazione ematica dei NEFA va dai 10 ai 4 giorni prima della data presunta del parto. Indipendentemente dalle dimensioni della mandria, per ottenere un'informazione statisticamente rappresentativa, si considera sufficiente campionare 10-12 soggetti, o comunque mai meno di 5.

L' allevamento è da considerarsi a rischio per lo sviluppo delle malattie metaboliche prima indicate, se oltre il 25% dei soggetti presentano valori di NEFA > 0.30 mEq/L (Heuer C. et al., 1999) o concentrazioni di BHB > 1.400 mmol/L nelle 2 settimane antecedenti il parto.

Successivamente al parto, verso il 3° giorno di lattazione, i NEFA raggiungono il loro picco massimo che si aggira intorno a valori sempre < 0,56 mEq/L, a causa delle innumerevoli variazioni ormonali che avvengono nell'animale. In questo periodo si considera a rischio un allevamento se si riscontra più del 25% di bufale con un valore > 0,56 mEq/L.

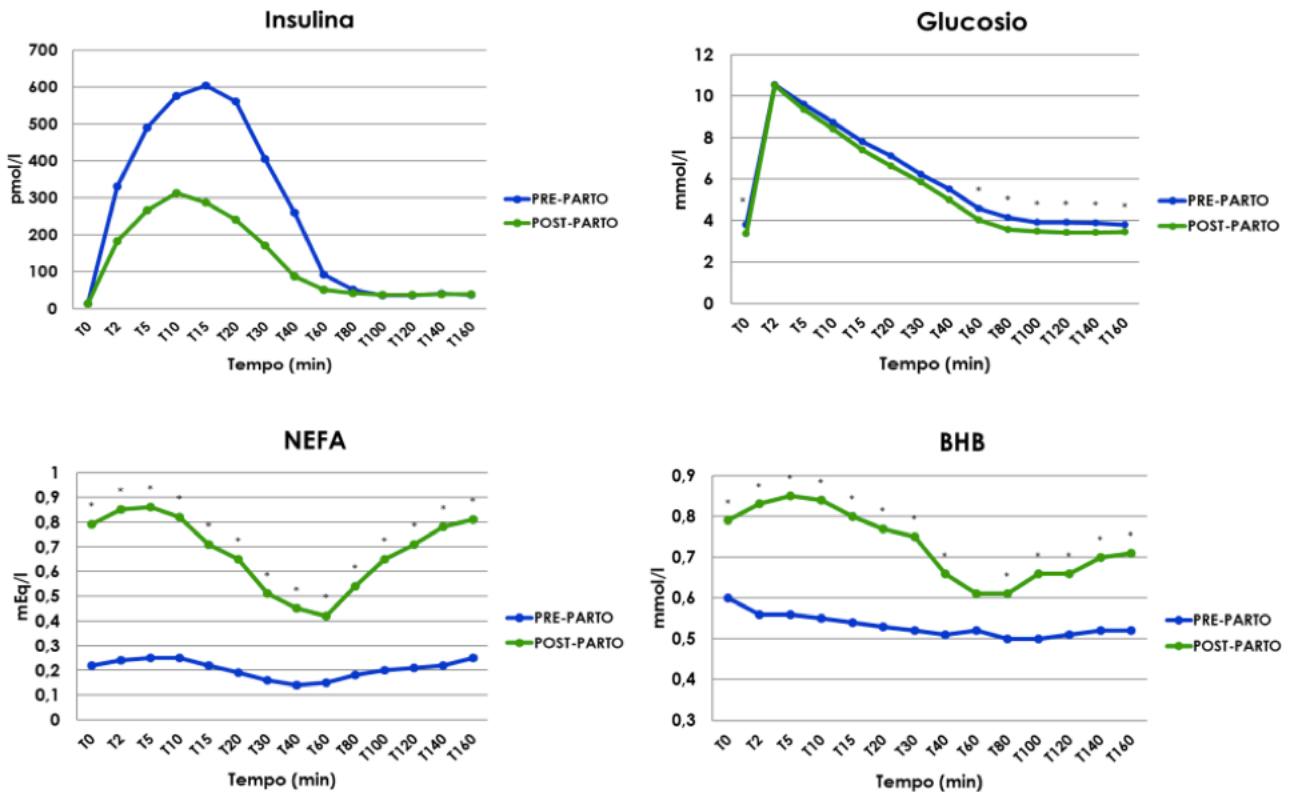
Invece, il BHB valutato nel post-parto ha come valore limite 1.2 mmol/l. Concentrazioni superiori a tale valore espongono la bufala ad un rischio maggiore di sviluppare patologie metaboliche (Ospina P. A. et al., 2010).

In sintesi, i valori di NEFA e BHB che incidono negativamente sullo stato di salute della bufala nel periodo di transizione, sono:

- ◆ NEFA 2 settimane preparto: > 0.30 mEq /L;
- ◆ NEFA in postparto: > 0.56 mEq /L;
- ◆ BHB in postparto: > 1.2 mmol/l.

La concentrazione di NEFA si normalizza poi entro le prime 5-6 settimane di lattazione, raggiungendo nuovamente un valore di 0,300 mEq/ L (Radloff H. D. et al., 1966).

Figura 6.1 Schema riportante le concentrazioni circolanti di insulina, glucosio, NEFA e BHB nel pre-parto e post-parto.

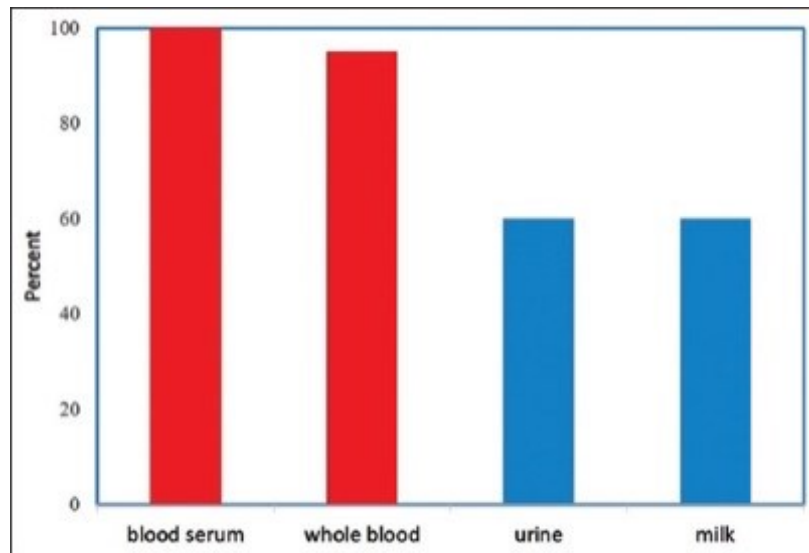


FONTE: Fiore E. et al., 2014

6.1 CHETOSI

La chetosi è una condizione patologica caratterizzata da un accumulo eccessivo nel sangue, urine e latte di corpi chetonici (acido acetoacetico, acetone e β -idrossibutirrato) come conseguenza di un bilancio energetico negativo (Guliński P., 2021).

Figura 6.2 Quota relativa di BHB nei fluidi corporei delle bovine.



FONTE: Iwerson M. et al., 2009

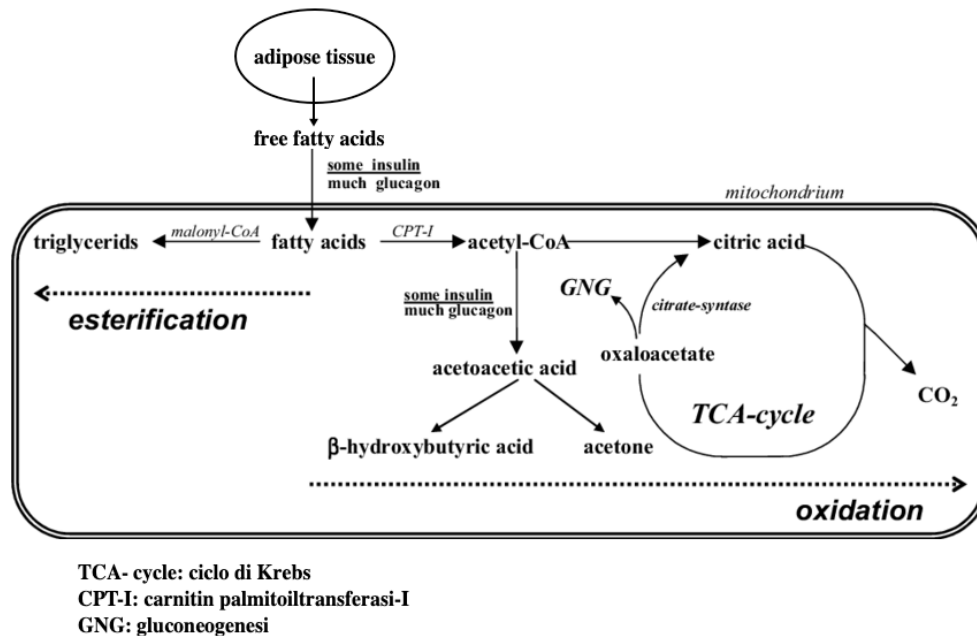
I corpi chetonici possono derivare da due fonti, mobilizzazione dei grassi corporei e fermentazione ruminale.

A livello ruminale, infatti, dalle fermentazioni si ottengono acido acetico, acido propionico e butirrico, quest' ultimo verrà convertito dall'epitelio in BHB che verrà assorbito (Fantini A., 2016).

La mobilizzazione delle riserve corporee conseguente al NEB, invece, porta ad un incremento di NEFA ematici che vengono metabolizzati a livello epatico in Acetil-CoA. Tale metabolita può seguire due vie, o essere ossidato nel ciclo di Krebs oppure essere metabolizzato in Acetoacetil-CoA, da cui derivano il BHB (mediante l'enzima β -idrossibutirrato deidrogenasi) e l'acetoacetato, quest' ultimo può spontaneamente convertirsi, senza l'intervento di alcun catalizzatore biologico, in CO₂ e acetone, che è volatile. L'acetone può essere eliminato tramite l'espiazione oppure, attraversando l'epitelio ruminale, tramite l'eruttazione. Inoltre, a livello ruminale l'acetone può essere convertito dalla microflora batterica in isopropanolo che verrà assorbito e, quindi, incrementerà la sua concentrazione a livello ematico (Constable P. D. et al., 2017).

Oltre a ciò, in condizioni di ipoglicemia, come durante il periodo di transizione, l'ossalacetato, necessario per l'ossidazione dell'Acetil-CoA nel ciclo di Krebs, viene utilizzato come substrato per la gluconeogenesi, tale per cui si favorisce la condensazione degli acetil-CoA con un ulteriore incremento dei corpi chetonici (McPherson P. A. and McEneny J., 2012).

Figura 6.3 Formazione e trasformazione dei corpi chetonici relativi al ciclo di Krebs.



FONTE: Baticz O. et al., 2002

Nel definire la chetosi si fa maggiormente riferimento ai NEFA e al BHB, poiché, quest' ultimo, è il corpo chetonico più stabile sintetizzato, in quanto non è volatile come l'acetone e l'acido acetico. Il BHB è il componente principale del volume totale di corpi chetonici nel sangue (70%).

La chetosi presenta due forme: la forma subclinica si instaura quando si verifica un aumento della circolazione del BHB tra 1.2 mmol/l e 2.9 mmol/l, senza che la bufala evidenzi una sintomatologia apparente (Ospina P.A. et al., 2010), la forma clinica, invece, esibisce una sintomatologia specifica e si osserva quando la concentrazione ematica di BHB è > 2.9 mmol/l (Oetzel G.R., 2004).

La forma subclinica (*Subclinical Ketosis*, SCK), rispetto a quella clinica (*Clinical Ketosis*, CK), ha sicuramente un'incidenza più elevata.

In uno studio presentato da Oetzel (2012), si osserva un picco di incidenza oltre il 20% al 5° giorno dopo il parto, che scende poi progressivamente sotto il 5% al 10° giorno (Oetzel G.R., 2012). Mentre McArt (2012) riporta un picco di prevalenza del 28,9% al 5° giorno dopo il parto (McArt J.A. et al., 2012).

I sintomi clinici della chetosi includono perdita di appetito (appetito capriccioso), preferenza per il foraggio rispetto al mangime concentrato, odore di acetone nella bocca e nelle urine, stati di ottusità e di mancata vigilanza intervallati da momenti di eccessiva eccitazione, un calo delle produzioni, un aumento del rischio di contrarre altre malattie a causa della riduzione di alcune funzioni importanti del sistema immunitario (mastite, metrite), spostamento dell'abomaso e scarse prestazioni riproduttive, infatti, si è osservata una riduzione del tasso di concepimento del 20% al primo intervento fecondativo

con SCK diagnosticata nella seconda settimana dopo il parto. Bufale con SCK nella prima settimana dopo il parto hanno il 50% in meno di probabilità di rimanere gravide alla prima inseminazione (Walsh R.B. et al., 2007).

Infine, uno degli effetti caratteristici della chetosi è un'alterazione significativa della qualità del latte. In genere, si riscontra un aumento della percentuale di grasso (nel caso delle bovine >5%) dovuto a una maggiore disponibilità per la mammella di BHB e acidi grassi per la sintesi del grasso del latte. Questo fenomeno è più marcato nei primi 30 giorni di lattazione. Al contrario, a causa della minore disponibilità di glucosio alla mammella, si osserva una riduzione della percentuale di proteina del latte (nel caso delle bovine <2,9%).

Tabella 6.1 Rischio associato a determinate patologie in caso di SCK nelle bovine (BHB > 1,4 mmol/l) (Fantini A., 2016).

<u>PATOLOGIA</u>	<u>RISCHIO</u>
<i>Dislocazione Abomasale</i>	3.3
<i>Chetosi Clinica</i>	5.4
<i>Riforma precoce (60gg)</i>	1.9
<i>Morte</i>	1.75
<i>Metrite</i>	1.52
<i>Ritenzione di placenta</i>	1.61
<i>Mastite Clinica</i>	2.01
<i>Zoppia</i>	2.0

Di conseguenza, la chetosi è una malattia con un grave impatto sulle prestazioni degli animali e sul benessere economico.

Un elemento essenziale nella prevenzione della chetosi è mantenere gli animali in buone condizioni durante il periodo perinatale.

La condizione delle vacche (BCS) durante questo periodo dovrebbe essere compresa tra 3.0 e 3.5. (Wildman E.E. et al., 1982), mentre nel caso delle bufale, bisognerebbe preservare un BCS di 3.5-4, poiché la conformazione di una bufala è diversa da quella di una vacca da latte.

La prima, infatti, a parità di deposizione di grassi nel sottocute, presenta una minore infiltrazione lipidica nei muscoli. Per le bufale, quindi, viene utilizzata una scala da 1 a 9 (Zicarelli L., 1990).

Vacche in sovrappeso con BCS superiore a 4.0 in questo momento hanno una maggiore probabilità di manifestare, oltre alla chetosi, altri problematiche, come: parto difficile, ritenzione della placenta e paralisi postpartum. Le vacche con BCS elevato al parto (BCS ≥ 4.0) hanno livelli elevati di corpi chetonici circolanti nel plasma. Inoltre, le vacche che iniziano la lattazione in una condizione troppo scarsa, < 2.5, non hanno riserve energetiche. Il rischio di malattie perinatali, in questo caso, è molto più basso, ma la successiva produzione e riproduzione di tali animali sarà a un livello inferiore (Ranaraja U. et al., 2016).

La sostanza più utilizzata e dotata della maggiore efficacia per la cura e prevenzione della chetosi è il glicole propilenico. Si tratta di un liquido inodore e incolore, dal sapore dolciastro, ma poco appetibile. Ha la funzione di diminuire le concentrazioni di NEFA e BHBA nel sangue. Una parte del glicole passa inalterato e viene assorbito dall'intestino, mentre la restante viene convertita e assorbita come acido propionico e propanolo nel rumine.

La quota che by-passa (>50%) dipende dalla modalità di somministrazione ed è molto più elevata se il glicole viene dato per via liquida o in dosi concentrate.

Questa sostanza fornisce al fegato una quota molto elevata di propionato per la gluconeogenesi e per l'ingresso diretto nel ciclo di Krebs, ma induce anche un innalzamento dell'insulina dopo 15 minuti dalla somministrazione che rimane a livelli elevati per 2 ore, incrementando la disponibilità di glucosio per il metabolismo.

Pertanto, il glicole propilenico determina una diminuzione del rapporto tra metaboliti chetogenici e glucogenici che inibiscono la lipolisi e riducono l'accumulo dei corpi chetonici.

7. MATERIALI E METODI

7.1 ANIMALI E STALLA

I campioni sono stati recuperati da 63 bufale mediterranee italiane (MB) selezionate da un unico allevamento situato a Caserta (Campania, Italia). Tutti gli animali selezionati erano nei primi 50 giorni di lattazione e sono stati scelti casualmente all'interno dell'intero gruppo di bufale munte due volte al giorno.

L'azienda agricola selezionata è stata casualmente estratta all'interno di un gruppo di 10 richiedenti regolarmente consulenza presso Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD) del Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) di Napoli (Italia). I criteri utilizzati per selezionare l'allevamento erano: (1) ~ 400 bufale, costante durante l'anno; (2) un sistema d'alimentazione basato sull'unifeed (TMR), somministrato due volte al giorno; (3) l'assenza di un programma di monitoraggio regolare per le malattie metaboliche; (4) alloggio e sistema di gestione generale basato nel rispetto dello standard minimo di benessere per le bufale (De Rosa G. et al., 2015).

Il TMR includeva i seguenti ingredienti: fieno secco, insilati di loietto, mais, mangime (Stick-Florida®, Fusco Industria, Distretto di Caserta, IT) (caratterizzato da: 23% di proteine grezze provenienti prevalentemente da legumi e cereali, lipidi grezzi 5,5%, fibra grezza 7,5%, ceneri 6,9%, sodio 0,32%) e bicarbonato di sodio. La composizione del TMR è stata determinata utilizzando un analizzatore portatile basato sulla spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS) (AgriNIRTM Analyzer, Dinamica Generale® s.p.a., Mantova, Italia).

7.2 PROCEDURE CLINICHE E DISEGNO SPERIMENTALE

Le bufale selezionate sono state confinate individualmente in un travaglio e sottoposte a esami per malattie come mastiti, metriti, malattie gastrointestinali e malattie podaliche.

Durante l'esame, il BCS (Body Condition Score) degli animali è stato valutato utilizzando un punteggio di 9 punti (punteggio 4.5 = BCS ideale) secondo Guccione J. et al. (2016) utilizzando l'ispezione visiva e la palpazione manuale di quattro aree del corpo in cui l'animale deposita il grasso: costole, spina dorsale, fianchi e base della coda. Tale punteggio è assegnato per identificare il quantitativo di energia metabolizzabile, immagazzinata sotto forma di grasso e muscolo in un animale vivo (Edmonson A. et al., 1989).

Al termine dell'esame clinico, sono stati prelevati campioni di sangue mediante vena giugulare con siringhe monouso da 10 mL (Becton Dickinson Hypodermic Syringes, Franklin Lakes, USA – ago calibro 21). Alcune gocce di sangue (ottenute direttamente dalla siringa) sono state immediatamente utilizzate per un test BHB sul campo (FreeStyle®, Abbott, Maidenhead, Berkshire, UK), mentre il sangue rimasto è stato diviso tra una provetta contenente EDTA (3mL Vacutainer®, Becton and Dickinson, Franklin Lakes, US) per evitare la coagulazione e una provetta contenente l'attivatore del coagulo (9 mL Vacutainer®, Becton and Dickinson, Franklin Lakes, US). I campioni sono stati quindi

centrifugati per 15 minuti (modello di centrifuga DMO412, GIORGIO-BORMAC s.r.l., Carpi, IT) per ottenere rispettivamente il plasma e il siero.

I campioni di plasma e siero sono stati immediatamente posti in una scatola a 4°C e portati alla stessa temperatura al laboratorio di riferimento dell'Università di Napoli, entro 1 ora dal prelievo per ulteriori indagini.

Per ogni campione di plasma, sono stati immediatamente trasferiti 250 µL di plasma in provette Eppendorf di capacità 1 mL e contenenti 5 mg di pirogallolo per ridurre l'ossidazione degli acidi grassi (Lisuzzo A. et al., 2022). I campioni ottenuti sono stati agitati fino a completa dissoluzione del pirogallolo.

Invece, i campioni di siero sono stati trasferiti in provette Eppendorf di capacità 1 mL senza pirogallolo.

Subito dopo, plasma e siero sono stati messi dentro al ghiaccio e inviati, al Dipartimento di medicina animale, Produzione e Salute (MAPS) presso l'Università di Padova (Italia), per le successive analisi biochimiche e TLC-GC. Nell'attesa i campioni sono stati stoccati a -20°C.

7.3 ANALISI BIOCHIMICHE E DIVISIONE DEL GRUPPO

L'analisi biochimica è stata eseguita utilizzando un analizzatore automatico (BT3500 Biotecnica Instruments S.p.a., Roma, Italia).

La concentrazione di BHB è stata determinata mediante RANBUT RX Monza test (Randox, Crumlin, Regno Unito).

La concentrazione di NEFA è stata determinata con un metodo colorimetrico (NEFA RX Monza test; Randox, Crumlin, Regno Unito).

La concentrazione di glucosio è stata determinata mediante Glucose Monoreagent, LR (Gesam S.r.l., Campobello di Mazara, Italia).

Considerando che non esiste un cut-off di BHB per le bufale per identificare gli animali come sani e iperchetonemici, abbiamo selezionato un cut-off soggettivo come descritto nello studio di Fiore E. et al., 2023.

In particolare, abbiamo utilizzato la concentrazione di BHB riportata in un precedente studio sulle bufale sane nello stesso periodo di lattazione (Fiore E. et al., 2017) utilizzando il valore medio di BHB di 0,4 mmol/L più tre deviazioni standard di 0,1 ciascuno, per stabilire un cut-off soggettivo di BHB di 0,7 mmol/L.

In base alla concentrazione, ottenuta in laboratorio, di BHB nel siero, le bufale sono state poi suddivise in: gruppo sano (Gruppo H) iscritte 38 bufale con livello di BHB < 0,70 mmol/L e gruppo a rischio di iperchetonemia (Gruppo K) iscritte 25 bufale con livello BHB ≥ 0,70 mmol/L.

7.4 CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE ASSOCIATA ALLA GASCROMATOGRAFIA (TLC-GC)

Sui campioni di plasma è stata svolta la cromatografia su strato sottile (TLC) associata alla gascromatografia (GC). La procedura per il plasma TLC-GC era simile a Fiore et al. (2020) (Fiore et al., 2020) sul plasma delle vacche da latte. In breve, ciascun campione è stato miscelato con uno standard interno (IS) per ciascuna classe lipidica (C15 per PL e C17 per FFA, TG e CE), per la quantificazione dei singoli acidi grassi.

Successivamente, l'estrazione dei lipidi è stata eseguita mediante separazione bifasica utilizzando una miscela 2:1 di cloroformio e metanolo. Questa fase ha permesso l'estrazione dei lipidi del plasma (sostanza organica) dalla componente acquosa. E ha determinato la formazione di due fasi ben distinte: il surnatante contenente metanolo e acqua, e il sottonatante, contenente cloroformio e lipidi, queste divise da un sottile stato proteico. Per intensificare la separazione delle due porzioni (componente acquosa e lipidi) è stato aggiunto NaCl.

In tal modo è stato possibile eseguire il prelievo del solo sottonatante, frazione organica e fortemente apolare ricca in lipidi.

La componente organica è stata esposta a un blocco riscaldante a 37 °C e ad un leggero flusso di azoto, in modo da consentire l' evaporazione del solvente organico in cui erano disciolti i lipidi, evitando l'ossidazione degli acidi grassi insaturi.

Successivamente all'estrazione dei lipidi dal plasma, è stata eseguita la TLC o cromatografia su strato sottile, metodo per separare una miscela nei suoi componenti chimici. È stata utilizzata una lastra di vetro, rivestita da uno strato uniforme di gel di silice (fase stazionaria), una camera di sviluppo ed un eluente (fase mobile). Sulla lastra è stata tracciata la linea di deposizione dei campioni. I campioni sono stati sciolti in 100 µl di cloroformio addizionato con 50 mg/L di BHT come antiossidante e depositati sulla linea di partenza della corsa cromatografica.

La separazione delle classi lipidiche, è stata generata a causa di un diverso grado di affinità tra i composti presenti nel campione, la fase stazionaria e la fase mobile. La fase stazionaria (gel di silice) è polare e questo ha permesso la migrazione più lenta dei composti polari mentre per quelli apolari la migrazione è avvenuta molto più velocemente, generando così delle migrazioni ad altezze differenti dalla linea di deposizione (Santiago M. and Strobel S., 2013).

In seguito, è stata nebulizzata fluoresceina sulla lastra cromatografica che ha generato un contrasto cromatico.

Alla fine di queste procedure, osservando con una lampada UV, sono stati visti quattro diversi composti per ciascun campione: PL, FFA, TG e CE.

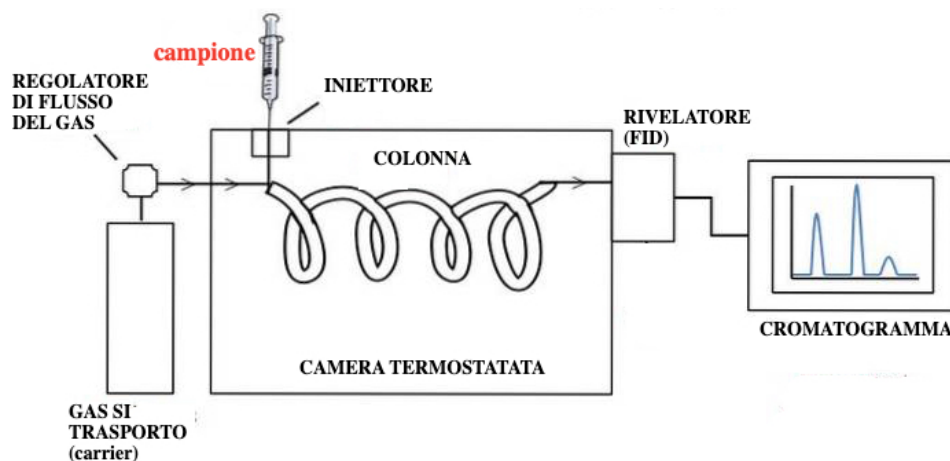
L'ultimo processo prevede l'utilizzo di acido cloridrico metanolico 3N per la metilazione delle classi lipidiche.

I campioni ottenuti sono stati posti in un forno per 1h a 100 °C e poi neutralizzati con una soluzione al 10% di carbonato di potassio (K_2CO_3). Alla fine della procedura di neutralizzazione, i campioni sono stati estratti con esano aggiunto con 50 mg/dl di BHT (butilidrossitoluene, antiossidante che previene l'ossidazione dei lipidi durante l'estrazione).

Alla fine, sono stati ottenuti 40 acidi grassi per ogni classe lipidica per ciascun campione di plasma.

Successivamente è avvenuta l'iniezione automatica dei composti nel gascromatografo, dove gli esteri metilici (FA) sono stati separati e quantificati in modalità splitless (modalità di iniezione in gascromatografia che consiste nel chiudere il flusso di gas che porta via una parte del campione iniettato, in modo da far entrare tutto il campione nella colonna cromatografica) mediante gascromatografia utilizzando un gascromatografo TRACE GC/MS (Thermo Quest, Milano, Italia). Questo gascromatografo è dotato di: una colonna capillare polare in silice fusa (Colonna capillare Omegawax, pellicola 30 m× 0,25 mm× 0,2 μm) e un rivelatore il Flame Ionization Detector (FID) costituito da una fiamma alimentata da idrogeno, azoto e aria, che genera un disturbo elettrico. All'arrivo di un nuovo estere metilico al FID, il composto subiva una vera e propria combustione tale da indurre una notevole variazione del disturbo elettrico. Una piccola resistenza, rilevava la differenza di potenziale che si creava tra il rumore di fondo, generato dalla fiamma, e l'energia generata dalla combustione delle sostanze.

Figura 7.1 Schema delle componenti del Gascromatografo utilizzato per le analisi, che ci fornisce come risultato finale, un cromatogramma.



FONTE: bitesizebio

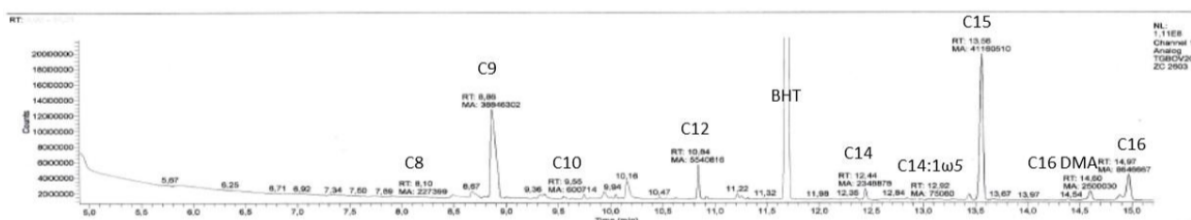
Figura 7.2 Gascromatografo Thermo Quest TRACE GC/MS in dotazione presso il Laboratorio di Analisi dell'Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD), Università degli Studi di Padova.



Il segnale elettrico di ogni catena carboniosa è stato tradotto, in grafico, come un picco positivo dove l'ordinata indica la quantità di FA e l'ascissa il tempo di uscita dalla colonna capillare. I segnali elettrici sono stati, quindi, elaborati dal software come parte di un cromatogramma (Figura 7.3). In base al tempo di uscita dalla colonna capillare è stato possibile identificare i diversi FA presenti nel composto e attraverso lo standard interno, a concentrazione nota, è stato possibile calcolarne la quantità indicata dall'area sottesa dal picco positivo. I dati per gli acidi grassi plasmatici sono stati calcolati in mg/dL.

Le analisi sono state effettuate nel Laboratorio di Analisi dell'Ospedale Veterinario dell'Università di Padova.

Figura 7.3 Esempio di una porzione di cromatogramma dei trigliceridi. Nella quale viene riportato il nome dell'acido grasso corrispondente al picco, RT (tempo di ritenzione, cioè l'intervallo di tempo che intercorre da quando una sostanza viene iniettata all'interno della colonna stessa, fino all'istante in cui si registra il punto più alto del picco nel cromatogramma, generato dalla rilevazione da parte del rilevatore di un componente della miscela. Il tempo di ritenzione fornisce un'indicazione del grado di affinità della sostanza eluita nei confronti della fase stazionaria: maggiore è il tempo di ritenzione maggiore sarà l'affinità della sostanza eluita nei confronti della fase stazionaria) e MA (area sottesa dal picco cioè la quantità dell'acido grasso presente)



7.5 ANALISI STATISTICHE

L'analisi statistica è stata eseguita con il software R ver. 4.2.1 (R core team, Vienna, Austria).

La normale distribuzione dei dati è stata valutata utilizzando il test statistico di Shapiro-Wilk.

La normalità di una distribuzione campionaria è una proprietà statistica che indica che la distribuzione dei dati segue una distribuzione normale o gaussiana. Una distribuzione normale è caratterizzata da una forma a campana simmetrica e dalla presenza di una media e una deviazione standard. La normalità è importante perché molte tecniche statistiche richiedono che i dati siano normalmente distribuiti per poter essere applicate correttamente.

La comparazione tra i dati di gruppi di animali e l'analisi biochimica è stata condotta mediante ANOVA unidirezionale.

Dati sugli animali (BCS, parity, DIM (day in milk) e produzione giornaliera) e dati biochimici (NEFA, colesterolo (CHO), trigliceridi (TGR), glucosio (GLU), γ -glutamyl-transferasi (GGT), aspartato transaminasi (AST) e alanina transaminasi (ALT)) sono stati inclusi singolarmente o associati come covariata in modelli statistici per valutare la differenza nei profili degli acidi grassi.

Questi modelli sono stati valutati con il criterio di informazione di Akaike (AIC) e con il criterio di informazione bayesiano (BIC) per confrontare diversi modelli possibili e determinare quale è la soluzione migliore per i dati. Il modello lineare che includeva l'effetto fisso del gruppo e il BCS come covariata ha mostrato l'AIC e il BIC più bassi ed è stato selezionato per valutare la differenza nelle concentrazioni di acidi grassi tra i gruppi di ciascuna classe lipidica. Il Test di Bonferroni è stato utilizzato per valutare le differenze interparametriche, esistenti nelle due diverse classi di BHB, per ciascun acido grasso.

I dati sono stati espressi come LSMEANS e SEM (errore standard della media).

La soglia di significatività è stata fissata a $p\text{-value} \leq 0,05$.

I parametri che presentavano un valore p compreso tra 0,05 e 0,1 sono stati considerati come tendenza alla significatività.

Successivamente, è stato effettuato il Boruta Test (utilizzando il software R2, Santa Monica, CA) per selezionare gli acidi grassi (FA) con una funzione predittiva per il gruppo a rischio di iperchetonemia. Infine, è stata eseguita la curva ROC (Receiver Operating Characteristic) (MedCalc Software Ltd, Ostenda, Belgio) sugli acidi grassi selezionati dal Boruta Test che ci permette di stabilire il valore soglia di ogni acido grasso predittivo, oltre il quale l'animale è considerato in chetosi.

Le curve ROC sono state derivate dall'analisi di ogni acido grasso in ogni classe lipidica.

La curva ROC è un grafico che mette in relazione la sensibilità (Se - proporzione di malati che vengono classificati in maniera corretta) e la specificità (Sp - proporzione di sani classificati correttamente) di un test diagnostico al variare del valore di cut-off. L'obiettivo di un test diagnostico è classificare correttamente un animale malato o sano (Zagani S., "med4care").

Il punto più elevato della curva, rispetto alla retta che taglia il grafico a 45° partendo dall'origine, sarà il nostro valore di soglia.

L'area sotto la curva (AUC) esprime il potere diagnostico del test come segue:

- AUC da 0,9 a 1,0 = test eccellente;
- AUC da 0,8 a 0,9 = test buono;
- AUC da 0,7 a 0,8 = test moderato;
- AUC da 0,6 a 0,7 = test scarso;
- AUC da 0,5 a 0,6 = fallimento (Xia J. et al., 2013).

8. RISULTATI

I dati degli animali che includevano BCS, parity, DIM e la produzione giornaliera non mostravano differenze tra i gruppi, ad eccezione di BCS che era leggermente maggiore nel Gruppo K rispetto al Gruppo H (5.08 nel gruppo K contro 4,58 nel gruppo H; valore $p=0,058$). Per quanto riguarda l'analisi biochimica, BHB e AST erano gli unici due parametri con concentrazione molto maggiore nel Gruppo K (0,74 mmol/L e 164,0 u/L nel gruppo K e 0,47 mmol/L e 140,0 u/L nel gruppo H, rispettivamente; valori $p < 0.0001$ e $0,017$) rispetto al Gruppo H (Tabella 8.1).

Tabella 8.1 Dati sugli animali e parametri biochimici di bufale mediterranee suddivise in Gruppo H (gruppo sano: BHB < 0.70 mmol/L) e Gruppo K (a rischio di iperchetonemia: BHB ≥ 0.70 mmol/L).

Parametri	Gruppo H (n=38)	Gruppo K (n=25)	SEM	p-value
<i>BCS</i> ¹	4.58	5.08	0.18	0.058
<i>Parity</i>	3.53	3.89	0.37	0.506
<i>DIM</i> ²	30.4	33.5	2.19	0.330
<i>Produzione di latte (Kg/d)</i>	14.3	14.9	0.58	0.461
<i>BHB</i> ³ (mmol/L)	0.47	0.74	0.02	< 0.0001
<i>NEFA</i> ⁴ (mEq/L)	0.24	0.25	0.02	0.883
<i>CHO</i> ⁵ (mg/dL)	75.0	86.2	5.48	0.161
<i>TGR</i> ⁶ (mg/dL)	9.35	10.09	0.49	0.302
<i>GLU</i> ⁷ (mg/dL)	62.4	64.3	1.28	0.313
<i>GGT</i> ⁸ (u/L)	19.6	21.8	1.06	0.170
<i>AST</i> ⁹ (u/L)	140.0	164.0	7.12	0.017
<i>ALT</i> ¹⁰ (u/L)	48.0	49.4	2.07	0.638

¹ Body condition score; ² Giorni di lattazione; ³ β -idrossibutirrato; ⁴ Acidi grassi non esterificati; ⁵ Colesterolo; ⁶ Trigliceridi; ⁷ Glucosio; ⁸ γ -Glutamyl-transferasi; ⁹ Aspartato transaminasi; ¹⁰ Alanina transaminasi.

Per ciascuna delle quattro classi lipidiche è stata confrontata la composizione dei differenti acidi grassi tra il Gruppo H e il Gruppo K. E' stato rilevato che 17 su 40 acidi grassi identificati hanno una differenza statisticamente significativa tra il gruppo K e Gruppo H.

Nello specifico:

- C8:0 in PL;
- C10:0 in TG;
- C12:0 in TG;
- C16:1 ω 7 in CE;
- C16:2 ω 4 in PL;
- C16:3 ω 4 in TG;
- C16:4 ω 1 in CE;
- C18:1 ω 7 in PL e TG;
- C18:3 ω 6 in FFA;
- C20:1 ω 9 in PL e FFA;
- C20:3 ω 3 in TG e CE;
- C20:5 ω 3 in FFA;
- C22:2 ω 6 in FFA;
- C22:4 ω 6 in FFA;
- C22:5 ω 3 in FFA e CE;
- C22:6 ω 3 in PL e CE;
- C24:1 ω 9 in PL, FFA e TG.

Altri 6 acidi grassi hanno mostrato una tendenza alla significatività:

- C16:4 ω 1 in FFA;
- C18:1 ω 9 in PL;
- C18:2 ω 6 in TG;
- C20:1 ω 11 in PL;
- C20:3 ω 3 in FFA;
- C22:1 ω 9 in FFA.

Le differenze nel profilo degli acidi grassi di PL sono state mostrate nella Tabella 8.2. Tutti gli acidi grassi significativi di questa classe lipidica (C8:0; C16:2 ω 4; C18:1 ω 9; C18:1 ω 7; C20:1 ω 11; C20:1 ω 9; C22:6 ω 3; e C24:1 ω 9) hanno mostrato un aumento nel Gruppo K rispetto al Gruppo H. ($p < 0.05$)

Tabella 8.2 Medie di acidi grassi plasmatici \pm errore standard della media (SEM) del profilo dei fosfolipidi plasmatici (PL) associati al Gruppo H (gruppo sano: BHB < 0.70 mmol/L) e Gruppo K (a rischio di iperchetonemia: BHB \geq 0.70 mmol/L).

PL	Nomenclatura	Gruppo H (n=38)	Gruppo K (n=25)	SEM	p-value
C6:0	Acido caproico	0.05	0.06	0.004	0.510
C8:0	Acido caprilico	0.03	0.05	0.005	0.017
C10:0	Acido caprico	0.05	0.05	0.006	0.650
C12:0	Acido laurico	0.41	0.46	0.068	0.750
C14:0	Acido miristico	0.43	0.47	0.045	0.760
C14:1 ω 5	Acido miristelaidico	0.14	0.17	0.016	0.560
C16:0	Acido palmitico	15.8	17.1	0.868	0.840
C16:1 ω 9	Acido ipogeico	0.15	0.16	0.010	0.810
C16:1 ω 7	Acido palmitoleico	0.32	0.38	0.022	0.290
C16:2 ω 4	Acido esadiecadenico	0.43	1.24	0.121	<0.001
C16:3 ω 4	Acido esadecatrenoico	0.03	0.04	0.003	0.140
C16:4 ω 1	Acido esadecatetraenoico	0.04	0.04	0.006	0.400
C17:0	Acido margarico	0.84	0.85	0.060	0.850
C17:1 ω 7	Acido eptadecenoico	0.14	0.15	0.011	0.830
C18:0	Acido stearico	18.2	20.6	1.125	0.380
C18:1 ω 9	Acido oleico	9.15	10.9	0.508	0.059
C18:1 ω 7	Acido vaccenico	1.13	1.47	0.092	0.020
C18:2 ω 6	Acido linoleico	20.0	22.3	1.515	0.750
C18:3 ω 6	Acido γ -linolenico (GLA)	0.12	0.14	0.011	0.360
C18:3 ω 3	Acido α -linolenico (ALA)	0.97	1.01	0.081	0.910
C18:4 ω 3	Acido stearidonico (SDA)	0.01	0.01	0.002	0.710
C20:0	Acido arachidico	0.12	0.13	0.006	0.310
C20:1 ω 11	Acido gadoleico	0.06	0.08	0.006	0.083
C20:1 ω 9	Acido gondoico	0.04	0.05	0.004	0.021
C20:2 ω 6	Acido eicosadienoico	0.11	0.12	0.009	0.420
C20:3 ω 9	Acido di mead	0.26	0.27	0.030	0.850
C20:3 ω 6	Acido diomo- γ -linolenico (DGLA)	1.44	1.64	0.108	0.440
C20:4 ω 6	Acido arachidonico	2.41	2.62	0.162	0.620
C20:3 ω 3	Acido eicosatrienoico (ETE)	0.03	0.03	0.003	0.480
C20:4 ω 3	Acido eicosatetranoico (ETA)	0.09	0.11	0.008	0.190
C20:5 ω 3	Acido eicosapentanoico (EPA)	0.54	0.65	0.044	0.250
C22:0	Acido beenico	0.47	0.54	0.024	0.170
C22:1 ω 9	Acido erucico	0.01	0.01	0.001	0.510
C22:1 ω 7	Acido 15-Docosenoico	0.01	0.01	0.001	0.470
C22:2 ω 6	Acido docosadienoico	0.05	0.05	0.004	0.530
C22:4 ω 6	Acido adrenico(ADA)	0.29	0.33	0.027	0.660
C22:5 ω 3	Acido docosapentaenoico (DPA)	0.61	0.65	0.041	0.690
C22:6 ω 3	Acido docosaesaenoico (DHA)	0.09	0.23	0.034	0.003
C24:0	Acido lignocerico	0.50	0.55	0.038	0.560
C24:1 ω 9	Acido nervonico	0.26	0.44	0.035	<0.001
PLFA mg/dL	/	76.0	85.9	4.47	0.420
PL mg/dL	/	105.0	119.0	6.18	0.410

Il profilo degli FFA ha mostrato un aumento di 7 acidi grassi (C16:4 ω 1; C20:3 ω 3; C20:5 ω 3; C22:2 ω 6; C22:4 ω 6; C22:5 ω 3; e C24:1 ω 9) nel Gruppo K rispetto al Gruppo H, mentre 3 acidi grassi (C18:3 ω 6; C20:1 ω 9; e C22:1 ω 9) hanno mostrato una diminuzione nello stesso gruppo (Tabella 8.3). ($p < 0.05$)

Tabella 8.3 Medie di acidi grassi plasmatici \pm errore standard della media (SEM) del profilo degli acidi grassi liberi plasmatici (FFA) associati al Gruppo H (gruppo sano: BHB < 0.70 mmol/L) e Gruppo K (a rischio di iperchetonemia: BHB \geq 0.70 mmol/L).

FFA	Nomenclatura	Gruppo H (n=38)	Gruppo K (n=25)	SEM	p-value
C6:0	Acido caproico	0.03	0.03	0.002	0.450
C8:0	Acido caprilico	0.02	0.02	0.003	0.670
C10:0	Acido caprico	0.03	0.03	0.003	0.750
C12:0	Acido laurico	0.37	0.33	0.026	0.540
C14:0	Acido miristico	0.19	0.20	0.020	0.680
C14:1 ω 5	Acido miristelaidico	0.02	0.01	0.001	0.240
C15:0	Acido palmitico	0.06	0.07	0.005	0.690
C16:0	Acido ipogeico	1.37	1.42	0.097	0.920
C16:1 ω 9	Acido palmitoleico	0.02	0.02	0.002	0.300
C16:1 ω 7	Acido esadecadenoico	0.04	0.04	0.006	0.940
C16:2 ω 4	Acido esadecatrenoico	0.01	0.01	0.001	0.300
C16:3 ω 4	Acido esadecatetraenoico	0.004	0.003	0.001	0.540
C16:4 ω 1	Acido margarico	0.010	0.012	0.001	0.080
C17:1	Acido eptadecenoico	0.01	0.01	0.002	0.730
C18:0	Acido stearico	1.68	0.78	0.113	0.770
C18:1 ω 9	Acido oleico	0.76	0.82	0.117	0.910
C18:1 ω 7	Acido vaccenico	0.06	0.07	0.007	0.480
C18:2 ω 6	Acido linoleico	0.12	0.12	0.012	0.670
C18:3 ω 6	Acido γ -linolenico (GLA)	0.042	0.039	0.001	0.030
C18:3 ω 3	Acido α -linolenico (ALA)	0.01	0.01	0.001	0.280
C18:4 ω 3	Acido stearidonico (SDA)	0.004	0.004	0.001	0.840
C20:0	Acido arachidico	0.02	0.02	0.001	0.940
C20:1 ω 11	Acido gadoleico	0.004	0.005	0.001	0.190
C20:1 ω 9	Acido gondoico	0.006	0.004	0.001	0.016
C20:2 ω 6	Acido eicosadienoico	0.005	0.004	0.001	0.320
C20:3 ω 9	Acido di mead	0.003	0.003	0.001	0.630
C20:3 ω 6	Acido diomo- γ -linolenico (DGLA)	0.01	0.01	0.001	0.520
C20:4 ω 6	Acido arachidonico	0.01	0.01	0.001	0.670
C20:3 ω 3	Acido eicosatrienoico (ETE)	0.007	0.008	0.0001	0.095
C20:4 ω 3	Acido eicosatetraenoico (ETA)	0.004	0.003	0.001	0.220
C20:5 ω 3	Acido eicosapentanoico (EPA)	0.02	0.04	0.006	0.039
C22:0	Acido beenico	0.01	0.01	0.001	0.150
C22:1 ω 9	Acido erucico	0.004	0.002	0.001	0.088
C22:1 ω 7	Acido 15-Docosenoico	0.003	0.002	0.001	0.490
C22:2 ω 6	Acido docosadienoico	0.016	0.019	0.001	0.044
C22:4 ω 6	Acido adrenico(ADA)	0.02	0.03	0.003	0.018
C22:5 ω 3	Acido docosapentaenoico (DPA)	0.01	0.27	0.070	0.018
C22:6 ω 3	Acido docosaesaenoico (DHA)	0.02	0.06	0.053	0.590
C24:0	Acido lignocerico	0.02	0.03	0.006	0.120
C24:1 ω 9	Acido nervonico	0.02	0.04	0.005	0.001
FFA mg/dL	/	4.99	5.36	0.369	0.740

La classe lipidica dei TG ha riportato delle variazioni, 4 acidi grassi (C16:3 ω 4; C18:1 ω 7; C18:2 ω 6; e C24:1 ω 9) sono aumentati nel Gruppo K mentre 3 acidi grassi (C10:0; C12:0; e C20:3 ω 3) sono diminuiti nello stesso gruppo (Tabella 8.4). ($p < 0.05$)

Tabella 8.4 Medie di acidi grassi plasmatici \pm errore standard della media (SEM) del profilo dei trigliceridi plasmatici (TG) associati al Gruppo H (gruppo sano: BHB < 0.70 mmol/L) e Gruppo K (a rischio di iperchetonemia: BHB \geq 0.70 mmol/L).

TG	Nomenclatura	Gruppo H (n=38)	Gruppo K (n=25)	SEM	p-value
C6:0	Acido caproico	0.03	0.03	0.002	0.890
C8:0	Acido caprilico	0.04	0.05	0.006	0.320
C10:0	Acido caprico	0.07	0.05	0.006	0.036
C12:0	Acido laurico	0.76	0.54	0.063	0.025
C14:0	Acido miristico	0.26	0.19	0.040	0.240
C14:1 ω 5	Acido miristelaidico	0.02	0.03	0.001	0.380
C15:0	Acido palmitico	0.17	0.18	0.016	0.840
C16:0	Acido ipogeico	2.28	2.20	0.117	0.360
C16:1 ω 9	Acido palmitoleico	0.03	0.04	0.005	0.260
C16:1 ω 7	Acido esadecadenoico	0.04	0.04	0.004	1.000
C16:2 ω 4	Acido esadecatrenoico	0.04	0.04	0.004	0.120
C16:3 ω 4	Acido esadecatetraenoico	0.004	0.01	0.001	0.014
C16:4 ω 1	Acido margarico	0.01	0.02	0.001	0.450
C17:1 ω 7	Acido eptadecenoico	0.01	0.01	0.001	1.000
C18:0	Acido stearico	3.53	3.98	0.244	0.280
C18:1 ω 9	Acido oleico	0.46	0.53	0.053	0.470
C18:1 ω 7	Acido vaccenico	0.18	0.26	0.024	0.025
C18:2 ω 6	Acido linoleico	0.20	0.44	0.101	0.095
C18:3 ω 6	Acido γ -linolenico (GLA)	0.05	0.05	0.001	0.830
C18:3 ω 3	Acido α -linolenico (ALA)	0.01	0.01	0.001	0.450
C18:4 ω 3	Acido stearidonico (SDA)	0.01	0.01	0.001	0.120
C20:0	Acido arachidico	0.06	0.06	0.004	0.630
C20:1 ω 11	Acido gadoleico	0.01	0.12	0.002	0.150
C20:1 ω 9	Acido gondoico	0.01	0.01	0.001	0.101
C20:2 ω 6	Acido eicosadienoico	0.004	0.001	0.001	0.340
C20:3 ω 9	Acido di mead	0.004	0.005	0.001	0.260
C20:3 ω 6	Acido diomo- γ -linolenico (DGLA)	0.02	0.02	0.001	0.910
C20:4 ω 6	Acido arachidonico	0.01	0.01	0.002	0.220
C20:3 ω 3	Acido eicosatrienoico (ETE)	0.11	0.09	0.004	0.001
C20:4 ω 3	Acido eicosatetraenoico (ETA)	0.01	0.01	0.001	0.400
C20:5 ω 3	Acido eicosapentanoico (EPA)	0.02	0.03	0.005	0.580
C22:0	Acido beenico	0.03	0.04	0.002	0.130
C22:1 ω 9	Acido erucico	0.003	0.004	0.001	0.530
C22:1 ω 7	Acido 15-Docosenoico	0.004	0.004	0.001	0.410
C22:2 ω 6	Acido docosadienoico	0.01	0.01	0.001	0.560
C22:4 ω 6	Acido adrenico(ADA)	0.01	0.01	0.001	0.160
C22:5 ω 3	Acido docosapentaenoico (DPA)	0.01	0.01	0.001	0.930
C22:6 ω 3	Acido docosaesaenoico (DHA)	0.01	0.01	0.002	0.520
C24:0	Acido lignocericico	0.03	0.04	0.003	0.130
C24:1 ω 9	Acido nervonico	0.04	0.10	0.012	0.002
TGFA mg/dL	/	8.59	9.12	0.51	0.600
TG mg/dL	/	9.03	9.58	0.54	0.600

Infine, nella classe lipidica dei CE, 4 acidi grassi (C16:4 ω 1; C20:3 ω 3; C22:5 ω 3; C22:6 ω 3) sono aumentati nel Gruppo K rispetto al Gruppo H, mentre l'acido grasso C16:1 ω 7 è diminuito nello stesso gruppo (Tabella 8.5). ($p < 0.05$)

Tabella 8.5 Medie di acidi grassi plasmatici \pm errore standard della media (SEM) del profilo degli esteri del colesterolo plasmatici (CE) associati al Gruppo H (gruppo sano: BHB < 0.70 mmol/L) e Gruppo K (a rischio di iperchetonemia: BHB \geq 0.70 mmol/L).

CE	Nomenclatura	Gruppo H (n=38)	Gruppo K (n=25)	SEM	p-value
C6:0	Acido caproico	0.06	0.07	0.004	0.160
C8:0	Acido caprilico	0.08	0.06	0.021	0.630
C10:0	Acido caprico	0.14	0.12	0.012	0.400
C12:0	Acido laurico	0.73	0.65	0.075	0.610
C14:0	Acido miristico	0.61	0.57	0.077	0.480
C14:1 ω 5	Acido miristelaidico	0.11	0.12	0.006	0.990
C15:0	Acido palmitico	0.49	0.50	0.050	0.700
C16:0	Acido ipogeico	8.52	8.81	0.594	0.760
C16:1 ω 9	Acido palmitoleico	0.69	0.90	0.142	0.560
C16:1 ω 7	Acido esadecadenoico	1.41	1.11	0.109	0.012
C16:2 ω 4	Acido esadecatrienoico	0.17	0.18	0.020	0.810
C16:3 ω 4	Acido esadecatetraenoico	0.14	0.16	0.019	0.680
C16:4 ω 1	Acido margarico	0.09	0.12	0.010	0.024
C17:1 ω 7	Acido eptadecenoico	0.54	0.61	0.040	0.410
C18:0	Acido stearico	1.88	1.93	0.907	0.890
C18:1 ω 9	Acido oleico	18.1	19.8	0.161	0.470
C18:1 ω 7	Acido vaccenico	0.66	0.61	0.052	0.280
C18:2 ω 6	Acido linoleico	42.7	45.4	3.405	0.860
C18:3 ω 6	Acido γ -linolenico (GLA)	1.85	1.86	0.200	0.600
C18:3 ω 3	Acido α -linolenico (ALA)	1.72	1.85	0.118	0.980
C18:4 ω 3	Acido stearidonico (SDA)	0.04	0.04	0.004	0.340
C20:0	Acido arachidico	0.05	0.05	0.011	0.780
C20:1 ω 11	Acido gadoleico	0.10	0.10	0.012	0.780
C20:1 ω 9	Acido gondoico	0.04	0.05	0.005	0.420
C20:2 ω 6	Acido eicosadienoico	0.20	0.20	0.005	0.570
C20:3 ω 9	Acido di mead	0.07	0.07	0.007	0.970
C20:3 ω 6	Acido diomo- γ -linolenico (DGLA)	0.27	0.30	0.023	0.540
C20:4 ω 6	Acido arachidonico	0.94	0.98	0.065	0.960
C20:3 ω 3	Acido eicosatrienoico (ETE)	0.11	0.13	0.005	0.029
C20:4 ω 3	Acido eicosatetraenoico (ETA)	0.10	0.10	0.005	0.700
C20:5 ω 3	Acido eicosapentanoico (EPA)	0.49	0.51	0.026	0.940
C22:0	Acido beenico	0.210	0.22	0.015	0.700
C22:1 ω 9	Acido erucico	0.05	0.07	0.009	0.330
C22:1 ω 7	Acido 15-Docosenoico	0.04	0.04	0.009	0.460
C22:2 ω 6	Acido docosadienoico	0.04	0.03	0.015	0.160
C22:4 ω 6	Acido adrenico(ADA)	0.06	0.06	0.013	0.970
C22:5 ω 3	Acido docosapentaenoico (DPA)	0.14	0.68	0.134	0.010
C22:6 ω 3	Acido docosaesaenoico (DHA)	0.10	0.23	0.021	<0.001
C24:0	Acido lignoceric	0.70	0.60	0.082	0.150
C24:1 ω 9	Acido nervonico	0.16	0.16	0.016	0.640
CEFA mg/dL	/	84.4	89.7	5.25	0.950
CE mg/dL	/	197.0	210.0	12.25	0.940

Successivamente mediante l'utilizzo del Boruta Test sono stati confermati nuovamente alcuni dei dati significativi precedentemente selezionati ed il numero dei parametri è stato ridotto ulteriormente. Questo ha permesso quindi di selezionare 9 acidi grassi significativi visibili nel box plot della Figura 8.1 con la successiva analisi della curva ROC, metodo statistico utilizzato per stabilire il cut-off per ognuno degli acidi grassi predittivi per lo sviluppo di iperchetonemia.

Dei 9 acidi grassi, 3 appartenevano ai PL (C16:2 ω 4; C22:6 ω 3; C24:1 ω 9), 1 agli FFA (C24:1 ω 9), 3 ai TG (C12:0; C16:2 ω 4; C20:3 ω 3) e 2 ai CE (C16:1 ω 4; C22:6 ω 3).

In Figura 8.2 sono riportate le curve ROC degli acidi grassi predittivi. Il valore soglia (cut-off) stabilito per ogni acido grasso indica il quantitativo, superiore al quale, una bufala è considerata iperchetonemica.

Delle curve ROC identificate (Figura 8.2):

- ◆ solo 1 acido grasso è non significativo, TG C16:2 ω 4 (p-value= 0,063);
- ◆ 1 acido grasso è un buon marker ($0.8 < AUC < 0.9$), PL C16:2 ω 4 (AUC: 0.80, Intervallo di Confidenza (CI): da 0.68 a 0,89, cut-off > 0,526, Se: 96%, Sp: 52,6%; p-value < 0,001);
- ◆ 6 acidi grassi sono marker moderati ($0.7 < AUC < 0.8$):
 - FFA C24:1 ω 9 (AUC: 0,76, CI: da 0,64 a 0,86, cut-off > 0,021, Se: 76%, Sp:79%; p-value<0,001);
 - TG C20:3 ω 3 (AUC: 0,76, CI: da 0,63 a 0,86, cut-off \leq 0,102, Se: 80%, Sp: 68,4%; p-value<0.001);
 - PL C24:1 ω 9 (AUC: 0,74, CI: da 0,61 a 0,84, cut-off \geq 0,374, Se: 72%, Sp: 68,4%; valore p<0,001);
 - TG C12:0 (AUC: 0,74, CI: da 0,61 a 0,84, cut-off \leq 0,522, Se: 56%, Sp: 86,8%; p-valore<0,001);
 - CE C22:6 ω 3 (AUC: 0,70, CI: da 0,58 a 0,81, cut-off > 0,159, Se: 60%, Sp: 84,2%; valore p=0,007);
 - PL C22:6 ω 3 (AUC: 0,70, CI: da 0,57 a 0,81, cut-off > 0,106, Se: 64%, Sp: 81,6%; valore p=0,008);
- ◆ 1 acido grasso è marker scarso ($0.6 < AUC < 0.7$): CE C16:4 ω 1 (AUC: 0,68, CI: da 0,55 a 0,79, cut-off > 0,095, Se: 64%, Sp: 79%; valore p=0,023).

Figura 8.1 Box plot del Boruta Test. I box plot verdi rappresentano gli acidi grassi predittivi selezionati dal Boruta Test. I box plot blu rappresentano gli acidi grassi dalla dubbia funzione predittiva, mentre i box plot rossi rappresentano gli acidi grassi con funzione predittiva nulla. Con nomenclatura dei principali acidi grassi predittivi.

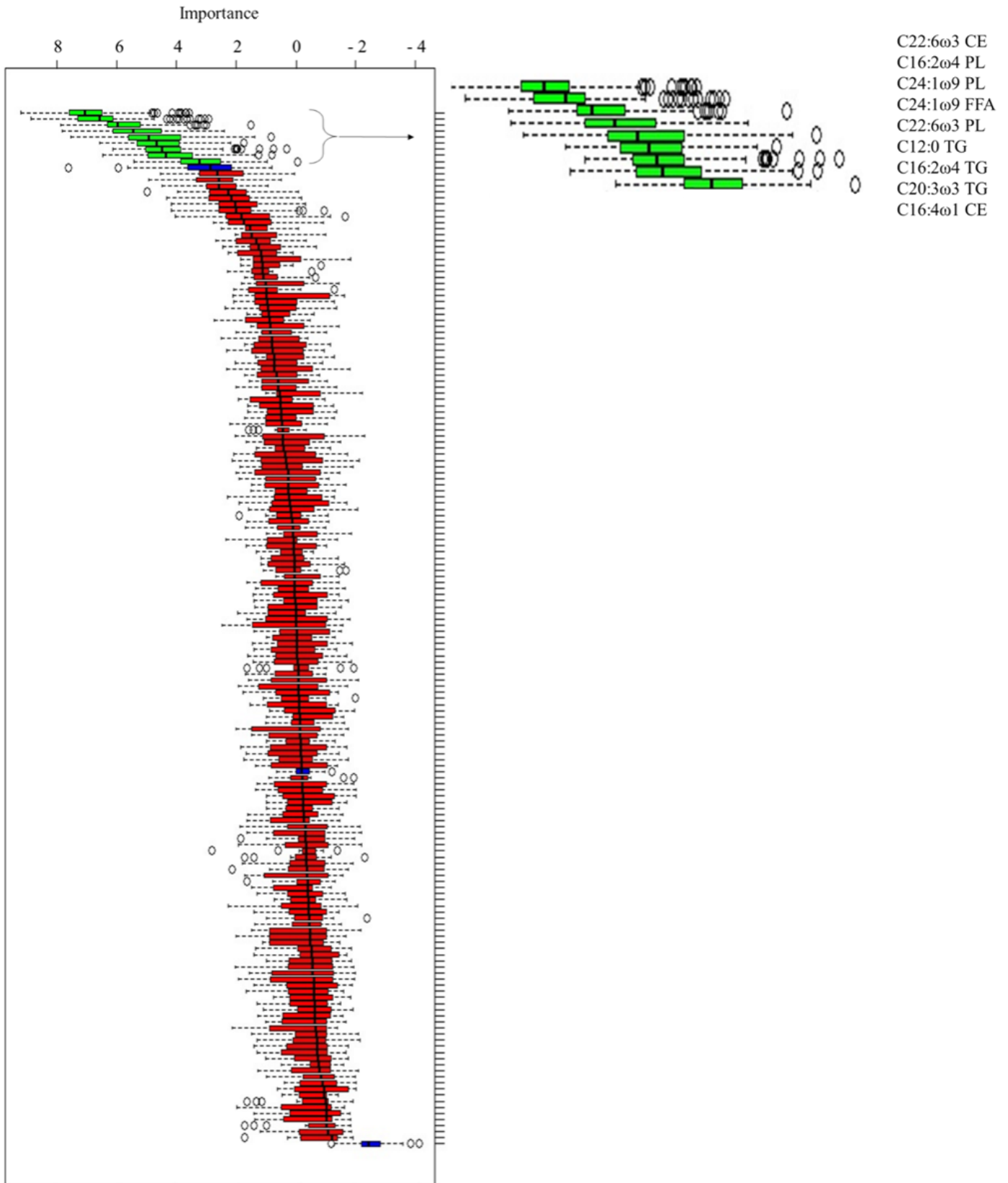
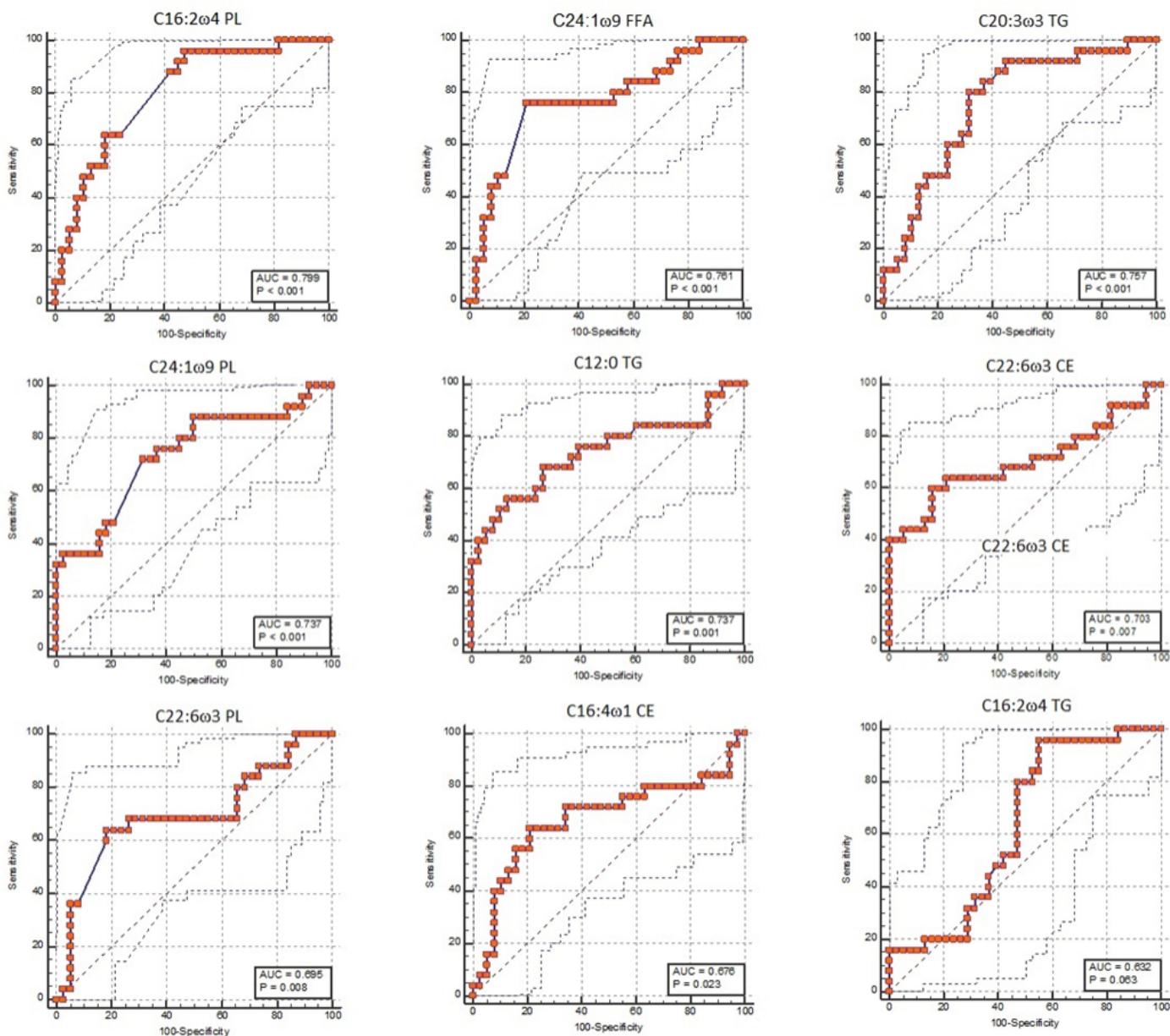


Figura 8.2 Curva ROC (Receiver Operating Characteristic) degli acidi grassi predittivi elencati con funzione predittiva decrescente (Area Under the Curve (AUC)) ottenuta dal Boruta Test.



9. DISCUSSIONE

L'inizio della lattazione induce maggiori richieste metaboliche durante il periodo di transizione con una conseguente lipomobilizzazione.

La mobilizzazione dei lipidi dal tessuto adiposo comporta il rilascio di acidi grassi nel flusso sanguigno. Tuttavia, questa condizione non riguarda solo le concentrazioni relative ai lipidi plasmatici totali ma anche un cambiamento nella composizione degli acidi grassi delle frazioni corrispondenti (PL, FFA, TG, CE).

Questo cambiamento è in parte dovuto alle differenze nelle distribuzioni degli acidi grassi tra le classi lipidiche. Questi cambiamenti nei lipidi nel sangue influenzano la ridistribuzione dell'energia, il metabolismo cellulare e la funzione (Contreras G. A. et al., 2010; Contreras G. A. and Sordillo L. M., 2011).

Lo scopo del presente studio era di valutare le frazioni lipidiche all'inizio della lattazione per indagare sui cambiamenti metabolici associati a diversi livelli di deficit energetico.

L'analisi biochimica ha identificato una differenza nella concentrazione di aspartato transaminasi (AST).

L'AST viene misurato negli esami del sangue per rilevare danni ai tessuti in cui è abbondante (fegato, cuore, muscolo scheletrico, reni, cervello). Quando uno dei tessuti che si servono di AST viene danneggiato infatti, le cellule diventano necrotiche e rilasciano in circolo tutti gli enzimi in esse contenute, tra cui AST stessa, che quindi aumenta in circolo. La sua concentrazione plasmatica dipende evidentemente dall'estensione del danno tissutale. Il test sui livelli di AST è svolto solitamente insieme con quello per i valori di alanina transaminasi (ALT).

I valori di circa 122 U/L sono stati associati alla lipidosi epatica nelle bufale chetotiche (Russell K. E. and Roussel A. J., 2007; Youssef M. A. et al., 2010).

In questo studio, entrambi i gruppi avevano livelli leggermente più alti (140 U/L per il Gruppo H e 164 U/L per il Gruppo K) che potrebbe suggerire la presenza di danni epatici.

Ogni classe lipidica ha diverse funzioni metaboliche.

I fosfolipidi (PL) sono i componenti principali delle membrane biologiche (Contreras G. A. et al., 2010). I principali acidi grassi di questa classe lipidica, nelle vacche da latte, sono linoleico (C18:2 ω 6), stearico (C18:0), palmitico (C16:0) e oleico (C18:1 ω 9) (Tyburczy C. et al., 2008). Questo è confermato anche nel presente studio sulle classi lipidiche plasmatiche nel bufalo, nei due gruppi H e K, questi 4 acidi grassi erano l'83% dei PLFA. Sebbene non vi fosse alcuna differenza tra PL o le concentrazioni di PLFA, c'era una differenza nel loro profilo.

Le modifiche identificate riguardano un incremento della concentrazione di acido caprilico (C8:0), esadecadienoico (C16:2 ω 4), acido oleico (C18:1 ω 9), oleico, vaccenico (C18:1 ω 7), gadoleico (C20:1 ω 11), gondoico (C20:1 ω 9), docosaesaenoico (DHA; C22:6 ω 3) e nervonico (C24:1 ω 9) nel Gruppo K rispetto al Gruppo H. ($p < 0.05$).

Anche se è aumentato solo un acido grasso saturo (C8:0), può influire negativamente sulla fluidità di membrana e di conseguenza sulla funzione cellulare (Lacetera N. et al., 2002). In quanto, la fluidità della membrana dipende dal tipo di acidi grassi di cui è composta. Membrane i cui fosfolipidi hanno acidi grassi saturi sono più rigide rispetto a membrane con acidi grassi insaturi.

Inoltre, i cambiamenti nel profilo ω -3 della membrana, come il DHA, può influenzare la risposta immunitaria dei leucociti. In particolare, una diminuzione della concentrazione di ω -3 associata ad una maggiore concentrazione di acido palmitico (C16:0) può migliorare l'attivazione leucocitaria (sono cellule del sistema immunitario con funzione di difesa dell'organismo da microrganismi patogeni o corpi estranei che penetrano attraverso la cute o le mucose) (Contreras G. A. and Sordillo L. M., 2011). Tuttavia, l'acido palmitico non è risultato modificato e il DHA è aumentato suggerendo l'assenza di attivazione leucocitaria.

Ad ogni modo, questo studio ha utilizzato una progettazione sperimentale trasversale e quindi non è possibile conoscere con esattezza lo stato precedente degli animali.

Il contenuto di MUFA nei PL dipende fortemente dall'espressione genica degli enzimi che metabolizzano i lipidi come stearoil-desaturasi 1 (SCD1) (Weiss-Hersh K. et al., 2020). L'espressione di questo gene è stata trovata aumentata nel fegato di vacche chetotiche rispetto agli animali subclinici o di controllo e rilevante per la lipidosi epatica (Zhu Y. et al., 2019). Considerando l'incremento di MUFA nella classe dei PL e che il Gruppo K non era in chetosi, questi risultati suggeriscono che sono necessarie ulteriori indagini sulle condizioni metaboliche nelle bufale perché la manifestazione della chetosi in questa specie può differire dalle vacche.

Gli FFA sono principalmente trasportati nel flusso sanguigno legati all'albumina e solo una piccola quantità non sono vincolati. Questi acidi grassi sono solitamente utilizzati per un'ossidazione completa da parte di una varietà di tessuti (Contreras G. A. et al., 2010).

L'ossidazione completa degli FFA è un processo che avviene all'interno delle cellule e serve a produrre energia sotto forma di ATP (Drackley J. K., 1999). Questo processo avviene in 3 fasi: la β -ossidazione, il ciclo di Krebs e la fosforilazione ossidativa. La β -ossidazione consiste nel separare dall'acido grasso due atomi di carbonio alla volta producendo acetil-CoA. L'acetilCoA prodotto con la β -ossidazione può entrare nel ciclo di Krebs dove si lega all'ossalacetato, portando alla produzione di ATP. Infine, la fosforilazione ossidativa è la fase che produce la maggior parte dell' ATP.

Dalle analisi si è riscontrato che 10 FFA erano diversi tra i gruppi: acido γ -linolenico (GLA; C18:3 ω 6), gondoico (C20:1 ω 9) e gli acidi erucici (C22:1 ω 9) sono diminuiti nel Gruppo K; mentre l' acido margarico (C16:4 ω 1), eicosatrienoico (ETE; C20:3 ω 3), eicosapentanoico (EPA; C20:5 ω 3), docosadienoico (C22:2 ω 6), adrenico (ADA; C22:4 ω 6), docosapentaenoico (DPA; C22:5 ω 3) e nervonico (C24:1 ω 9) sono aumentati nello stesso gruppo.

Degli acidi grassi aumentati, 3 (ETE, EPA e DPA) erano metabolicamente correlati tra loro e possono essere mobilitati durante l'infiammazione a causa dei loro mediatori antinfiammatori o pro-risolventi (cioè mediatori endogeni che agiscono come segnali di stop per terminare una reazione infiammatoria quando non è più necessaria per promuovere il ritorno a uno stato di tessuto normale)(Lisuzzo A. et al., 2022; Bernal-Santos G. et al., 2010).

Ancora in relazione con la risposta infiammatoria, c'erano acidi grassi ω -6, come acido docosadienoico, ADA e GLA. È possibile utilizzare gli acidi grassi ω -6 per la produzione di mediatori pro-risolventi e antinfiammatori (Contreras G. A. and Sordillo L. M., 2011). In particolare, acido docosadienoico (C22:2 ω 6) ha mostrato una relazione positiva con gli stati infiammatori e di stress ossidativo nei cavalli (Siard-Altman M. H. et al., 2020). Al contrario, GLA e ADA possono essere utilizzati per sintetizzare l'acido arachidonico (C20:4 ω 6) (mediante elongasi e desaturasi o mediante β -ossidazione (Singh N. et al., 2021; Wang X. et al., 2012)), che contribuisce al rafforzamento del tono muscolare, alla riparazione delle zone danneggiate di tessuto e svolge un importante ruolo nella risposta antinfiammatoria.

L'aumento del livello di acido docosadienoico potrebbe suggerire uno stato infiammatorio così come un ridotto livello di GLA può essere legato a una sintesi o al mantenimento dell'acido arachidonico la cui concentrazione non ha mostrato differenze significative tra i gruppi (Gruppo H: 0.01 e Gruppo K: 0.01). Tuttavia, il livello di ADA ha mostrato un aumento nel Gruppo K.

Inoltre, i cambiamenti nelle concentrazioni di MUFA, come gli acidi nervonico, gondoico ed erucico, possono anche essere correlati a cambiamenti nell'espressione genica degli enzimi che metabolizzano i lipidi come stearoil-desaturasi 1 (SCD1) così come nella classe PL.

L'espressione di questo gene è stata trovata aumentata nel fegato di vacche chetotiche rispetto agli animali subclinici o di controllo e rilevante per la lipidosi epatica (Zhu Y. et al., 2019).

Questi risultati suggeriscono un'influenza degli FFA disponibili per l'ossidazione immediata potenzialmente correlata a stati infiammatori, ma ulteriori studi sono necessari per approfondire questi aspetti nel bufalo.

I trigliceridi (TG) rappresentano il principale sito di stoccaggio degli acidi grassi a lunga catena nei tessuti adiposi o mammari, o nel sangue come lipoproteine a bassa densità (VLDL), che rappresentano il loro principale vettore nel flusso sanguigno (Fiore E. et al., 2020; Kaneko J. J. et al., 2008).

Le concentrazioni di TG nelle VLDL e nel fegato sono correlate tra loro nelle vacche da latte (Peter A. et al., 2009). Infatti, i depositi del tessuto adiposo vengono mobilitati con l'inizio della lattazione per supportare un aumento di energia richiesta e limitare il bilancio energetico negativo.

L'afflusso di acidi grassi al fegato induce un aumento della sintesi di TG che sono normalmente esportati dal fegato come parte delle VLDL. Tuttavia, se la sintesi di TG supera la capacità di esportazione epatica, si accumuleranno negli epatociti causando fegato grasso (Kaneko J. J. et al., 2008; Zhang G. and Ametaj B. N., 2020; Oikawa S. et al., 2010). Questa frazione lipidica di solito

mostra un aumento dell'acido palmitico (C15:0), oleico (C18:1 ω 9) e linoleico (C18:2 ω 6) durante la lipomobilizzazione (McFadden J. W., 2020; Douglas G. N. et al., 2007).

Nel nostro studio non sono stati evidenziati cambiamenti significativi negli acidi palmitico (Gruppo H: 0.17, Gruppo K: 0.18; p-value: 0.840) o oleico (Gruppo H: 0.46, Gruppo K: 0.53; p-value: 0.470).

Invece un aumento della concentrazione di acido linoleico (C18:2 ω 6) (Gruppo H: 0.20, Gruppo K: 0.44; p-value: 0.095) è stato evidenziato nel Gruppo K.

Per quanto riguarda il livello di PUFA, era presente una differenza per acido esadecatetraenoico (C16:3 ω 4) ed ETE (C20:3 ω 3) la cui concentrazione è, rispettivamente, aumentata (Gruppo H: 0.004, Gruppo K: 0.01; p-value: 0.014) e ridotta (Gruppo H: 0.11, Gruppo K: 0.09; p-value: 0.001) nel Gruppo K.

La diminuzione del livello di ETE può essere dovuta alla sua mobilizzazione come FFA e all'uso per modulare la risposta infiammatoria come accennato in precedenza.

Lo studio di Peter et al. (2009) sugli esseri umani hanno riferito che la frazione di TG delle VLDL è correlata all'espressione genica degli enzimi che metabolizzano i lipidi come stearoil-desaturasi 1 (SCD1) nel fegato.

Nel nostro studio, erano presenti un aumento del livello di vaccenico (C18:1 ω 7) (Gruppo H: 0.18, Gruppo K: 0.26; p-value: 0.025) e di acido nervonico (C24:1 ω 9) (Gruppo H: 0.04, Gruppo K: 0.10; p-value: 0.002) nel Gruppo K.

Comunque, dovrebbero essere eseguiti ulteriori studi concentrati sui ruminanti, in particolare bufale, per valutare meglio questa relazione.

L'attività dell'enzima lecitina-colesterolo aciltransferasi (LCAT) (responsabile della sintesi degli esteri del colesterolo nel plasma) e la concentrazione di CE mostrano comunemente un basso livello durante l'inizio della lattazione, con la presenza di un bilancio energetico negativo, poiché LCAT diminuisce la sua funzionalità in postparto, portando in tal modo al decremento dei CE plasmatici (Van den Top M. et al., 2005).

Tuttavia, questi livelli tendono ad aumentare progressivamente verso la metà della lattazione a causa dell'adattamento metabolico degli animali (Tessari R. et al., 2020; Gross J. J. et al., 2015).

Nel nostro studio non è stata identificata alcuna differenza nel livello di CE tra i gruppi. In ogni caso, era presente un profilo diverso, particolarmente legato all'aumento del livello di acidi grassi ω -3: acido eicosatrienoico (C20:3 ω 3), acido docosapentaenoico (C22:5 ω 3) e acido docosaesaenoico (C22:6 ω 3).

I CE si trovano generalmente nelle membrane e nelle lipoproteine. In quest'ultimo caso, la loro funzione insieme ai TG è il trasporto dei lipidi tra i tessuti (Kaneko J. J. et al., 2008). In questa classe lipidica, la concentrazione di acidi grassi ω -3 dovrebbe diminuire nella prima settimana di lattazione a causa della risposta infiammatoria (Contreras G. A. and Sordillo L. M., 2011).

Considerando che nel nostro studio gli animali sono all'inizio della lattazione, i livelli aumentati di acidi grassi ω -3 nel Gruppo K potrebbe indicare un progressivo ripristino delle riserve lipidiche corporee o il loro utilizzo non è ancora avvenuto considerando che erano ancora prontamente disponibili gli FFA. Inoltre, l'aumento dei livelli degli acidi grassi ω -3 negli FFA circolanti potrebbe anche aver influenzato il profilo dei CE sintetizzati nel fegato.

Grazie al Boruta Test, sono stati selezionati, tra gli acidi grassi significativi in ciascuna classe lipidica, alcuni FA per la loro funzione predittiva confermata in 8 FA su 9 dall'analisi ROC, definendo come non significativo il trigliceride (TG) C16:2 ω 4 (p-value= 0,063).

Oltre alla classe lipidica di appartenenza abbiamo esaminato la differente composizione chimica delle molecole degli acidi grassi. Dallo studio di ricerca, infatti, si evidenzia che i principali acidi grassi, utilizzati a scopo diagnostico nel plasma di bufale in post parto, appartengono alla classe degli FA saturi, MUFA, PUFA e PUFA omega 3. In particolare, sono presenti 1 FA saturo (TG C12:0), 2 MUFA (FFA C24:1 ω 9, PL C24:1 ω 9) e 5 PUFA di cui 3 di ω -3 (PL C16:2 ω 4, TG C20:3 ω 3, CE C22:6 ω 3, PL C22:6 ω 3, CE C16:4 ω 1).

Successivamente per stabilire il valore soglia degli 8 acidi grassi predittivi, estrapolati mediante il Boruta test, è stata applicata la curva ROC.

Il quantitativo plasmatico (mg/dl), superiore al quale, le bufale erano considerate malate/ipercetonemiche, può essere considerato predittivo solamente se l'area sotto la curva presenta un valore superiore al 70%. Per tale ragione 1 dei valori selezionati dal Boruta test è ritenuto poco accurato dalla curva ROC (CE C16:4 ω 1, AUC: 0,68), mentre 7 sono gli acidi grassi significativi (PL C16:2 ω 4, FFA C24:1 ω 9, TG C20:3 ω 3, PL C24:1 ω 9, TG C12:0, CE C22:6 ω 3, PL C22:6 ω 3), aventi AUC superiore al 70%, la cui ROC indica un valore soglia con potere diagnostico buono/moderato.

Questi acidi grassi, hanno mostrato un significato biologico maggiore nel discriminare secondo il livello di BHB e quindi andrebbero maggiormente valutati nelle loro specifiche funzioni fisiopatologiche. In particolare, l'acido esadecatrienoico (C16:2 ω 4 PL) sembra mostrare un ruolo promettente nelle bufale. La sua funzione biologica è stata studiata a fondo nei medicinali umani che gli ha conferito proprietà antinfiammatorie (Aparna V. et al., 2012).

In effetti, è stato dimostrato che l'acido esadecatrienoico può agire come agente antinfiammatorio competendo con la fosfolipasi A2 e di conseguenza inibendone l'attività (Aparna V. et al., 2012).

L'enzima fosfolipasi A2 riconosce il legame sn-2 dei fosfolipidi di membrana e ne induce la catalisi idrolitica rilasciando acidi grassi, come l'acido arachidonico e lisofosfolipidi: i precursori principali di sostanze coinvolte nella risposta infiammatoria dell'organismo (Aparna V. et al., 2012).

Infatti, in presenza di un danno tissutale, enzimi appartenenti alla classe delle fosfolipasi A2 liberano l'acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana (ove è stato esterificato).

I nostri risultati hanno mostrato una maggiore concentrazione di acido esadecatrienoico nelle bufale a rischio di chetosi (Gruppo K) che consente agli autori di ipotizzare un ruolo attivo nella risposta anti-infiammatoria e nel potenziale sviluppo di distress e malattie legate ad uno stato di deficit energetico. Questa è una scoperta interessante e il suo ruolo nelle bufale dovrebbe essere studiato ulteriore attraverso studi con lo scopo di valutarne l'attendibilità come marcatore predittivo di stato metabolico alterato e malattie correlate.

CONCLUSIONI

Lo studio di ricerca ha permesso di evidenziare i cambiamenti tra i profili degli acidi grassi delle classi lipidiche, tra Gruppo H e Gruppo K, che suggeriscono possibili relazioni con il metabolismo lipidico e l'infiammazione.

I cambiamenti nei profili plasmatici degli acidi grassi delle principali classi lipidiche (PL, FFA, TG, CE) possono aiutare a studiare ulteriormente le alterazioni metaboliche e gli adattamenti degli animali durante la prima lattazione.

Inoltre, possibili somiglianze di bufale a rischio di iperchetonemia con vacche chetotiche suggeriscono che sono necessarie ulteriori indagini sulla chetosi nelle bufale, perché la manifestazione sembra differire tra le due specie.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S., 2012. Immunologia cellulare e molecolare, 7^a edizione, elsevier.
2. Abdel-Raheem S., Schreiner M., Iben C., 2010. Lactational and Seasonal Variations in Plasma Fatty Acids Profiles in Dairy Cows. Wiener Tierärztliche Monatsschrift 97:149–156.
3. Abeles R. H., Frej P. A., Jencks W. P., 1994. Biochimica, traduzione italiana, ed. Piccin, Padova.
4. Alarcon P., Manosalva C., Carretta M. D., Hidalgo A. I., Figueroa C. D., Taubert A., Hermosilla C., Hidalgo M. A., Burgos R. A., 2018. Fatty and hydroxycarboxylic acid receptors: The missing link of immune response and metabolism in cattle. Vet. Immunol. Immunopathol (201): 77–87.
5. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., 2014. Molecular biology of the cell (4th ed). Garland Science. Cap 91(3): 401.
6. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., 2015. Molecular biology of the cell (6th ed.). Garland Science. Cap 14.2.
7. Allen M. S., Bradford B. J., Oba M., 2009. La teoria dell'ossidazione epatica del controllo dell'assunzione di mangime e la sua applicazione ai ruminanti. Journal Of Animal Science (87): 3317 – 3334.
8. Aparna V., Dileep K. V., Mandal P. K., Karthe P., Sadasivan C., Haridas M., 2012. Anti-Inflammatory Property of n-Hexadecanoic Acid: Structural Evidence and Kinetic Assessment. Chemical Biology & Drug Design (80): 434–439.
9. Bartocci S., Amici A., Verna M., Terramocchia S., Martillotti F., 1997. Solid and fluid passage rate in buffalo, cattle and sheep feds diets with different forage to concentrate ratios. Livestock Production Science (52): 201-208.
10. Baticz O, Tömösközi S, Vida L., 2002. Concentrations of citrate and ketone bodies in cow's raw milk. Periodica Polytechnica Chemical Engineering 46(1-2): 93–104.
11. Baumann D. E. and Currie W. B., 1980. Partizionamento dei nutrienti durante la gravidanza e l'allattamento: una revisione dei meccanismi che coinvolgono l'omeostasi e l'omeoresi. Journal of Caseificio Science (63): 1514 – 1529.
12. Baumann D. E., Perfield II J. W., de Veth M. J., Lock A. L., 2003. New Perspectives on Lipid Digestion and Metabolism in Ruminants. Proceedings of the Cornell Nutrition Conference, pp. 175–189.
13. Bell A. W., 1995. Regolazione del metabolismo dei nutrienti organici durante la transizione dalla tarda gravidanza all'inizio dell'allattamento. Journal Of Animal Science (73): 2804 – 2819.
14. Bernal-Santos G., O'Donnell A. M., Vicini J. L., Hartnell G. F., Bauman D. E., 2010. Hot topic: Enhancing omega-3 fatty acids in milk fat of dairy cows by using stearidonic acid-enriched soybean oil from genetically modified soybeans. Journal Of Dairy Science (93): 32–37.

15. Bittante G., Andrighetto I., Ramanzin M., 1999. Fondamenti di zootecnica. Liviana Editrice.
16. Bittante G., Andrighetto I., Ramanzin M., 1990. Tecniche di produzione animale, cap 3 pp. 169-185, 212-245.
17. Campanile G., Di Palo R., Esposito L. Boni R. and Di Meo C., 1995. Variazioni di alcune costanti ematochimiche di bufale in lattazione. pp 77-78.
18. Campanile G., Di Palo R., De Filippo C., Zicarelli L., 1997a. Tempi di ingestione e di ruminazione nella bufala in funzione della distanza dal parto. pp. 569-570.
19. Campanile G., Di Palo R., De Filippo C., Zicarelli L., 1997b. Dietary characteristics and feeding behaviour in buffalo cow. pp 367-371.
20. Chilliard Y., 1993. Dietary Fat and Adipose Tissue Metabolism in Ruminants, Pigs, and Rodents: A Review. *Journal of Dairy Science*, 76(12): 3897–3931.
21. Christie W. W., 1981. Lipid metabolism in ruminant animals, 1st edition, Oxford, England, Pergamon Press Ltd, pp (1): 1-51- pp (2): 57-87.
22. Constable P.D., Hinchcliff K.P., Done S.H., Grünberg W., 2017. *Veterinary Medicine, a Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats*, 11(2): 1662-1757.
23. Falchi L., Gaspa G., Cesarani A., Correddu F., Degano L., Vicario D., Lourenco D., Macciotta N. P. P., 2021. Investigation of β -hydroxybutyrate in early lactation of Simmental cows: Genetic parameters and genomic predictions. *Journal of Animal Breeding and Genetics* (00): 1–1.
24. Contreras G. A. and Sordillo L. M., 2011. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* (34): 281–289.
25. Contreras G. A., O'Boyle N. J., Herdt T. H., Sordillo L. M., 2010. Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids. *Journal of Dairy Science* (93): 2508–2516.
26. De Koster J. D. and Opsomer G., 2013. Resistenza all'insulina nelle vacche da latte (29): 299 – 322.
27. Demeyer D., Doreau M., 1999. Targets and Procedures for Altering Ruminant Meat and Milk Lipids. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58(3): 593–607.
28. DePeters E.J., George L.W., 2014. Rumen transfaunation, *Immunology Letters* (162): 69-76.
29. De Rosa G., Napolitano F., Grasso F., Pacelli C., Bordi A., 2005. On the development of a monitoring scheme of buffalo welfare at farm level. *Ital. Journal Of Animal Science* (4): 115–125.
30. De Rosa G., Grasso F., Winckler C., Bilancione A., Pacelli C., Masucci F., Napolitano F., 2015. Application of the Welfare Quality protocol to dairy buffalo farms: Prevalence and reliability of selected measures. *Journal Of Animal Science* (98): 6886–6896.

31. Di Lella T., Infascelli F., Cutrignelli M. I., 1995. Rumen degradability and proteic value of feed utilized by buffaloes. *Bubalus bubalis* (1): 38-48.
32. Doepel L., Lapiere H., Kennelly J. J., 2002. Peripartum Performance and Metabolism of Dairy Cows in Response to Prepartum Energy and Protein Intake. *Journal of Dairy Science* 85(9): 2315–2334.
33. Doreau M., Chilliard Y., 1997. Digestion and Metabolism of Dietary Fat in Farm Animals. *The British journal of nutrition* (78): 15–35.
34. Douglas G. N., Rehage J., Beaulieu A. D., Bahaa A. O., Drackley J. K., 2007. Prepartum Nutrition Alters Fatty Acid Composition in Plasma, Adipose Tissue, and Liver Lipids of Periparturient Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 90(6): 2941–2959.
35. Drackley J. K., 1999. Biologia delle vacche da latte durante il periodo di transizione: l'ultima frontiera. *Journal of Caseificio Science* (82): 2259 – 2273.
36. Edmonson A., Lean I. J., Weaver L. D., Farver T., Webster G., 1989. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 72(1): 68–78.
37. Fantini A., 2016. Patologie della vacca da latte – chetosi metabolica. *Dairy Production Medicine Specialist*, Anguillara Sabazia (RM).
38. Fiore E., Lisuzzo A., Laghi L. Harvatine K. J., Mazzotta E., Alterisio M.C., Ciaramella P., Zhu C., B. Contiero, V. Faillace, J. Guccione., 2023. Serum metabolomics assessment of etiological processes predisposing ketosis in water buffalo during early lactation. *Journal of Dairy Science* (106): 3465-3476.
39. Fiore E., Tessari R., Morgante M., Gianesella M., Badon T., Bedin S., Mazzotta E., Berlanda M., 2020. Identification of plasma fatty acids in four lipid classes to understand energy metabolism at different levels of ketonemia in dairy cows using thin layer chromatography and gas chromatographic techniques (TLC-GC). *Animals Basel* 10(4): 571.
40. Fiore E., Giambelluca S., Morgante M., Contiero B., Mazzotta E., Vecchio D., Vazzana I., Rossi P., Arfuso F., Piccione G., Gianesella M., 2017. Changes in some blood parameters, milk composition and yield of buffaloes (*Bubalus bubalis*) during the transition period. *Journal Of Animal Science* (88): 2025–2032.
41. Fiore E., Gianesella M., Arfuso F., Giudice E., Piccione G., Lora M., Stefani A., Morgante M., 2014. Glucose infusion response on some metabolic parameters in dairy cows during transition period. *Archives Animal Breeding* (57): 3.
42. Formigoni A., Brogna N., Palmonari A., Pancioli N., Fustini M., 2010. Alimentazione delle bovine, produzione e composizione del grasso del latte. *Progress in nutrition* (12): 172-182.
43. Freeman C. P., 1984. The digestion, absorption and transport of fats- non-ruminants. *Fats in Animal Nutrition*. pp 105-121.
44. Friedman H., 1982. Simplified determinations of statistical power, magnitude of effect and research sample sizes. *Educational Psychological Measurement* (42): 521–526.
45. Giammanco A., Cefalù A. B., Noto D., Averna M. R., 2015. Fisiopatologia della sintesi delle lipoproteine intestinali. *Giornale italiano dell'arteriosclerosi* 6(2): 6–22.

46. Giuliadori M. J., Magnasco R. P., Becu-Villalobos D., Lacau-Mengido I. M., Risco C. A., De la Sota R. L., 2013. Metritis in dairy cows: Risk factors and reproductive performance. *Journal of Dairy Science* (96): 3621-3631.
47. Grant R. J., Albright J. L., Feeding behavior and management factors during the transition period in dairy cattle. *Journal of Animal Science* (73): 2791–2803.
48. Grommer R. R., 1993. Etiologia dei disordini metabolici correlati ai lipidi nelle vacche da latte peripartum. *Journal of Caseificio Science* (76): 3882 – 3896.
49. Gross J. J., Kessler E. C., Albrecht C., Bruckmaier R. M., 2015. Response of the cholesterol metabolism to a negative energy balance in dairy cows depends on the lactational stage. *PLoS One* (10): 1–17.
50. Grundy S. M., Cleeman J. I., Daniels S. R., Donato K. A., Eckel R. H., Franklin B. A., Costa F., 2005. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 112(17): 2735-2752.
51. Guccione J., Carcasole C., Alsaad M., D'Andrea L., Di Loria A., De Rosa A., Ciaramella P., Steiner A., 2016. Assessment of foot health and animal welfare: Clinical findings in 229 dairy Mediterranean Buffaloes (*Bubalus bubalis*) affected by foot disorders. *BMC Veterinary Research* (12) 1–9.
52. Guliński P., 2021. Ketone bodies - causes and effects of their increased presence in cows' body fluids: A review. *Veterinary world* 14(6): 1492–1503.
53. Herdt T.H., 2000. Ruminant Adaptation to Negative Energy Balance. Influences on the Etiology of Ketosis and Fatty Liver. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 16(2): 215–230.
54. Heuer C., Schukken Y.H., Dobbelaar P., 1999. Post- partum body condition score and results from the first test day milk as predictors of disease, fertility, yield, and culling in commercial dairy herds. *Journal of Dairy Science* (82): 295-304.
55. Horst E. A., Kvidera S. K., Baumgard, L. H., 2021. Invited review: The influence of immune activation on transition cow health and performance - A critical evaluation of traditional dogmas. *Journal of Dairy Science* (104): 8380–8410.
56. Iwerson M., Falkenberg U., Voigtsberger R., Forderung D., Heuwer W., 2009. Evaluation of an electronic cowside test to detect subclinical ketosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 92(6): 2618–2624.
57. Jenkins T. C., Wallace R. J., Moate P. J., Mosley E. E., 2008. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of Animal Science* (86): 397-412.
58. Kaneko J. J., Hervey J. W., Bruss M. L., 2008. *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic Press (493): 889-895.
59. Kemp P., Lander D.J., 1983. The Hydrogenation of Gamma-Linolenic Acid by Pure Cultures of Two Rumen Bacteria. *Biochemical Journal* 216(2): 519–522.

60. Kemura K., Goff J. P., Kehrli Jr. M. E., Reinhardt T. A., 2002. Diminuzione della funzione dei neutrofili come causa della ritenzione di placenta nei bovini da latte. *Journal of Caseificio Science* (85): 544-550.
61. Koch L. E., Lascano G. J., 2018. Milk Fat Depression: Etiology, Theories, and Soluble Carbohydrate. *Journal of Animal Research and Nutrition* 3(2): 1-21.
62. Lacetera N., Franci O., Scalia D., Bernabucci U., Ronchi B., Nardone A., 2002. Effects on functions of ovine blood mononuclear cells for each of several fatty acids at concentrations found in plasma on healthy and ketotic ewes. *American Journal of Veterinary Research* (63): 958–962.
63. Lessire M., Doreau M., Aumaitre A., 1992. Digestion and metabolism of fats in domestic animals. In: *Manuel des Corps Gras*. pp 683-694.
64. Lisuzzo A., Laghi L., Fiore F., Harvadine K., Mazzotta E., Faillace V., Spissu N., Zhu C., Moscati L., Fiore E., 2022. Evaluation of the metabolomic profile through 1 H-NMR spectroscopy in ewes affected by postpartum hyperketonemia. *Scientific Reports* (12): 16463.
65. Lisuzzo A., Fiore F., Harvatine K., Mazzotta E., Berlanda M., Spissu N., Badon T., Contiero B., Moscati L., Fiore E., 2022. Changes in plasma fatty acids profile in hyperketonemic ewes during early lactation: a preliminary study. *Scientific Reports* 12(1): 17017.
66. Lock A. L., Harvatine K. J., Ipharraguerre I., Van Amburgh M., Drackley J. K., Bauman D. E., 2004. E dynamics of fat digestion in lactating dairy cows: what does the literature tell us?. *Feedstuffs* 78(6).
67. Lock A. L., Harvatine K. J., Drackley J. K., Bauman D. E., 2006. Concepts in fat and fatty acid digestion in ruminants. *Proceedings Intermountain Nutrition Conference*, pp 85–100.
68. Lock A. L., Bauman D. E., Garnsworthy P. C., 2005. Effect of Production Variables on the Cis-9, Trans-11 Conjugated Linoleic Acid Content of Cows' Milk. *Journal of Dairy Science* (88): 2714-2717.
69. Loften J. R., Linn J. G., Drackley J. K., Jenkins T. C., Soderholm C. G., Kertz A. F., 2014. Palmitic and stearic acid metabolism in lactating dairy cows. *Journal Dairy Cow* (97): 4661-4674.
70. McArt J. A., Nydam D. V., Oetzel G. R., 2012. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. *Journal of Dairy Science* (95): 5056- 5066.
71. McFadden J. W., 2020. Review: Lipid biology in the periparturient dairy cow: Contemporary perspectives. *Animal* (14): 165–175.
72. McPherson P.A. and McEneny J., 2012. The biochemistry of ketogenesis and its role in weight management, neurological disease and oxidative stress. *Journal of Physiology and Biochemistry* 68(1): 141–151.
73. Moore J. H. and Christie W. W., 1984. Digestion, absorption and transport of fats in ruminant animals. *Fats in Animal Nutrition*. pp 123-149.

74. Mordak R. and Stewart P. A., 2015. Stress periparto e soppressione immunitaria come potenziale causa di ritenzione di placenta nelle vacche da latte altamente produttive: esempi di prevenzione. *Acta Veterinaria Scandinavica* (57): 84.
75. Nagahata H., Ito H., Maruta H., Nishikawa Y., Susukino H., Matsuki S., Higuchi H., Okuhira T., Anri A., 2007. Controlling highly prevalent *Staphylococcus aureus* mastitis from the dairy farm. *Journal of Veterinary Medical Science* (69): 893–898.
76. Noble R. C., 1981. Digestion, transport and absorption of lipids. Lipid metabolism in ruminant animals. pp 57-93.
77. Oetzel G. R., 2004. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* (20): 651- 674.
78. Oetzel G. R., 2012. Understanding the impact of subclinical ketosis. *Cornell nutrition conference proceeding*. pp 12-21.
79. Oikawa S., Mizunuma Y., Iwasaki Y., Tharwat M., 2010. Changes of very low-density lipoprotein concentration in hepatic blood from cows with fasting-induced hepatic lipidosis. *Canadian Journal of Veterinary Research* (74): 317–320.
80. Ospina P. A., Nydam D. V., Stokol T., Overton T. R., 2010. Evaluation of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *Journal of Dairy Science* 93(2): 546–554.
81. Paton C. M., Ntambi J. M., 2009. Biochemical and physiological function of stearoyl-coa desaturase. *American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism* 297(1): 28–37.
82. Peter A., Cegan A., Wagner S., Lehmann R., Stefan N., Königsrainer A., Königsrainer I., Häring H. U., Schleicher E., 2009. Hepatic lipid composition and stearoyl-coenzyme A desaturase 1 mRNA expression can be estimated from plasma VLDL fatty acid ratios. *Clinical Chemistry* (55): 2113–2120.
83. Radloff H. D., Schultz L. H., Hoekstra W. G., 1966. Relationship of Plasma Free Fatty Acids to Other Blood Components in Ruminants under Various Physiological Conditions. *Journal of Dairy Science* 49(2): 179–182.
84. Ranaraja U., Cho K. H., Park M. N., Choi T. J., Kim S. D., Lee J. S., Kim H. S., Do C. H., 2016. Impact of environmental factors on milk β -hydroxybutyric acid and acetone levels in Holstein cattle associated with production traits. *Korean Journal of Agricultural Science* (43): 394–400.
85. Raphael W. and Sordillo L. M., 2013. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammation: The role of phospholipid biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences* (14): 21167–21188.
86. Russell K. E. and Roussel A. J., 2007. Evaluation of the Ruminant Serum Chemistry Profile. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (23): 403–426.

87. Saarinen P. and Shaw J. C., 1950. Studies on ketosis in dairy cattle. XII. Blood lipids, phosphates, and phosphate activity of cows on different levels of feed intake postpartum. *Journal of Dairy Science* (33): 508.
88. Santiago M. and Strobel S., 2013. *Thin Layer Chromatography*. 1st edition. New Haven, Connecticut. © Elsevier Inc, cap 24 pp. 303- 323.
89. Schmidely P., Glasser F., Doreau M., Sauvant D., 2008. Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors. 1. Total fatty acids. *Animal* 2(5): 677–690.
90. Schwingshackl L. and Hoffmann G., 2012. Monounsaturated Fatty Acids and Risk of Cardiovascular Disease: Synopsis of the Evidence Available from Systematic Reviews and Meta-Analyses. *Nutrients* 4(12): 1989–2007.
91. Sherwood L., Klandorf H., Yancey P., 2006. *Fisiologia degli animali. Dai geni agli organismi*. cap 14 pp. 631-669.
92. Siard-Altman M. H., Patricia A. H., Moffett-Krotky A. D., Ireland J. L., Betancourt A., Barker V. D., McMurry K. E., Reedy S. E., Adams A. A., 2020. Relationships of inflamm-aging with circulating nutrient levels, body composition, age, and pituitary pars intermedia dysfunction in a senior horse population. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (221): 110013.
93. Siliprandi N. and Tettamanti G., 2014. *Biochimica medica*, 4* edizione, Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padova, pp 321-380.
94. Singh N., Singh N., Barnych B., Wagner K. M., Wan D., Morisseau C., Hammock B. D., 2021. Adrenic Acid-Derived Epoxy Fatty Acids Are Naturally Occurring Lipids and Their Methyl Ester Prodrug Reduces Endoplasmic Reticulum Stress and Inflammatory Pain. *ACS Omega* (6): 7165–7174.
95. Sjaastad V., Sand O., Hove K., 2013. *Fisiologia degli animali domestici*, 1a edizione, Milano, C.E.A Casa Editrice Ambrosiana, pp. 212-250.
96. Suriyasathaporn W., Heuer C., Noordhuizen-Stassen E. N., Schukken Y., 2000. Hyperketonemia and impairment of udder defense: a review. *Veterinary Research* (31): 397-412.
97. Sutton J. D. and Reynolds C. K., 2011. *Small Intestine of Lactating Ruminants*. The University of Reading, Earley Gate, Reading, UK.
98. Tessari R., Berlanda M., Morgante M., Badon T., Ginesella M., Mazzotta E., Contiero B., Fiore. E., 2020. Changes of plasma fatty acids in four lipid classes to understand energy metabolism at different levels of non-esterified fatty acid (Nefa) in dairy cows. *Animals* (10): 1–16.
99. Tyburczy C., Lock A. L., Dwyer D. A., Destailats F., Mouloungui Z., Candy L., Bauman D. E., 2008. Uptake and utilization of trans octadecenoic acids in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* (91): 3850–3861.
100. Van den Top M., Van Tol A., Jansen H., Geelen M. J. H., Beynen A. C., 2005. Fatty Liver in Dairy Cows Post Partum Is Associated with Decreased Concentration of Plasma

- Triacylglycerols and Decreased Activity of Lipoprotein Lipase in Adipocytes. *Journal of Dairy Research* 72(2): 129–137.
101. Vazquez Añon M., Bertics S., Luck M., Grummer R. R., Pinheiro J., 1994. Trigliceridi epatici peripartum e metaboliti plasmatici nelle vacche da latte. *Journal of Caseificio Science* (77): 1521 – 1528.
 102. Vernon R. G. and Flint D. J., 1988. Lipid-metabolism in farm-animals. *Proceedings of the Nutrition Society* 47(3): 287–293.
 103. Walsh R. B., Walton J. S., Kelton D. F., LeBlanc S. J., Leslie K. E., Duffield T. F., 2007. The effect of sub-clinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science* (90): 2788-2796.
 104. Wang X., Lin H., Gu Y., 2012. Multiple roles of dihomo- γ -linolenic acid against proliferation diseases. *Lipids in Health and Disease* (11): 1–9.
 105. Watts J. S., Rezamand P., Sevier D. L., Price W., McGuire M. A., 2013. Short-term effects of dietary trans fatty acids compared with saturated fatty acids on selected measures of inflammation, fatty acid profiles, and production in early lactating Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* (96): 6932–6943.
 106. Weiss-Hersh K., Weiss-Hersh K., Garcia A. L., Marosvölgyi T., Szklenár M., Decsi T., Rühl R., 2020. Saturated and monounsaturated fatty acids in membranes are determined by the gene expression of their metabolizing enzymes SCD1 and ELOVL6 regulated by the intake of dietary fat. *European Journal of Nutrition* (59): 2759–2769.
 107. Wildman E. E., Jones G. M., Wagner P. E., Bowman R. L., 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *Journal of Dairy Science* (65): 495–502.
 108. Xia J., Broadhurst D. I., Wilson M., Wishart D. S., 2013. Translational Biomarker Discovery in Clinical Metabolomics: An Introductory Tutorial. *Metabolomics* (9): 280–299.
 109. Youssef M. A., El-Khodery S. A., El-deeb W. M., El-Amaiem W. E. E. A., 2010. Ketosis in buffalo (*Bubalus bubalis*): Clinical findings and the associated oxidative stress level. *Tropical Animal Health and Production* (42): 1771–1777.
 110. Zerbini G. and Luzi L., 2010. Le membrane cellulari. In: *Biologia cellulare nell'esercizio fisico*. Springer.
 111. Zhang G., Ametaj B. N., 2020. Ketosis an Old Story Under a New Approach. *Dairy* (1): 42–60.
 112. Zhu Y., Liu G., Du X., Shi Z., Jin M., Sha X., Li X., Wang Z., Li X., 2019. Expression patterns of hepatic genes involved in lipid metabolism in cows with subclinical or clinical ketosis. *Journal of Dairy Science* (102): 1725–1735.
 113. Zicarelli L., 1990. Considerazioni sull'allevamento bufalino. Edito a cura dell'ERSAC, Napoli.

114. Zicarelli L., Di Lella T., De Franciscis G., 1977. Observations on the reproductive parameters of buffaloes bred in the "Piana del Sele", Italy. *Acta medica veterinaria* (23): 183-206.

SITOGRAFIA

1. <https://scholar.google.com/>
2. <https://www.ruminantia.it/>
3. <https://www.sciencedaily.com>
4. <https://informatorezootecnico.edagricole.it>
5. <https://galileodiscovery.unipd.it>
6. <https://www.cortal.it/effetti-metabolici-del-glicole-propilenico/>
7. <https://bitesizebio.com/28687/carrying-gas-chromatography/>
8. <https://www.chimica-online.it/biologia/chilomicroni.htm>
9. <https://www.med4.care/curva-roc-receiver-operating-characteristic-introduzione-e-applicazione-ai-test-diagnostici/>