

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN
MEDICINA VETERINARIA

LA SPETTROSCOPIA DI RISONANZA MAGNETICA PROTONICA ($^1\text{H-NMR}$)
NELLA VALUTAZIONE DEL PROFILO METABOLOMICO DI BOVINE SANE E
IPERCHETONEMICHE DURANTE IL PERIODO DI TRANSIZIONE

Relatore

Prof. Massimo Morgante

Correlatrice

Dott.ssa Vanessa Faillace

Laureanda

Anastasia Lisuzzo

Matricola n.

1128500

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

“Ajutati ca Dio t’ajuta”

Sommario

Abstract	7
Riassunto	9
Premessa	11
1.Introduzione	13
1.1 Il periodo di transizione	13
1.2 Le principali patologie del periodo di transizione	20
1.2.1 Il collasso puerperale o sindrome ipocalcemia	20
1.2.2 La sindrome della vacca a terra.....	23
1.2.3 La dislocazione dell'abomaso.....	25
1.2.4 La ritenzione placentare.....	27
1.2.5 Le metriti	29
1.2.6 La lipidosi epatica	31
1.2.7 La chetosi.....	33
1.3 La Metabolomica	37
1.4 Il progetto di ricerca e gli obiettivi di questo studio.....	43
2. Materiali e Metodi	44
2.1 Aziende ed animali.....	44
2.2 Valutazione del Body Condition Score.....	45
2.3 Campionamento ematico	45
2.4 Valutazione della chetonemia in campo.....	45
2.5 Analisi di laboratorio.....	46
2.6 Analisi metabolomica ¹ H-NMR.....	46
2.7 L'analisi statistica	48
3. Risultati	50
4.Discussione	65
5.Conclusioni	71
Bibliografia	74
Sitografia	87

Abstract

The increase in energy demands during the transition period leads to a negative energy balance that predisposes the dairy cow to various diseases, including ketosis. This is characterized by an increase in ketone bodies (acetoacetate, acetone and β -hydroxybutyrate) primarily in the blood and after in the urine and milk.

The aim of this study is the metabolic analysis of serum by $^1\text{H-NMR}$ related to blood β -hydroxybutyrate changes in bovine during the first part of lactation for the potential development of early diagnostic methods of the disease.

This study was conducted on 49 Friesian cows by blood sampling from the coccygeal vein. The cows were classified into three groups based on the β -hydroxybutyrate value: BHB 0, the cows that had values below 0.5 mmol/L; BHB 1, cows with values between 0.5 and 1.0 mmol/L; BHB 2, cows with values above 1.0 mmol/L.

The differences in the parameters between the three groups were analyzed using the t-student test and the non-parametric Mann-Whitney test. The differences in the metabolites were analyzed by ANOVA test. The metabolome tendencies were assessed via rPCA and heatmap. Finally, the predictive values for the pathology were assessed by ROC analysis.

We have identified 57 metabolites, of which 23 statistically significant. These metabolites influence three metabolic cycles including: glycine, serine and threonine metabolism; biosynthesis of neomycin, kanamycin and gentamicin; biosynthesis of the aminoacyl-tRNA.

We have identified important differences in metabolite concentrations between the three groups. Furthermore, through the ROC analyzes of the 23 metabolites, we have identified 12 as potential biomarkers of the pathology. Of these, acetone, β -hydroxybutyrate and TMAO were the most predictive.

Riassunto

L'incremento delle richieste energetiche durante il periodo di transizione conduce ad un bilancio energetico negativo che predispone la bovina da latte a diverse patologie, tra cui la chetosi. Questa si caratterizza per un incremento dei corpi chetonici (acetoacetato, acetone e β -idrossibutirrato) primariamente nel sangue e, successivamente, nelle urine e nel latte.

L'obiettivo di questo studio è l'analisi metabolomica del siero tramite $^1\text{H-NMR}$ correlata ai cambiamenti di β -idrossibutirrato ematici della bovina durante la prima fase di lattazione per il potenziale sviluppo di metodiche di diagnostica precoce della patologia.

Tale studio è stato condotto su 49 bovine di razza Frisona tramite campionamento ematico dalla vena coccigea. Le bovine sono state classificate in tre gruppi in base al valore di β -idrossibutirrato: BHB 0, le bovine che presentavano valori al di sotto di 0.5 mmol/L; BHB 1, le bovine che presentavano valori compresi tra 0.5 ed 1.0 mmol/L; BHB 2, le bovine che presentavano valori superiori ad 1.0 mmol/L.

Le differenze dei parametri tra i tre gruppi sono state analizzate tramite test t-student e test non parametrico di Mann-Whitney. Le differenze dei metaboliti sono state analizzate tramite test ANOVA. Le tendenze del metaboloma sono state valutate tramite rPCA ed *heatmap*. Infine, i valori predittivi per la patologia sono stati valutati mediante ROC test.

Sono stati identificati 57 metaboliti, di cui 23 statisticamente significativi. Tali metaboliti influenzano tre cicli metabolici, tra cui: metabolismo della glicina, serina e treonina; biosintesi della neomicina, kanamicina e gentamicina; biosintesi dell'aminoacil-tRNA.

Sono state rilevate importanti differenze nelle concentrazione dei metaboliti tra i tre gruppi. Inoltre, tramite le analisi ROC dei 23 metaboliti, 12 sono risultati dei potenziali biomarkers della patologia. Di questi, l'acetone, il β -idrossibutirrato ed il TMAO sono risultati i maggiormente predittivi.

Premessa

Le malattie metaboliche sono tra le patologie più frequenti negli allevamenti delle bovina da latte. Ciò in quanto, specialmente nel periodo di transizione, le bovine si trovano in condizioni di aumentato fabbisogno energetico per sopperire al mantenimento, alla gravidanza ed alla lattazione che non viene soddisfatto tramite la razione fornita. Oltretutto, in tale periodo si realizza anche una riduzione dell'ingestione volontaria, favorendo quindi l'instaurarsi di un bilancio energetico negativo.

Ecco, dunque, che la bovina per soddisfare le proprie esigenze entra in un metabolismo prettamente catabolico, mobilitando le proprie riserve corporee, tra cui il tessuto muscolare ed il tessuto adiposo. È proprio tale stato che favorisce l'instaurarsi di molteplici patologie metaboliche che incidono non solo sullo stato di salute e di benessere della bovina, ma anche sull'economia aziendale, aumentando il numero di animali riformati ed i trattamenti veterinari e riducendo la produzione latte.

Di conseguenza, la possibilità di diagnosticare precocemente le patologie metaboliche, anche quando sono presenti in forma subclinica, assume un'importante valenza.

La metabolomica è una metodica di indagine non invasiva che permette la misurazione simultanea di tutti i metaboliti presenti in un campione biologico, approccio che spesso viene definito globale (Jones and Cheung, 2007) e che lo fa differire notevolmente dall'analisi biochimica dello stesso (Kirwan, 2014). Tra gli strumenti utilizzabili, la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) è un potenziale strumento diagnostico (Hugle et al., 2012) che offre informazioni qualitative e quantitative delle centinaia di metaboliti presenti in un campione (Zhu, 2018), fornendo, quindi, importanti informazioni sul sistema metabolico e biologico (Goldansaz et al., 2017). Inoltre, il *panel* di metaboliti ottenuto tramite tale indagine, piuttosto che l'utilizzo di un solo metabolita, presenta un maggiore potere discriminante (Zheng et al., 2017) per la diagnosi e la prognosi delle patologie (Zhu, 2018) e tale metodica d'indagine inizia ad essere utilizzata in ambito veterinario (Kirwan, 2014).

1.Introduzione

1.1 Il periodo di transizione

Il periodo di transizione è definito come l'intervallo di tempo che inizia tre settimane prima del parto e si conclude tre settimane dopo il parto (Grummer, 1995). Tale termine serve a sottolineare gli importanti cambiamenti fisiologici, metabolici e nutrizionali che si realizzano in questo lasso di tempo (Block, 2010) e che lo rendono effettivamente un periodo critico (Duffield et al., 2009).

Il periodo di transizione viene generalmente suddiviso in due fasi sulla base della diversa ingestione di sostanza secca (DMI). La prima fase inizia 7 giorni prima del parto ed è caratterizzata da una riduzione dell'intake del 30%. La seconda fase viene compresa tra il parto e la fine del periodo di transizione ed è contraddistinta da un graduale aumento dell'ingestione. Tale incremento si stima essere di circa 1,5-2,5 kg/settimana, per un totale complessivo di 4,5-7,5 kg da sommarsi alla razione base (Grant and Albright, 1995), con un incremento superiore nelle pluripare rispetto alle primipare. La riduzione del DMI della prima fase è fisiologica ed è attribuita ad una crescita fetale che occupa spazio a livello addominale e disloca il rumine (Block, 2010). Tuttavia, la sua riduzione può peggiorare ulteriormente anche per cause gestionali, quali insufficiente spazio in cuccetta, sovraffollamento e continui spostamenti che sconvolgono la gerarchia sociale. Questi fattori limitano le capacità della bovina di consumare quantità sufficienti di alimento (Cook and Nordlund, 2004) e rappresentano delle cause di stress che inducono notevoli cambiamenti fisiologici e metabolici (Drackley et al., 2005).

La prima sfida per il successo o meno della futura lattazione (Duffield et al., 2009) è, dunque, data dall'importante richiesta di nutrienti in un tempo in cui il DMI è ridotto (Drackley, 1999). Infatti, il controllo del metabolismo durante tale periodo coinvolge 2 tipi di regolazione: l'omeostasi e l'omeoresi. Il primo è coinvolto nel mantenimento dell'equilibrio fisiologico dell'animale, mentre il secondo coordina il metabolismo dei tessuti corporei necessari a supportare uno stato fisiologico come la gravidanza (Baird, 1982). Essa, infatti, impone un notevole costo energetico all'animale, in quanto i nutrienti richiesti alla fine della gestazione sono circa del 75% superiori rispetto ad un animale non gravido dello stesso peso. Le motivazioni di un tale incremento sono attribuibili alle aumentate richieste da parte degli invogli fetali (Bauman and Currie, 1980), dal feto, il cui peso aumenta esponenzialmente nelle

ultime settimane di gravidanza, e della mammella che aumenta il suo volume ghiandolare e arriva ad un suo specifico fabbisogno proteico di 150-200 grammi al giorno (Paganini and Serafini, 2004). Le vacche, dunque, si trovano in una condizione che modifica drasticamente il loro metabolismo (Block, 2010) ed induce, data la riduzione del DMI, uno stato di bilancio energetico negativo (NEB, Negative Energy Balance) che può compromettere la capacità della bovina di far fronte ai cambiamenti fisiologici in atto (Van Saun, 1991).

L'inabilità nell'adattare rapidamente il proprio metabolismo per far fronte alle richieste della gravidanza e della lattazione esita frequentemente in patologie cliniche o subcliniche degli animali (Bauman and Currie, 1980). I principali problemi metabolici che possono, dunque, sorgere nel periodo della transizione vengono suddivisi in 3 categorie:

- Disordini relazionati al metabolismo energetico come la steatosi epatica, la chetosi e l'acidosi acuta e subacuta;
- Disordini relazionati al metabolismo dei minerali come l'ipocalcemia clinica o subclinica;
- Disordini relazionati al sistema immunitario come la ritenzione placentare, le metriti e le mastiti.

Queste patologie sono tra loro correlate, per cui la prevenzione di una può contribuire a ridurre l'incidenza della altre (Block, 2010). Ciò non è da sottovalutare, in quanto tali patologie esitano in una perdita di produzione lattea durante la malattia e, spesso, durante l'intera lattazione. Infatti, bovine con un problema di salute in questa fase tendono ad avere, durante i primi 20 giorni di lattazione, una riduzione della produzione di circa 7.2 kg di latte al giorno (Drackley, 1999). Oltre a ciò, bisogna considerare l'incremento dei costi associati ai trattamenti veterinari ed alle riforme (Ingvarsen et al., 2003).

Ecco, dunque, che le modalità in cui il periodo di transizione viene gestito e si realizza sono di grande importanza, in quanto strettamente connessi alla produzione lattea, alle patologie cliniche e subcliniche del post-partum, alle performance riproduttive successive (Block, 2010) e, quindi, alla redditività dell'allevamento. Si è così sottolineato l'interesse verso la nutrizione e la gestione di tale periodo (Drackley et al., 2005), spostando il punto di osservazione dallo stato generale della mandria al singolo soggetto (Paganini and Serafini, 2004).

1.1.1 L'endocrinologia ed il metabolismo energetico del peri-parto

Entrando più nello specifico, vediamo quali sono, dunque, i meccanismi endocrini e metabolici che rendono il periodo di transizione così critico.

L'estradiolo 17- β , nella fase terminale della gestazione, aumenta la propria concentrazione, raggiungendo il proprio picco (Butler, 2010), con un livello plasmatico di circa 2000 pg/ml immediatamente prima del parto (Grummer et al., 1990). Come sappiamo, esso è legato al meccanismo endocrino del parto, coinvolgendo l'incremento della motilità miometriale e l'espressione dei recettori per l'ossitocina, ma è anche un'importante fattore per lo sviluppo della ghiandola mammaria, in cui incrementa lo sviluppo dei dotti e degli alveoli attraverso l'induzione dell'espressione dei recettori per la prolattina (Green et al., 1994). Quest'ultimo ormone, infatti, aumenta la sua concentrazione tra la quarta e la seconda settimana antecedente il parto, raggiungendo valori plasmatici di circa 50 ng/ml, e raggiungendo il proprio picco in prossimità del parto, con valori di circa 230 ng/ml. Oltre agli estrogeni ed alla prolattina, anche i glucocorticoidi tenderanno ad aumentare in prossimità del parto, con valori di circa 9 ng/ml (Edgerton and Hafs, 1973). L'incremento degli estrogeni e dei glucocorticoidi in tale periodo contribuiscono, insieme ad altri fattori già citati, alla riduzione del DMI ed allo stesso tempo coordinano importanti cambiamenti metabolici, come la mobilizzazione di grasso corporeo o lipolisi. Il risultato è un incremento degli acidi grassi non esterificati (NEFA), che aumentano gradualmente nel preparto e rapidamente negli ultimi 3 giorni di gestazione. Una parte di questo incremento è, quindi, sotto controllo ormonale, ma un'altra parte risulta del NEB derivante dallo squilibrio tra le richieste energetiche e il DMI (Block, 2010).

L'estradiolo, inoltre, contribuisce a causare l'insulino-resistenza, in quanto riduce l'espressione genica dei recettori per l'insulina nei tessuti non epatici. Con il termine insulino-resistenza si indica uno stato metabolico in cui un livello fisiologico di insulina produce una risposta biologica inferiore a quella normalmente attesa (Butler, 2010). Associata a tale stato, si realizza anche una riduzione della concentrazione di insulina (Kahn, 1978), che inizia a decrescere a partire dalla terza settimana antecedente al parto e continua a diminuire nel primo post-parto (Doepel et al., 2002). L'insulina è un ormone ipoglicemizzante che ha un'azione anabolica nell'organismo, inducendo l'aumento della sintesi di glicogeno, l'inibizione della gluconeogenesi, l'assorbimento di aminoacidi nei tessuti extraepatici e l'aumento della sintesi di trigliceridi, definita anche liponeogenesi, nel tessuto adiposo

(Sjaastad et al., 2013). Da essa dipendono i diversi tessuti periferici, tra cui il muscolo ed il tessuto adiposo, per favorire il trasporto intracellulare di glucosio (Bell and Bauman, 1997).

Il glucosio è considerato il nutriente primario per la crescita fetale e la sintesi di latte. La sua presenza è, dunque, prioritaria nel tessuto uterino e mammario per i diversi mammiferi gravidi o in lattazione ed una sua carenza può portare a sindromi cheto-acidotiche, come la tossiemia da gravidanza o la chetosi da lattazione. Il suo principale precursore è il propionato, un acido grasso volatile (VFA) prodotto a livello ruminale e direttamente correlato all'ingestione di substrato fermentescibile. Se il propionato si riduce, allora altri substrati gluconeogenici, come il lattato, gli aminoacidi ed il glicerolo, verranno utilizzati per la sua produzione a livello epatico. Durante la fase terminale della gravidanza, quando il DMI è ridotto, la produzione di glucosio viene principalmente supportata da una mobilitazione periferica dei substrati endogeni già citati (Bell and Bauman, 1997). Considerando la produzione tramite gluconeogenesi ed i ridotti livelli di insulina, ci si aspetterebbe che la glicemia sia alta in tale periodo. Invece assistiamo ad una sua riduzione esponenziale (Vazquez et al., 1994). Infatti, si ha la riduzione dei trasportatori per il glucosio GLUT4 a livello del tessuto adiposo e del tessuto muscolare, ma si ha anche un incremento dei trasportatori GLUT1 e GLUT3 a livello placentare e mammario a partire già da metà gravidanza. In tal modo, nonostante l'ipoglicemia, si garantisce un corretto apporto di glucosio sia al feto che alla ghiandola mammaria (Bell and Bauman, 1997). Tali variazioni dell'espressione dei diversi trasportatori del glucosio vengono anche favorite dal Growth Hormone (GH) (Zhao et al., 1995).

Il GH od ormone della crescita o somatotropina è un ormone antagonista dell'azione insulinica e, pertanto, svolge una funzione iperglicemizzante (Lanna and Bauman, 1999) e contribuisce anch'esso allo sviluppo dell'insulino-resistenza (Butler, 2010). La sua concentrazione è elevata all'avvicinarsi del parto ed inibisce la liponeogenesi stimolata dall'insulina, favorendo, quindi, la lipolisi (Doepel et al., 2002). Il tessuto adiposo è, dunque, un importante target del GH, con un conseguente incremento dei NEFA e del glicerolo risultanti dalla lipolisi (Houseknecht et al., 1995). Parallelamente, la liponeogenesi, favorita fino ad allora, subisce un calo pari a circa il 50% nel mese antecedente al parto, per continuare poi anche nel primo mese di lattazione con un ulteriore decremento del 5% (McNamara and Hillers, 1986). L'incremento della lipolisi è anche conseguente all'incremento del lattogeno placentare, della prolattina e delle catecolammine. Quest'ultime incrementano rapidamente in prossimità del parto (Vazquez et al., 1994) e si associano ad un incremento del numero di recettori beta-adrenergici, la cui

espressione varia in modo inversamente proporzionale rispetto alla disponibilità di nutrienti (Jaster and Wegner, 1981).

Il periodo di transizione è, inoltre, spesso caratterizzato da condizioni infiammatorie che possono derivare da stress, patologie metaboliche, traumi, infezioni, endotossine o anche parassiti che inducono il rilascio di citochine pro-infiammatorie. Esse stimoleranno la produzione delle proteine di fase acuta (APP), che possono essere positive, come l'aptoglobina e la ceruplasmina, o negative, come l'albumina e le proteine che legano il retinolo. Tale condizione porterà ad una riduzione della produzione latte e della fertilità (Bertoni et al., 2008), indurrà uno stress immunitario ed alterazioni metaboliche nell'assimilazione dei nutrienti per la crescita e lo sviluppo fetale (Elasser et al., 2000), peggiorando anche lo stato di anoressia materno (Trevisi et al., 2002).

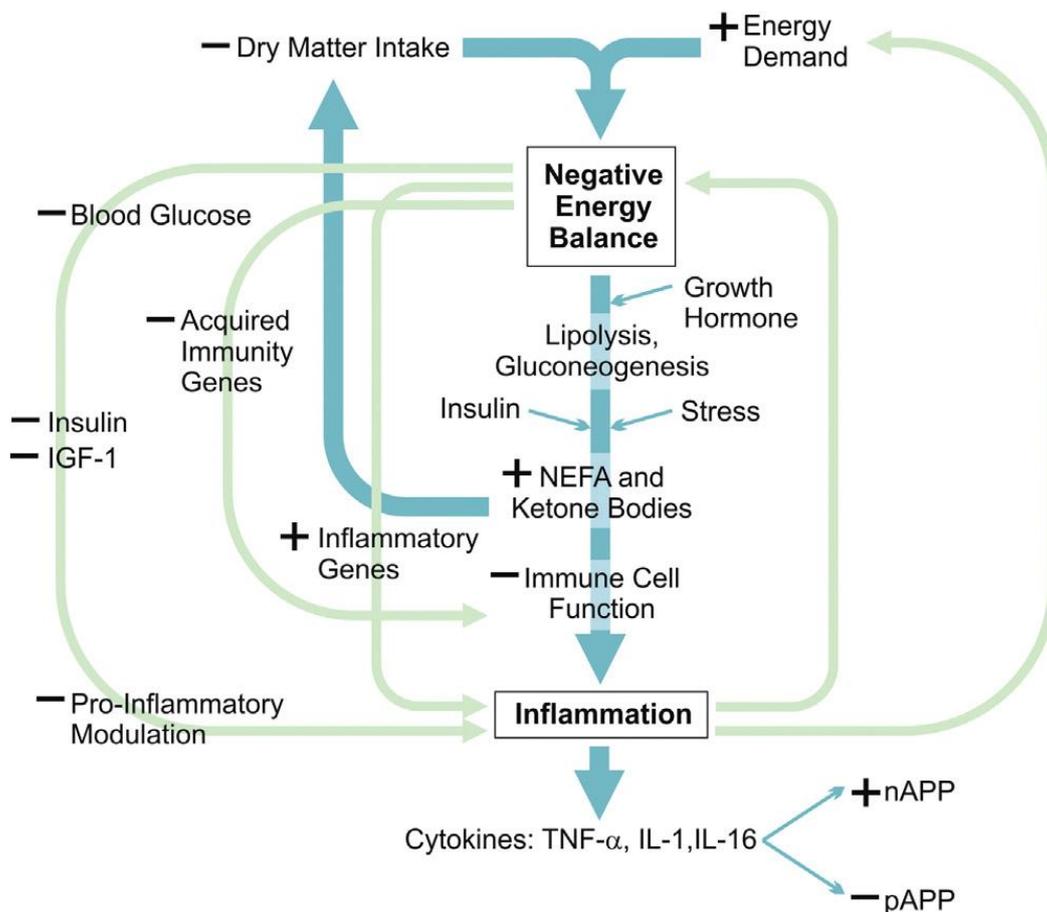


Figura 1: Le maggiori interazioni tra il sistema immunitario, endocrino e metabolico durante il periodo di transizione. Fonte: Esposito et al., 2014.

1.1.2 Il bilancio energetico negativo

Durante il periodo di transizione le riserve corporee vengono utilizzate per il mantenimento, la crescita fetale e la produzione latte. Durante tale periodo la quantità di energia richiesta eccede la quantità di energia ingerita con la dieta. Ciò conduce ad un NEB (Kim and Suh, 2003). Il NEB può iniziare anche molto precocemente, verso la 6^a settimana precedente il parto (Ospina et al., 2010), ma raggiunge il proprio picco soltanto nella seconda settimana successiva a questo (Butler, 2000). Mediamente, esso termina circa 45 giorni dopo il parto, con una deviazione standard di 21 giorni (Chapinal et al., 2012).

Il DMI è comunemente utilizzato come indicatore dello stato nutrizionale della bovina. Con il progredire della gestazione esso tende a ridursi, infatti, all'inizio del periodo di transizione le bovine tendono a consumare soltanto 1,7-2 % del proprio peso corporeo (BW) e in prossimità del parto il 1,3-1,4 % BW (Grummer et al., 2004). Questo fenomeno non è allarmante, ma fisiologico (Drackley et al., 2005). Infatti, abbiamo già precedentemente descritto i diversi fattori che lo possono influenzare.

Negli ultimi 75 giorni di gestazione (Moe and Tyrrell, 1972) la richiesta energetica tende ad incrementarsi per soddisfare le esigenze nutritive del feto. Infatti, il vitello ha acquisito, nei primi sette mesi di gestazione, circa il 40% del peso alla nascita, ma negli ultimi mesi subisce un rapido sviluppo e di conseguenza aumentano le richieste energetiche (Reynolds et al., 1986), che sono di circa 0,82 Mcal di energia, con 117 g di proteine, 10,3 g di calcio, 5,4 g di fosforo e 0,2 g di magnesio. Tuttavia, la domanda energetica richiesta per la formazione del colostro eccede di molto le richieste del feto. Infatti, la produzione di appena 10 kg di colostro al parto richiede circa 11 Mcal di energia, con 140 g di proteine, 23 g di calcio, 9 g di fosforo e 1 g di magnesio (Goff and Horst, 1997).

Il DMI, tuttavia, aumenterà soltanto poche settimane dopo il picco di produzione latte (Bell and Bauman, 1997), il quale è atteso tra la quarta e l'ottava settimana dopo il parto (Doepel et al., 2002). Ecco, quindi, che lo squilibrio tra il DMI e le richieste energetiche inducono il NEB (Grummer et al., 2004), con un conseguente incremento dell'attività catabolica, testimoniata dalla variazione in negativo della condizione corporea (Drackley et al., 2001) ed una perdita del 1,7-2 % del peso corporeo. Una riduzione del punteggio del body condition score (BCS), maggiore di 0,5 unità, indica di un eccessivo NEB (Ferguson, 1987), riflettendo gli importanti cambiamenti energetici in atto (Kim and Suh, 2003).

Si realizza, dunque, un incremento dell'utilizzazione di aminoacidi dalle proteine muscolari e di glicerolo dal tessuto adiposo al fine di sintetizzare nuovo glucosio e fornire energia (Drackley et al., 2005). L'uso di glucosio, di aminoacidi e di acidi grassi incrementano, dopo il parto, rispettivamente di 2.7, 2 e 4.5 volte rispetto alla fase gravidica (Bell, 1995). La mobilitazione del tessuto adiposo, però, ha come conseguenza la formazione di NEFA e di BHB (β -Idrossibutirrato, uno dei principali corpi chetonici). Questi due vengono utilizzati come marker di un eccessivo NEB (Ospina et al., 2010), con una maggiore significatività dei NEFA nel periodo compreso tra la settimana antecedente il parto e quella seguente (Chapinal et al., 2011). Con l'inizio della lattazione, inoltre, si realizza anche un aumento della domanda di calcio, il principale minerale contenuto nel latte (Reinhardt et al., 2011).

Durante il primo mese seguente il parto, si realizzano circa il 75% delle patologie associate al periodo di transizione. Infatti, i NEFA elevati, associati alla riduzione del DMI, portano ad un'alterazione della funzionalità neutrofilica, con conseguente riduzione delle difese immunitarie contro le infezioni (Chapinal et al., 2011) ed in particolar modo le mastiti (Goff and Horst, 1997). Gli elevati valori di NEFA, superiori a 0,5 mEq/L, sono anche associati ad un incremento delle dislocazioni abomasali (Chapinal et al., 2012) e l'elevato uptake di questi a livello epatico può condurre a stati di lipidosi epatica; mentre i corpi chetoni derivati dal loro parziale metabolismo possono condurre a stati di chetosi (Drackley et al., 2005). Inoltre, l'aumentato fabbisogno di calcio può portare a stati di ipocalcemia da moderata a considerevole (Reinhardt et al., 2011). Le variazioni del BCS possono, inoltre, relazionarsi a patologie riproduttive, come l'inattività ovarica, aumentandone l'incidenza (Kim and Suh, 2003).

Ecco, quindi, che nel momento in cui le riserve di precursori del glucosio, proteine, calcio o altri metaboliti risultano insufficienti e si associano ad una eccessiva mobilitazione di lipidi, si vanno ad attivare adattamenti metabolici che possono risultare inadeguati o eccessivi e possono portare all'instaurarsi di patologie metaboliche e infettive (Van Saun, 2016).

1.2 Le principali patologie del periodo di transizione

1.2.1 Il collasso puerperale o sindrome ipocalcémica

Il collasso puerperale o sindrome ipocalcémica o *milk fever* è una condizione caratterizzata da una riduzione dei livelli di calcio ionico nello spazio extracellulare, incluso il plasma (Constable et al., 2017).

La calcemia nella bovina da latte è fisiologicamente mantenuta entro un intervallo compreso tra gli 8 ed i 10 mg/dl (Goff et al., 1996), ma in corso di ipocalcemia tale valore scende al di sotto dei 7.5 mg/dl (Melendez et al., 2002). Tale patologia si manifesta generalmente entro 48 ore dal parto, ma il periodo critico perdura fino al decimo giorno post-partum. L'incidenza dell'ipocalcemia clinicamente manifesta, nelle vacche da latte, è riportata essere del 5-10% della mandria, ma, se si considera la forma subclinica, l'incidenza può raggiungere un valore compreso tra il 33 ed il 50% della stessa (Constable et al., 2017).

Il metabolismo del calcio è regolato da numerosi e complessi fattori, tra i principali vi sono il paratormone (PTH), l'1,25-diidrossi-colecalciferolo (forma attiva della vitamina D) e la tireocalcitonina. Questi regolatori agiscono in vari distretti dell'organismo, quali il compartimento osseo, l'apparato digerente, i reni, il sangue ed i liquidi extracellulari e, naturalmente durante e subito dopo la gravidanza, rispettivamente nei tessuti del feto e nella mammella (Sherwood et al., 2006).

All'interno dell'organismo, considerando una bovina di circa 600 Kg BW, sono presenti circa 7,8-8,5 Kg di calcio a livello scheletrico, meno di un 1 g a livello intracellulare, 8-9 g nei fluidi extracellulari e 3-3,5 g nel plasma. Di questo, il 50% di calcio si trova legato all'albumina, mentre il 42-48% esiste in forma ionizzata e, pertanto, biologicamente attiva (Goff, 2014).

In tarda gestazione la richiesta giornaliera di calcio è di circa 30 g (Constable et al., 2017), di cui circa 15 g sono necessari alle richieste fetali, mentre gli altri 15 g (De Garis and Lean, 2009) vengono persi con le urine, circa 0,2-6 g, e con le feci, circa 5-8 g (Goff, 2014) e con l'inizio della lattazione questa richiesta aumenta in relazione alla produzione di colostro. Si realizza, dunque, un aumento dell'assorbimento ruminale ed intestinale, ed aumenta la mobilitazione delle riserve corporee, ovvero dal comparto osseo, poiché le riserve ematiche circolanti sono alquanto limitate. Si instaura, tuttavia, uno squilibrio tra l'input e l'output di calcio. Gli input sono costituiti dall'assorbimento intestinale, dal riassorbimento renale e dal riassorbimento della matrice ossea. L'output, invece, è costituito dalla produzione di colostro e,

successivamente, di latte. La conseguenza è un certo grado di ipocalcemia che è inevitabile (Constable et al., 2017).

Lo sviluppo dell'ipocalcemia è correlato a diversi fattori. Più frequentemente si riscontra in bovine ad alta produzione e multipare, tra il 3° ed il 7° parto, poiché l'efficienza dell'assorbimento intestinale di calcio ed il riassorbimento della matrice ossea, entrambe dipendenti dall'espressione dei recettori per la vitamina D biologicamente attiva, sono correlati in modo inversamente proporzionale con l'età della bovina (Constable et al., 2017). Inoltre, l'espressione di tali recettori a livello intestinale è influenzata anche dalla razza (Goff, 2014). Bovine Jersey, Swedish Red e White e le Norwegian Red sono maggiormente predisposte rispetto alle bovine Frisone (Constable et al., 2017). Alcune ricerche hanno investigato circa l'ereditabilità dell'ipocalcemia, talvolta con risultati contrastanti, la quale viene attestata tra lo 0 ed il 12,8% (De Garis et al., 2009). Un altro importante fattore legato all'ipocalcemia è il BCS della bovina (Harris, 1981), poiché bovine con uno stato nutrizionale eccessivo (uguale o superiore a 4 punti di BCS in una scala da 1 a 5) tendono ad avere un rischio circa 3.3 volte maggiore di sviluppare tale patologia (Heuer et al., 1999).

Nello sviluppo della patologia svolge un ruolo di fondamentale importanza anche l'alimentazione. La somministrazione giornaliera di una dieta che contiene più di 100 g di calcio, nelle ultime quattro settimane antecedenti il parto, tende a deprimere l'assorbimento intestinale ed il riassorbimento della matrice ossea, rendendo tali input quiescenti, fino al momento del parto, in cui si realizza un incremento importante delle richieste di questo. Inoltre, diete con una concentrazione elevata di cationi tendono ad alcalinizzare il sangue e predispongono ad una maggiore incidenza di ipocalcemia (Constable, 2014). Ciò in quanto l'alcalosi riduce la sensibilità dei tessuti all'azione del PTH, alterando il regolare assorbimento ed il ricambio di calcio nei vari distretti dell'organismo (ossa, intestino, sangue, rene, utero e mammella) (Goff, 2008). Al fine di evitare tale situazione, è necessario acidificare debolmente il sangue (Constable, 2014) valutando la differenza cationi-anioni della dieta (DCDA). Il potassio è uno dei più importanti cationi presenti nell'alimento e concentrazioni superiori al 2% lo rendono un fattore predisponente all'ipocalcemia. Inoltre, il fosforo, in concentrazioni superiori ad 80 g nella razione giornaliera, tende a favorire l'inibizione dell'enzima convertente la vitamina D e le carenze di magnesio riducono la sensibilità dei tessuti al PTH (Constable et al., 2017) ed il rilascio di questo (Goff, 2014).

La sintomatologia dell'ipocalcemia, se non trattata, tende a progredire. Esistono tre stadi di ipocalcemia, con sintomatologia progressivamente più grave. Nel primo stadio l'animale si presenta in stazione quadrupedale, riluttante a muoversi, atassico e con un'andatura insicura, il suo DMI è ridotto ed è presente stasi ruminale. Inoltre, sono presenti dei tremori muscolari sul capo e sugli arti. Nel secondo stadio l'animale non riesce, invece, a mantenere la stazione, per cui tende a rimanere in decubito sternale con la testa poggiata sul fianco ed il sensorio viene valutato depresso. La temperatura rettale risulta subnormale, con valori di circa 36-38°C, la cute e le estremità del corpo risultano fredde ed il musello è asciutto. Al terzo stadio l'animale si trova in decubito laterale con un grave ottundimento del sensorio, quasi comatoso. Si ha flaccidità muscolare con la facile esecuzione di movimenti passivi, un'importante tachicardia, con valori di circa 120 bpm, e la temperatura rettale si presenta ulteriormente ridotta. Se, inoltre, all'ipocalcemia si associa una ipomagnesemia, allora possiamo riscontrare, dopo il primo stadio, una moderata tetania ed iperestesia (Constable et al., 2017).

Lo stato di ipocalcemia, sia nelle forme cliniche che subcliniche, è quindi un'importante fattore in grado di condizionare l'attività riproduttiva e produttiva delle bovine, favorendo l'elevata incidenza di danni all'apparato genitale, come la ritenzione placentare, di patologie metaboliche, come la chetosi, o infine di gravi disturbi come la dislocazione dell'abomaso (Goff, 2008; Constable et al., 2017). Inoltre, l'ipocalcemia rende le bovine più suscettibili alle infezioni. Ciò in quanto il calcio intracellulare è coinvolto nei meccanismi di attivazione delle cellule immunitarie, regolando la proliferazione cellulare, la produzione di citochine e l'espressione dei recettori per le citochine, rendendo quindi il sistema immunitario meno efficiente (Kimura et al., 2006).

Tra le diagnosi differenziali vi sono le patologie metaboliche, come l'ipomagnesemia, l'ipofosfatemia, l'ipokaliemia e la chetosi; tossiemie e shock, per mastiti acute da coliformi, polmonite ab ingestis, peritoniti acute diffuse, metriti settiche tossiche; traumi della pelvi o degli arti posteriori; miopatie degenerative e sindrome della vacca a terra (Constable et al., 2017).

La diagnosi si basa sull'anamnesi, visita clinica, dove possibile sulle indagini collaterali e, soprattutto, sulla risposta al trattamento (Constable et al., 2017). Tale trattamento deve essere il più tempestivo possibile e si basa sulla somministrazione endovena (EV) di calcio

borogluconato e sulla somministrazione orale (OS) di Sali di calcio (Goff, 2008; Constable et al., 2017).

1.2.2 La sindrome della vacca a terra

Con l'espressione "Sindrome della vacca a terra" o "*Downer cows syndrome*", si indica una condizione che consiste in un decubito prolungato, per incapacità o rifiuto della bovina a rialzarsi (Stull et al., 2007). Fu introdotta, successivamente, una divisione in *alert downer cows*, o vacche a terra vigili, ed in *nonalert downer cows*, o vacche a terra non vigili. Le prime venivano identificate da uno stato mentale che rimaneva normale e non presentavano variazioni significative del DMI. Le seconde, invece, presentavano uno stato mentale depresso e/o anomali segni vitali, tra cui la frequenza cardiaca, la frequenza respiratoria e la temperatura rettale. Queste due categorie, tuttavia, non sono mutualmente esclusive, tale per cui una bovina *alert* può presentare uno stato che nel tempo viene ad essere compromesso, diventando una *nonalert*; viceversa, una *nonalert* può presentare nel tempo dei miglioramenti e divenire una *alert* (Burton et al., 2009). Inoltre, fu presentata un'altra categoria, ovvero la *creeper cows*, detta anche vacca rampicante o vacca seduta. La bovina *creeper* è un particolare tipo di *alert downer cows* ed è, quindi, incapace a mantenere la stazione, ma riesce comunque ad utilizzare gli arti anteriori al fine di spostarsi per brevi tratti (Constable et al., 2017). Tale sindrome si manifesta nell'allevamento delle bovine da latte con una maggiore frequenza nei primi due o tre giorni successivi al parto ed è spesso una complicazione del collasso puerperale (Poultron, 2014). La sua incidenza risulta essere tra 4.5 ed il 14% (Guyot et al., 2017).

I casi di bovine *alert* sono generalmente conseguenti a lesioni muscoloscheletriche o neurologiche, come lesioni del nervo sciatico e/o del nervo otturatorio che si possono realizzare al passaggio del feto durante il parto, fratture ossee, lussazioni articolari oppure traumi muscolari. Le bovine *nonalert*, invece, derivano generalmente da patologie sistemiche che possono alterare lo stato mentale e l'attitudine generale. Esempi sono l'ipocalcemia, la setticemia, lo shock ipovolemico, le peritoniti diffuse, le gravi lipidosi epatiche, le mastiti acute da coliformi, le metriti settiche, l'acidosi ruminale acuta e patologie neurologiche che coinvolgono il tronco encefalico o la corteccia cerebrale. Tra i casi di *downer cows*, il 22% è generalmente riconducibile a lesioni legate al parto, il 15% a traumi da caduta o scivolamento

(Constable et al., 2017) ed il 3.8-28.2% è conseguente all'ipocalcemia clinica, con una fatalità tra il 20 ed il 67% (Ménard and Thompson, 2007).

I fattori di rischio più importanti per questa patologie sono quelli ambientali ed i disordini metabolici. Tra i fattori ambientali ritroviamo errori di *management*, soprattutto, la presenza di una pavimentazione scivolosa in azienda. Per quanto riguarda i disordini metabolici, la causa primaria è la presenza di ipocalcemia. Questa condizione causa nello stadio due e tre un decubito persistente, ma aumenta anche il rischio di traumi ad ossa, articolazioni e/o muscoli in seguito a cadute o scivolamenti conseguenti ad un'andatura incerta. Un ulteriore fattore di rischio è rappresentato dallo sbilancio elettrolitico, in particolar modo dell'ipofosfatemia, ipokaliemia e ipomagnesemia. La prima è spesso riscontrata durante i decubiti e si associa particolarmente alle *creeper cows*. L'ipokaliemia, con valori inferiori a 2 mmol/L, causa stati di depressione e profonda debolezza muscolare che inducono il decubito. Inoltre, alcuni studi riportano una correlazione tra il BCS e lo sviluppo di tale sindrome; bovine con un BCS di almeno 4 presentano un rischio 4,3 volte maggiore (Constable et al., 2017). Infatti, le bovine ad alto BCS presentano una concentrazione di NEFA superiore a 0,7 mmol/L (Van Widen et al., 2003) sia all'inizio che al termine della lattazione. Tuttavia, non viene riportata un'alterazione statisticamente significativa del BHB, per cui non si ritiene che la chetosi faccia parte delle cause predisponenti tale sindrome (Guyot et al., 2017).

Tuttavia, sebbene le cause che determinano l'insorgere di tale sindrome siano numerose, il decubito protratto, qualunque sia l'origine, determina una compressione dei tessuti molli che esita in un danno neuromuscolare in meno di sei ore (Dirkens et al., 2004).

Il decubito prolungato determina un incremento di pressione in una o più aree, generalmente sui muscoli mediali della coscia, che possono danneggiare i muscoli, i nervi, le ossa o le articolazioni. Le lesioni di un'area specifica comportano quella che viene definita sindrome compartimentale, in cui l'incremento della pressione va ad occludere parzialmente o totalmente i vasi venosi, causando una congestione, ipossia e necrosi conseguente. Gli effetti sistemici di tale condizione prendono il nome di sindrome da schiacciamento e si caratterizzano dal rilascio in circolo dei prodotti di degradazione del tessuto muscolare. Tra questi possiamo riscontrare l'incremento delle creatinin-chinasi (CK) e delle aspartato amino-transferasi (AST), circa 12-24 ore dopo l'inizio del decubito; l'incremento del fosforo e del potassio, a causa del danno muscolare o dell'eccessiva disidratazione; la proteinuria e nei casi

più gravi la mioglobulinuria. Dal punto di vista necroscopico, i rinvenimenti che possiamo riscontrare sono: le emorragie e l'edema cutaneo in caso di traumi; emorragie e degenerazione muscolare, con necrosi ischemiche ed infiltrazione eosinofila; emorragie e degenerazione dei nervi; un cuore flaccido e dilatato con focolai di miocardite visibili istologicamente; lipidosi epatica; l'incremento di volume delle ghiandole surrenali e la degenerazione dei glomeruli e dell'epitelio tubulare del rene a causa della mioglobinuria. Il tempo massimo in cui un bovino può rimanere in decubito senza l'instaurarsi delle lesioni di tale sindrome è di circa 6 ore (Constable et al., 2017).

Le diagnosi differenziali delle bovine *alert* sono: l'ipocalcemia, la paralisi da parto, le fratture, le lussazioni dell'anca, l'ipokaliemia, il botulismo ed il linfosarcoma spinale. Le diagnosi differenziali delle bovine *nonalert*, invece, sono: l'ipocalcemia, la lipidosi epatica, la mastite acuta da coliformi, la metrite tossica, l'ipomagnesemia, lo shock ipovolemico, lo shock settico, la peritonite diffusa, l'acidosi ruminale acuta, la dislocazione dell'abomaso destra od il suo volvolo, l'ipokaliemia, la meningoencefalite e la polioencefalomalacia (Constable et al., 2017).

La diagnosi si basa sull'anamnesi e sulla visita clinica della bovina. Il trattamento si basa sul migliorare le condizioni della bovina fornendo una buona lettiera; il cambiamento di decubito periodico mediante rotolamento; la somministrazione di farmaci antinfiammatori o analgesici per il trattamento del dolore e dell'edema; la fluidoterapia qualora vi siano alterazioni elettrolitiche e, infine, fornire aiuto e supporto alle bovine che tentano di acquisire la stazione quadrupedale. Generalmente se la bovina è in decubito da meno di 24 ore il tasso di recupero è circa il 32%, ma se tale decubito perdura da un maggior tempo, allora il tasso di recupero scende a 8.2%. Bovine multipare e ad inizio lattazione tendono a riprendersi più facilmente in quanto è altamente probabile che la causa della sindrome sia l'ipocalcemia che può essere trattata. In generale, circa il 50% delle vacche a terra riprende la stazione quadrupedale in 4 giorni o meno se trattata adeguatamente (Constable et al., 2017).

1.2.3 La dislocazione dell'abomaso

La dislocazione dell'abomaso è una patologia che si caratterizza per lo spostamento dell'organo in una localizzazione anomala, nella porzione dorsale dell'addome, a causa della replezione causata dal gas (Dirkens, 1962). Tale dislocazione può realizzarsi a destra, con o senza volvo, oppure a sinistra, in circa 81.6% dei casi (Behluli et al., 2017). Il periodo

maggiormente a rischio per lo sviluppo di tale patologia è quello compreso tra il parto ed i seguenti primi 30 giorni (Constable et al., 1992), in cui si realizzano approssimativamente l'80% dei casi (Geishauser et al., 2000). La sua incidenza varia tipicamente tra il 3.5 ed il 5% (Behluli et al., 2017).

Esistono diversi fattori di rischio, tra i quali annoveriamo: l'età, si ha infatti un incremento dell'incidenza proporzionalmente all'aumentare di questa (Constable, 1992); la razza, bovine di razza Frisona, Jersey o Gernsey tendono ad essere più predisposte; la genetica (Constable et al., 2017); le patologie dell'unghione; la ritenzione di placenta (Geishauser et al., 2000); le endometriti; le mastiti; le gravidanze gemellari; l'alcalosi; l'ipocalcemia; il BCS elevato e la chetosi (Behluli et al., 2017). Bovine che nella prima settimana post-partum presentano una concentrazione di AST superiori o uguale a 1700 nkat/L; una concentrazione di BHB sierico superiore o uguale a 1200 $\mu\text{mol/L}$, o di 100 $\mu\text{mol/L}$ qualora si considerasse il secreto mammario, ed un rapporto grasso-proteine del latte superiore o uguale ad 1.4, presentano un maggiore rischio di sviluppare tale patologia pari, rispettivamente, a 3, 4 e 2 volte (Geishauser et al., 2000). Inoltre, la concentrazione di NEFA nel preparto superiore a 0,5 mEq/L, o superiori ad 1 mEq/L nel caso del postparto, presenta un incremento della dislocazione pari a 3.6 volte superiore rispetto ai soggetti sani (Le Blanc et al., 2005).

Per quanto riguarda la dislocazione dell'abomaso, bisogna ricercare, oltre ad una predisposizione individuale, anche altre cause. Prima di tutto è necessario considerare l'eventualità di una errata alimentazione durante il periodo di transizione (Jubb et al., 1991). Condizione particolare per il verificarsi di questa patologia, è che si crei un accumulo eccessivo di gas nell'organo a seguito di una sua ridotta motilità (Dirkens et al., 2004). D'altra parte, è noto che la somministrazione di diete con un'elevata percentuale di concentrati crea un'eccessiva produzione di acidi grassi volatili nel rumine, i quali, non assorbiti dalla parete ruminale, passano nell'abomaso (Van Widen et al., 2003; Behluli et al., 2017). Altro fattore importante, come abbiamo già ricordato, è l'ipocalcemia post-partum che riduce la motilità dell'organo. Per quanto riguarda la prevenzione di questo disturbo è importante il controllo dell'assunzione di alimento nel periodo di transizione che potrebbe, inoltre, portare ad una riduzione del volume ruminale (Behluli et al., 2017).

I segni clinici di dislocazione sinistra dell'abomaso includono: l'inappetenza; la ridotta produzione latte; il volume addominale ridotto; la riduzione o assenza della motilità

ruminale; l'auscultazione di un "ping" metallico nella fossa paralombare omolaterale; normali segni vitali e feci ridotte di volume e soffici. Nel caso di dislocazione destra dell'abomaso, in assenza di volvolo, invece, riscontriamo: anoressia; depressione; assenza di ruminazione; distensione addominale e "ping" metallico sul fianco destro. Se è contestualmente presente un volvolo, allora possono aggiungersi segni quali: dolorabilità addominale; tachicardia; assenza di defecazione; disidratazione e shock. Le diagnosi differenziali sono diverse, tra cui le indigestioni semplici e vagali, la chetosi primaria, la reticolo-peritonite traumatica, le ulcere dell'abomaso con dilatazione, il volvolo cieco-colico, la dilatazione del cieco e l'ostruzione intestinale. La diagnosi viene eseguita tramite la visita clinica o laparotomia. Il trattamento è chirurgico, con tecnica aperta o chiusa nel caso di dislocazione sinistra oppure, soltanto con tecnica aperta in caso di dislocazione destra (Constable et al., 2017).

1.2.4 La ritenzione placentare

Le membrane fetali sono fisiologicamente espulse entro le otto ore successive al parto. Quando, tuttavia, tali membrane permangono per un tempo superiore alle 12 ore, allora si può parlare di ritenzione placentare (Divers and Peek, 2007) e tale fenomeno costituisce un fallimento del terzo stadio del parto. L'incidenza di tale patologia può variare tra il 3 ed il 10 % (Scott et al., 2011).

La ritenzione placentare è causata da una mancata separazione tra i villi cotiledonari fetali e le caruncole materne. Il controllo fisiologico che stimola tale separazione inizia diverse settimane prima del parto e richiede la maturazione della placenta, il suo distacco intra-parto, conseguente alle contrazioni della muscolatura uterina, e la riduzione delle dimensioni delle caruncole uterine nel postparto (Scott et al., 2011). Esistono numerose cause che predispongono alla ritenzione degli involti fetali. Tra queste vengono incluse cause di natura meccanica, nutrizionali, manageriali e di natura infettiva (Tucho and Ahmed, 2017). I parti distocici, i possibili tagli cesarei, le torsioni uterine e gli aborti vengono annoverati tra le possibili cause meccaniche di ritenzione. Tra le cause nutrizionali, invece, abbiamo le carenze, durante la gravidanza, di proteine, vitamine, in particolar modo di vitamina A e vitamina E, ed i ridotti livelli di minerali, come selenio, iodio e calcio. Le cause manageriali includono la consanguineità all'interno dell'allevamento e l'eccessivo stato di nutrizione associato a

condizioni particolarmente stressanti per l'animale durante la gestazione (Joosten et al., 1991).

Inoltre, numerosi studi hanno evidenziato la minore attività dei neutrofili polimorfonucleati (PMN) come la causa predominante di ritenzione placentare (Kimura et al., 2002). La funzionalità dei PMN inizia a ridursi nel preparto, tra la terza e la quinta settimana antecedente ad esso, raggiunge il momento di minore funzionalità al momento del parto e nella settimana seguente e, infine, ritorna a valori fisiologici soltanto tra la seconda e la quarta settimana del postparto. La causa di tale cambiamento è da ricerca nella riduzione del DMI e nella conseguente mobilitazione dei lipidi. Infatti, si è osservato che l'elevata concentrazione di BHB riduce drasticamente la capacità dei neutrofili di sintetizzare radicali liberi dell'ossigeno (ROS) e, in questo modo, si va ad inibire la funzione immunitaria dei PMN (Hammon et al., 2006). Inoltre, concentrazioni di NEFA superiori a 0.3-0.5 mEq/L nel preparto (Qu et al., 2014) ed incrementi di colesterolo e acidi grassi di 0.1 mmol/L aumentano il rischio di ritenzione placentare. Ciò è un'ulteriore prova di come un eccessivo NEB nelle bovine in transizioni abbia delle ripercussioni negative (Quiroz-Rocha et al., 2009). Infatti, le bovine che presentano ritenzione placentare presentano anche una più alta incidenza di patologie metaboliche, mastiti e metriti. La riduzione delle resistenze immunitarie nelle bovine affette da ritenzione placentare, tuttavia, è soltanto parzialmente spiegata dalla disfunzione dei PMN conseguente alle condizioni del periodo di transizione. Ciò in quanto fenomeni di metriti acute, conseguenti a ritenzione placentare, favoriscono la deplezione di PMN presenti a livello ematico (Divers and Peek, 2007).

La conseguenza di tale condizione è una riduzione della produzione latte e della performance riproduttiva, con un incremento dell'intervallo parto-concepimento (Laven and Peters, 1996) ed una riduzione del tasso di concepimento al primo accoppiamento/fecondazione (Quiroz-Rocha et al., 2009).

La presentazione clinica è generalmente caratterizzata da una placenta che può anche presentarsi putrida e che fuoriesce dalla vulva. In alcuni casi, tuttavia, essa viene ritenuta all'interno della cervice e della vagina, per cui non è immediatamente visibile. Tuttavia, la sintomatologia potrebbe variare qualora si sviluppasse una metrite acuta predisposta dalla presenza di ritenzione placentare (Scott et al., 2011). La prima opzione di trattamento, nel caso la bovina non presenti altre alterazioni, è quella di non agire. Infatti, molte placente

ritenute tendono ad essere espulse naturalmente entro 3-12 giorni dal parto. La seconda opzione prevede una rimozione manuale, con l'accorgimento di non insistere in tale pratica a meno che non sia sufficiente una minima tensione (Divers and Peek, 2007). Tuttavia, si sconsiglia in generale la rimozione manuale in quanto potrebbe traumatizzare l'endometrio, favorendo l'assorbimento di tossine e riducendo la fagocitosi locale. Altri trattamenti a base di ossitocina, PGF2 α , sali di calcio ed estrogeni sono stati utilizzati nell'immediato post-partum, ma con limitato successo. Si consiglia, comunque, di monitorare la temperatura rettale in modo da evidenziare il possibile inizio di una metrite puerperale che potrebbe richiedere l'utilizzo di antibiotici (Scott et al., 2011).

1.2.5 Le metriti

Le metriti sono delle patologie che sono statisticamente correlate alla ritenzione di placenta. Infatti, bovine affette da tale patologia presentano un'incidenza significativamente più alta di metriti rispetto a bovine che non ne sono affette (Youngquist and Threlfall, 2007). Ciò in quanto la ritenzione di tessuti placentari in decomposizione fornisce un substrato favorevole per la proliferazione batterica (Dohme, 2005). La ritenzione placentare non è, tuttavia, l'unico fattore di rischio. Anche altre causa di danneggiamento uterino, come le distocie, le gravidanze gemellari, i nati morti, i vitelli incrociati con bovini da carne o i tagli cesarei, possono rappresentare un fattore di rischio. Oltre a questi non vanno dimenticati i possibili deficit igienici di stalla o lo stress metabolico. L'incidenza di tale patologia generalmente varia tra il 10 ed il 20 % (Sheldon and Owens, 2017).

Tale patologia è caratterizzata da una riduzione della produzione lattea, soprattutto nelle bovine pluripare, da una riduzione del DMI e da un'influenza negativa sulle performance riproduttive (Wittrocklk et al., 2011).

Il rischio di sviluppare metrite aumenta di circa 2.8 volte per ogni Kg di riduzione del DMI durante la settimana prima del parto (Huzzey et al., 2007). Infatti, il NEB deprime, fino ad annullare, la funzione immunitaria (Sheldon, 2011) a causa di una alterazione dei meccanismi di difesa della bovina durante il periodo di transizione, che esita in un elevata prevalenza di infezioni come metriti e mastiti (Esposito et al., 2014). Durante tale periodo si realizza un incremento delle richieste di ossigeno in contemporanea all'incremento delle richieste metaboliche, con il risultato di un aumento della produzione di ROS che potrebbe esporre la

bovina ad un incremento dello stress ossidativo (Sordillo and Aitken, 2009). Inoltre, elevate concentrazioni di NEFA aumentano il rischio di sviluppare patologie, in quanto altera le membrane plasmatiche delle principali cellule del sistema immunitario (Goff, 2006) con un incremento degli acidi grassi saturi a scapito degli acidi grassi polinsaturi, diminuendo in tal modo la funzionalità delle cellule immunitarie (Contreras et al., 2010). Oltre a ciò, un'elevata concentrazione di NEFA riduce anche la secrezione di immunoglobuline e l'attività delle cellule linfocitarie, generando in tal modo uno stato di immunosoppressione con un maggior rischio di sviluppare patologie batteriche (Lacetera et al. 2002). Di conseguenza possiamo affermare che il livello di stress metabolico può compromettere la capacità dell'organismo di rispondere agli agenti patogeni, aumentando il rischio di infezioni persistenti ed infiammazioni croniche (Turner et al., 2016).

La presenza di batteri patogeni a livello uterino causa delle lesioni istologiche, ritardi della sua involuzione, riduce la sopravvivenza embrionale e, i prodotti batterici o l'infiammazione ad essi associata, altera il rilascio di LH, inibendo e perturbando la crescita e la funzione ovarica (Sheldon et al., 2006).

Normalmente la vulva, la vagina e la cervice costituiscono delle barriere anatomiche contro le infezioni ascendenti. Tuttavia, ciò viene ad essere alterato con il parto. Tra i patogeni principalmente associati alle infezioni uterine del post-partum abbiamo *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum* e *Bacteroides*. Il riconoscimento dei batteri da parte del sistema immunitario innato genera un'importante risposta infiammatoria (Sheldon and Owens, 2017), in cui dei segnali molecolari, costituiti principalmente da prostaglandine e citochine, vengono rilasciati dalle cellule del sistema immunitario (Esposito et al., 2014).

Le diagnosi differenziali di metrite puerperale includono: la mastite tossica; la salmonellosi; la rottura dell'utero; l'acidosi; la peritonite; la ritenzione intrauterina di un gemello; l'ipocalcemia; la lipidosi epatica e la dislocazione o torsione dell'abomaso. Per quanto riguarda, invece, le diagnosi differenziali delle endometriti cliniche, possiamo indicare la pielonefrite e la vaginite. La diagnosi viene eseguita tramite l'anamnesi, la visita clinica e ginecologica e l'esame ecografico. Il trattamento prevede l'utilizzo di PGF2a, qualora vi sia un corpo luteo, al fine di incentivare un'adeguata risposta immunitaria grazie al calo del progesterone; la somministrazione di antibiotici in seguito a diagnosi eziologica e

antibiogramma, come previsto della linee guida per l'antimicrobico-resistenza da parte del Ministero della Salute. L'antibiotico tendenzialmente più utilizzato è l'ossitetraciclina con una prima somministrazione per via EV, seguita da un trattamento intramuscolare (IM) ed associata a terapia antinfiammatoria. Spesso sono stati utilizzati dei pessari intrauterini contenenti antibiotici, ma la cui utilità è tuttavia dubbia. Ciò a causa del fatto che potrebbero non raggiungere una concentrazione sufficiente al trattamento e potrebbero non essere efficaci in ambiente anaerobio. Un'alternativa potrebbe essere fornita da infusioni intrauterine di antibiotici. È, inoltre, consigliabile associare la terapia a dei lavaggi uterini con soluzione fisiologica al fine di rimuovere i detriti cellulari e batterici (Scott et al., 2011).

1.2.6 La lipidosi epatica

I lipidi sono trasportati a livello epatico dal tessuto adiposo sotto forma di acidi grassi. All'interno degli epatociti questi possono essere ossidati, per la produzione di energia, o possono essere esterificati in trigliceridi, oppure possono essere convertiti in colesterolo o in fosfolipidi. L'accumulo di tali acidi grassi nel fegato prende il nome di lipidosi o steatosi e si realizza quando la quantità di acidi grassi nel fegato eccede il tasso di degradazione metabolica di questi. La lipidosi non risulta essere una malattia specifica, ma tende a realizzarsi in seguito ad una grande varietà di alterazioni del normale metabolismo lipidico (Zachary, 2016).

Nel periodo di transizione si realizza un incremento delle richieste energetiche da parte della bovina, in particolare da parte della ghiandola mammaria. Ciò porta ad una deficienza energetica con un incremento della lipomobilizzazione (Fiore et al., 2015). Tale condizione è particolarmente importante in bovine con un elevato BCS, superiore o uguale a 4 in una scala da 1 a 5 (Scott et al., 2011). L'eccessiva mobilizzazione di acidi grassi, che arriveranno a livello epatico, porta allo sviluppo di lipidosi epatica (Karcagi et al., 2008). Tale condizione si realizza più frequentemente nelle prime 4 settimane del post-partum (Bobe et al., 2004) e può colpire approssimativamente tra il 40 ed il 60% delle bovine ad alta produzione (Starke et al., 2011).

I lipidi in eccesso vengono stoccati a livello epatico sotto forma di triacilglicerolo ed in base al contenuto epatico possiamo differenziare il fegato in: fisiologico, con meno dell'1% di lipidi; lievemente alterato, con una concentrazione lipidica tra l'1 ed il 5 %; moderatamente alterato, con una concentrazione lipidica tra il 5 ed il 10% e, infine, gravemente alterato, con più del 10% di lipidi (Bobe et al., 2004). Tuttavia, le bovine ad alta produzione tendono ad avere in

generale meno del 5% di lipidi nel fegato e, nell'immediato periparto, possono avere fino al 20% di lipidi (Scott et al., 2011). Inizialmente la deposizione di lipidi in corso di lipidosi si realizza nella regione centrolobulare, per poi, nei casi più gravi, diffondersi e coinvolgere l'intero parenchima. Ciò esita in un considerevole aumento di volume, con larga parte degli epatociti occupata da vacuoli lipidici (Holtenius and Traven, 1990). La capsula fibrosa che avvolge in parte il fegato presenta una limitata capacità di espansione determinando un conseguente aumento della pressione epatica e compressione dei vasi. Ciò può portare ad un'alterazione della microcircolazione con una riduzione del flusso ematico epatico e portale, un conseguente incremento della pressione della vena porta, ed un incremento del rischio di ischemia. Tale disturbo di perfusione può essere una causa di successiva alterazione della funzionalità epatica (Starke et al., 2011). Inoltre, gli acidi grassi fungono da ligandi endogeni del *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPARα), incrementando la trascrizione di geni gluconeogenici, come il fosfoenolpiruvato carbossichinasi (PEPCK) ed il glucosio-6-fosfatasi (G6Pase), geni chetogenici, come l'idrossi-3-metilglutaril-CoA sintetasi 2 (HMGCS2), e geni beta ossidativi, come la carnitina palmitotrasferasi 1 (CPT1) (Geisler and Renquist, 2017).

Pertanto, tanto più grave e prolungato sarà il NEB in cui la bovina si trova, tanto maggiore potrebbe essere l'interferenza con la funzionalità epatica e l'esacerbazione dei problemi energetici e metabolici, portando alla *fatty cow syndrome* (Scott et al., 2011). Le patologie che avvengono più comunemente nell'immediato postparto e che predispongono la bovina all'infiltrazione lipidica includono la chetosi, la dislocazione dell'abomaso a sinistra, la mastite, la ritenzione degli invogli fetali, l'ipocalcemia e la sindrome della vacca a terra (Bobe et al., 2004).

I segni clinici della *fatty cow syndrome* sono l'anoressia, l'atonia ruminale, la letargia, la chetonuria e la debolezza (Constable et al., 2017). In diagnosi differenziale poniamo l'ipocalcemia, l'acetonemia, la tossiemia e l'acidosi ruminale sub-acuta. La diagnosi si basa sull'anamnesi, la visita clinica e l'esame ecografico con biopsia eco-guidata. Inoltre, all'emato-biochimico possiamo riscontrare leucopenia, con meno di 3 miliardi di cellule bianche per litro, ed un incremento degli enzimi epatici e della bilirubina. All'esame necroscopico si può evidenziare un'infiltrazione lipidica dei reni e del cuore (Scott et al., 2011), ma soprattutto si evidenzia un incremento delle dimensioni e del peso del fegato, con margini arrotondati, colorazione giallastra e consistenza friabile (Zachary, 2016). Il trattamento prevede la

fluidoterapia, integrata ad un bolo EV di glucosio, e la somministrazione per OS di glicol propilene (Constable et al., 2017).

1.2.7 La chetosi

La chetosi è una patologia metabolica della bovina da latte che si caratterizza per l'incremento dei corpi chetonici (BHB, acetoacetato ed acetone) primariamente nel sangue e, successivamente, anche nelle urine e nel latte (Zhang et al., 2016). È una patologia comune nel post-partum di bovine ad alta produzione, con un maggior rischio durante la quarta lattazione rispetto alla prima ed il 90% dei casi si realizza durante i primi 60 giorni di lattazione. L'incidenza di tale patologia è aumentata negli anni a causa dell'incremento della produzione latte della bovina ed è di circa 0.2-10 % se si considera la forma clinica (Constable et al., 2017). Se, invece, consideriamo la forma subclinica, l'incidenza è normalmente del 40%, ma può arrivare anche all'80% della mandria (McArt et al., 2013).

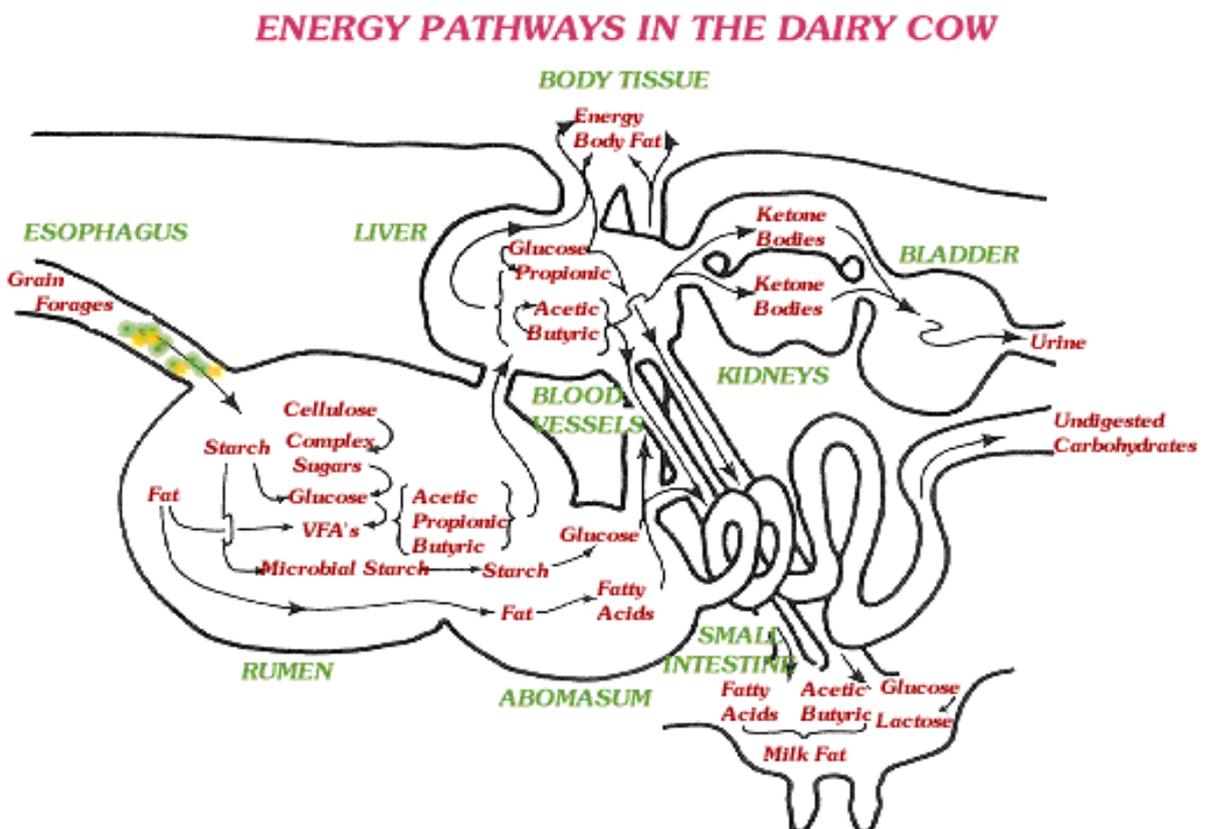


Figura 2: Metabolismo energetico della bovina da latte. Fonte: Di Ciommo, XXI ciclo

I corpi chetonici possono derivare da due fonti, il rumine o il fegato. A livello ruminale, infatti, l'epitelio converte il butirrato, prodotto dalle fermentazioni, in BHB che verrà assorbito. La mobilizzazione delle riserve corporee conseguente al NEB, invece, porta ad un incremento di

NEFA ematici che vengono metabolizzati a livello epatico in Acetyl-CoA. Tale metabolita può seguire due vie, o essere ossidato nel ciclo dell'acido tricarbossilico oppure essere metabolizzato in Acetoacetil-CoA, da cui derivano l'acetoacetato ed il BHB. Inoltre, l'acetoacetato può spontaneamente convertirsi in acetone, che è volatile. Questo 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 et al., 2017). Inoltre, in condizioni di ipoglicemia, come durante il periodo di transizione, l'ossalacetato, necessario per l'ossidazione dell'Acetyl-CoA nel ciclo dell'acido tricarbossilico, viene utilizzato come substrato per la gluconeogenesi, tale per cui si favorisce la metabolizzazione dell'Acetyl-CoA con un'ulteriore incremento dei corpi chetonici (McPherson and McEneny, 2012).

I corpi chetonici possono essere utilizzati come fonti energetiche in molti tessuti, tra cui l'encefalo, il cuore, il rene ed il muscolo scheletrico. Una loro concentrazione elevata porta ad un decremento della degradazione proteica per la gluconeogenesi (Zarrin et al., 2017). Inoltre, possono anche inibire la lipolisi e sostituire, in un certo grado, l'insulina. Perciò, i corpi chetonici hanno importanti funzioni, sia come substrati in grado di sostituire il glucosio in molti tessuti, compreso il sistema immunitario, sia come messaggeri nella regolazione del metabolismo energetico (Zarrin et al., 2014).

In base all'eziologia possiamo differenziare cinque tipologie diverse di chetosi:

- la chetosi primaria si manifesta in bovine che vanno incontro ad un importante NEB, in quanto presentano un elevato potenziale di produzione o perché arrivano al parto con un eccessivo BCS;
- la chetosi secondaria si manifesta in bovine come conseguenza di una riduzione del DMI a causa di altre patologie, come le dislocazioni dell'abomaso, le reticoliti traumatiche, le metriti o le mastiti. Può realizzarsi anche in seguito ad una contaminazione della razione con lincomicina (bastano 9.5 ppm) in quanto causa una disfunzione ruminale;
- la chetosi alimentare si manifesta in bovine che sono alimentate con insilati in cui è presente un'elevata concentrazione di butirrato, che potrebbe comportare un aumento della produzione di corpi chetonici a livello ruminale, ma potrebbe anche ridurre il DMI per una bassa appetibilità dell'alimento;

- la chetosi da fame si manifesta in bovine che presentano un carente BCS e a cui viene somministrato un alimento di bassa qualità, per cui si realizza una carenza di propionato e proteine che limita la capacità della gluconeogenesi;
- la chetosi da carenze alimentari specifiche si manifesta in bovine che presentano una carenza di cobalto, e possibilmente anche fosforo, in quanto influenza negativamente la metabolizzazione dell'acido propionico.

Altri possibili fattori di rischio sono forniti da una minima predisposizione ereditaria, dalla frequenza e dalla modalità di somministrazione dell'alimento, dalla stagione, dall'eccessiva lunghezza dell'asciutta e dalle gravidanze gemellari (Constable et al., 2017)

La chetosi primaria e secondaria possono manifestarsi con quadri subclinici o clinici (Herdt, 2000). Il quadro clinico è costituito prevalentemente dalla chetosi digestiva, ma viene riportata anche la chetosi nervosa. La chetosi digestiva, definita anche *wasting*, si manifesta con una bovina riluttante al movimento; con dolorabilità addominale; con una depressione del sensorio (Constable et al., 2017); con una riduzione del DMI ed un appetito capriccioso; con una riduzione della motilità ruminale; con stipsi e feci ipercromiche seguite da fasi diarroiche (Fox, 1971). Nella chetosi nervosa, invece, la bovina può presentare stati di depressione del sensorio intervallati a momenti di eccessiva eccitazione. I sintomi nervosi che si possono riscontrare sono scialorrea, masticazione a vuoto, leccamento di oggetti o parti del corpo (Dirkens et al., 2004) e, camminare in circolo e/o senza motivazione apparente (Constable et al., 2017). In entrambi i casi si può evidenziare un respiro acetoneo o dolciastro (Dirkens et al., 2004).

La forma subclinica, definita semplicemente anche iperchetonemia, è tale in quanto non è accompagnata da segni clinicamente evidenziabili. Si associa, però, ad una riduzione della fertilità e della produzione latte, tra l'1 ed il 9 %. Misurando la glicemia, questa si presenta ridotta con un valore compreso tra i 20 ed i 40 mg/dl, quando fisiologicamente presenta un valore compreso tra i 50 ed i 65 mg/dl (Constable et al., 2017). Per quanto riguarda la valutazione dei corpi chetonici ematici si prende in considerazione il BHB, in quanto più stabile sia su plasma che su siero rispetto all'acetoacetato, e tramite la sua concentrazione si realizza la classificazione dello stato della chetonemia della bovina (Duffield, 2000). In bovine subcliniche il BHB presenta dei valori superiori a 1.00 mmol/L, a differenza della forma clinica in cui raggiunge valori superiori a 2.5 mmol/L e raramente raggiunge valori di 10 mmol/L.

Tuttavia, bisogna sempre considerare che se la bovina non è alimentata ad libitum, ma due volte al giorno, il BHB presenta delle variazioni diurne di concentrazione. Il suo picco di concentrazione ematica si realizza circa 4 ore dopo la somministrazione dell'alimentazione e presenta dei valori superiori al mattino rispetto al pomeriggio (Constable et al., 2017). Nel tempo si è inoltre evidenziata la stretta relazione che sussiste tra corpi chetonici ematici e i corpi chetonici nel latte, attraverso cui si può avere un'indicazione di chetosi subclinica con valori di BHB superiori a 100 $\mu\text{mol/L}$ e con valori di acetone superiori a 250 $\mu\text{mol/L}$ (Geishauser et al., 2001). A livello ematico si può notare, inoltre, anche l'incremento degli enzimi epatici, della bilirubina e dei NEFA (Constable et al., 2017).

Le diagnosi differenziali della chetosi digestiva sono la dislocazione dell'abomaso, la reticolite traumatica, l'indigestione primaria, la cistite e la pielonefrite. Per la chetosi nervosa le diagnosi differenziali sono la rabbia, l'ipomagnesemia e l'encefalopatia spongiforme bovina (BSE). La diagnosi viene eseguita tramite l'anamnesi, visita clinica e misurazione dei corpi chetonici. Il trattamento prevede la somministrazione EV di glucosio e la somministrazione per OS di precursori del glucosio, come il glicol propilene (Constable et al., 2017).

1.3 La Metabolomica

1.3.1 Le Scienze 'Omiche'

Le scienze 'omiche' sono un gruppo di scienze sviluppatesi nell'ultimo ventennio che permettono di ottenere diversi tipi informazioni.

La prima a nascere tra queste scienze è la Genomica con l'obiettivo di sequenziare tutti i geni e le informazioni in essi contenuti. Dal 1995 sono stati condotti diverse centinaia di studi genomici che hanno interessato più Regni della tassonomia biologica. In seguito, si è potuto assistere alla rapida espansione di numerose altre discipline. La Trascrittomica è lo studio delle informazioni relative ai trascritti di RNA in un campione biologico, per quantificare l'espressione genica (Joyce and Palsson, 2006).

L'obiettivo della Proteomica, invece, è quello di identificare e quantificare, a livello cellulare, ogni proteina che è codificata dal genoma. Le principali metodiche di analisi di cui si avvale sono l'elettroforesi su gel e la spettrometria di massa. Associate alla proteomica, vi sono la *Localizomics* e le *Interactome*. La prima vuole identificare la sub-localizzazione cellulare di tutte le proteine e può fornire delle chiavi di lettura sulla funzione di queste, la seconda, invece, può o studiare le interazioni tra le proteine, per comprenderne struttura e funzioni, o le interazioni tra le proteine ed il DNA, per studiare il legame tra i fattori di trascrizione ed i promotori al fine di comprendere come la cellula stessa possa modificare il proprio stato trascrizionale in risposta all'ambiente ed ai segnali extracellulari, intracellulari ed intercellulari (Joyce and Palsson, 2006). Infatti, il dogma della biologia molecolare, ovvero il flusso unidirezionale di informazioni dai geni ai trascritti ed alle proteine, non è più vero ed i processi cellulari sono, in realtà, intimamente legati da azioni retroattive (Hollywood et al., 2006).

Tuttavia, anche in combinazione, la genomica e la proteomica non riescono a fornire informazioni complete per una comprensione delle funzioni cellulari in un sistema vivente (Nicholson et al., 1999).

La Metabolomica è una nuova scienza 'omica' (Zhang et al., 2017) che è stata proposta con l'obiettivo di potenziare ed integrare le informazioni fornite dalla risposta genetica e proteica (Nicholson et al., 1999). Essa identifica metaboliti a basso peso molecolare (Thirumalaisamy et al., 2016), tipicamente inferiori a 1000 Da (Kirwan, 2014), ed i loro intermedi (Thirumalaisamy et al., 2016) presenti in cellule, tessuti od organismi (Jones and Cheung, 2007). Un metabolita è o un composto endogeno, come il glucosio, gli aminoacidi e gli acidi

grassi, o un composto esogeno, come prodotti farmaceutici o derivati dell'alimentazione (Kirwan, 2014). Essi rappresentano i prodotti finali di processi cellulari, per cui possono essere considerati come l'ultima risposta dei sistemi biologici ai cambiamenti ambientali o genetici (Fiehn, 2002). Diversamente dai geni e dalle proteine sono conservati tra le specie (Jones and Cheung, 2007) e sono un vero legame diretto con il fenotipo dell'organismo (Kirwan, 2014). La Metabonomica, invece, comprende l'esecuzione di un profilo sistematico, completo e simultaneo di più livelli di metaboliti ed i loro cambiamenti sistematici e temporali causati da fattori quali la dieta, lo stile di vita, l'ambiente, gli effetti genetici ed i trattamenti farmaceutici (Nicholson et al., 2007).

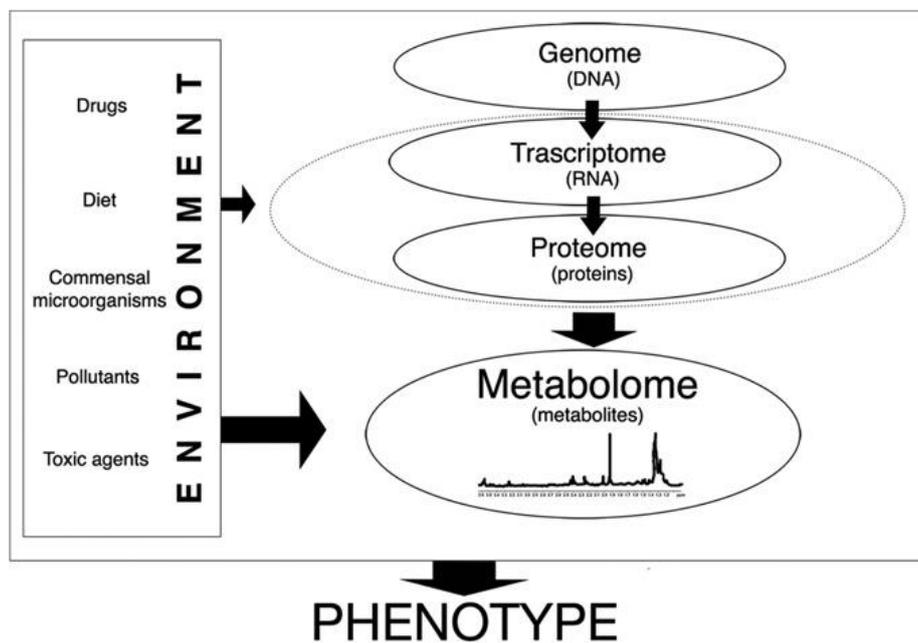


Figura 3: Le scienze 'omiche' e la loro relazione con l'ambiente ed il fenotipo. Fonte: Carraro et al., 2009.

Ogni tessuto o fluido corporeo, come il plasma, l'urina, la saliva, il liquido cerebrospinale ed altri, possono essere analizzati con la metabolomica. Tuttavia, ogni campione fornirà un aspetto diverso del metabolismo. Infatti, il tipo di campione analizzato determinerà il momento in cui un evento metabolico viene misurato. Ad esempio, con la biopsia cellulare rifletteremo dei cambiamenti più immediati rispetto a dei campioni di urina. Inoltre, un numero diverso di fattori, quali l'età, la razza, il sesso, la dieta, i trattamenti e lo stato ormonale, possono avere un effetto confondente sullo studio di metabolomica (Kirwan, 2014). Per affrontare al meglio il problema, è infatti consigliabile l'esecuzione di un primo approccio in un ambiente semplificato (Zhu, 2018).

1.3.2 Le Tecniche analitiche e l'analisi dei dati

Quando eseguiamo un'analisi metabolomica possiamo ottenere due diversi esiti: un Metabolic Fingerprint od un Metabolic Profiling. Il primo deriva dai risultati di un'analisi cromatografica o spettrometrica che rifletteranno i cambiamenti della concentrazione dei metaboliti senza identificare esattamente quali di essi siano cambiati. Il secondo, invece, è una lista completa e quantitativa dei metaboliti presenti e che possono essere ricondotti a specifiche vie metaboliche (Robertson et al., 2007).

Esistono diverse tecnologie specialistiche che possono essere utilizzate per eseguire questi studi, tuttavia, data la grande variabilità delle proprietà, chimiche e fisiche, dei metaboliti e la variabilità delle loro concentrazioni nel campione, non esiste una singola tecnologia che è veramente in grado di eseguire un'analisi globale del campione. Per questo motivo, la tecnologia analitica che verrà scelta dovrà dipendere dall'obiettivo dello studio (Kirwan, 2014) o dovranno essere applicate più tecnologie e più preparazioni dei campioni al fine di ottenere un'analisi completa (Jones and Cheung, 2007).

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) è lo strumento metabolico originale (Kirwan, 2014) che lavora sull'applicazione di campi magnetici ed onde radiofrequenti sui nuclei degli atomi. I nuclei più comunemente utilizzati sono quelli che presentano un numero quantico di spin di $\frac{1}{2}$ come ^1H , ^{31}P , ^{13}C e ^{19}F (Jones and Cheung, 2007). In particolare, la spettroscopia H-NMR rileva quei metaboliti che contengono atomi di idrogeno (Robertson et al., 2007). Le informazioni ottenute sono, dunque, relative alla quantità ed alla struttura della molecola interessata (Kirwan, 2014). Tuttavia, l'esito può essere influenzato da fattori quali il pH (Zhu, 2018), che dunque rappresenta una limitazione a tali studi (Robertson et al., 2007). La spettroscopia NMR ha diversi vantaggi, infatti richiede minime preparazioni dei campioni, fornisce informazioni robuste, permette la misurazione simultanea di più metaboliti ed è una tecnica non distruttiva che permette la riproducibilità del test (Jones and Cheung, 2007). La riproducibilità dovrebbe essere anche intesa come la possibilità di ripetere le analisi in diversi laboratori, permettendo la comparazione dei dati acquisiti in un range temporale di mesi o anche anni (Robertson et al., 2007). Il principale svantaggio è che, se paragonato ad altre tecniche, risulta essere meno sensibile, per cui i metaboliti che sono presenti in basse concentrazioni potrebbero non essere individuati e richiedere, pertanto, grandi numeri di campioni (Kirwan, 2014). Fortunatamente, l'uso combinato con altre tecniche, come con la

cromatografia liquida (LC-NMR) al fine di separare le alte e le basse concentrazioni dei metaboliti prima dell'analisi con lo spettroscopio, permette di aumentarne la sensibilità (Jones and Cheung, 2007).

La spettrometria di massa (MS) è un'altra possibile tecnica analitica non invasiva e più sensibile della NMR (Jones and Cheung, 2007), che infatti può identificare metaboliti presenti in concentrazioni al di sotto dei picomolari. Tuttavia, non è in grado di dare le stesse informazioni strutturali della NMR (Kirwan, 2014). Anche questa può essere combinata ad altre tecniche analitiche come con la gas cromatografia (GC-MS) o come con la cromatografia liquida (LC-MS). La prima presenta il vantaggio che metaboliti a basso peso molecolare nella fase gassosa possono già essere campionati e direttamente analizzati, con il risultato di un'aumentata sensibilità e identificazione dei composti. Tuttavia, metaboliti termicamente stabili o quelli che possono presentarsi tali dopo la derivatizzazione chimica, possono aumentare i successivi tempi di preelaborazione ed analisi. La seconda tecnica è simile alla prima, ma presenta una fase liquida anziché gassosa (Jones and Cheung, 2007).

Altre tecniche analitiche utilizzabili includono la spettroscopia infrarossa con trasformazione di Fourier e Raman (Robertson et al., 2007), l'elettroforesi capillare (CE) (Kirwan, 2014) e la spettroscopia di massa a risonanza ciclotronica ionica con trasformazione di Fourier (Jones and Cheung, 2007).

Una volta ottenuti i dati, spesso questi richiedono delle forme di preelaborazione al fine di essere convertiti in dati utilizzabili per l'analisi statistica. Esempi di preelaborazione includono l'allineamento dei picchi tra i campioni, la normalizzazione e la trasformazione dei dati. Successivamente, per l'analisi statistica si possono usare delle tecniche univariate o multivariate. Le prime, tuttavia, non sempre riescono a comprendere le relazioni tra le variabili e si rischia di avere dei risultati falsamente positivi dovuti soltanto al numero di variabili. Per questo motivo vengono generalmente usate le analisi multivariate, progettate per analizzare dei dati con un gran numero di variabili. Le analisi multivariate possono essere suddivise, a loro volta, in due categorie: senza supervisione e con supervisione. Tra le analisi senza supervisione, quella principalmente utilizzata è l'analisi dei principali componenti (PCA) e sono analisi statisticamente più robuste. Tra le analisi con supervisione, quella principalmente utilizzata è la regressione parziale con minimi quadrati (PLS). Esse tendono a dare una migliore classificazione dei campioni, ma tendono al sovradimensionamento e per tale motivo i dati

dovrebbero essere adeguatamente validati prima che il loro risultato venga accettato (Kirwan, 2014).

1.3.3 Le Applicazioni della Metabolomica

Ci sono diversi ambiti di potenziale applicazione per la metabolomica e questi possono essere generalmente suddivisi in quattro categorie. La prima è l'ottimizzazione della salute in ambito nutrizionale ed ambientale (Kirwan, 2014). Infatti, la metabolomica può essere applicata agli studi di botanica, nutrizione (Jones and Cheung, 2007) e sicurezza alimentare (Zhu, 2018).

Un secondo ambito è lo sviluppo farmaceutico (Kirwan, 2014). Infatti, può essere utilizzata nello sviluppo e nello studio dei farmaci, nella valutazione dei loro effetti tossici (Nicholson and Wilson, 2003; Jones and Cheung, 2007; Thirumalaisamy et al., 2016), e nel tempo potrebbe permettere di ridurre e/o rimpiazzare i modelli animali per l'identificazione dei marker tossici durante gli studi farmacologici. Potrebbe, inoltre, aiutare a identificare i pazienti che potrebbero rispondere a determinati trattamenti farmacologici, creando dunque una nuova era di medicine personalizzate (Kirwan, 2014).

Un terzo ambito di applicazione è lo studio, la diagnosi e la prognosi delle patologie (Kirwan, 2014), offrendo nuove possibilità di identificazione delle cause e del trattamento di queste (Nicholson and Wilson, 2003). Infatti, alcune patologie, come il cancro, la meningite, i disordini neurologici, la celiachia e le patologie cardiovascolari, sono sotto studio (Calabrò et al., 2014). Ciò è reso possibile dal fatto che alcuni studi metabolomici si basano sull'indagine di sistemi biologici perturbati da malattie o trattamenti e sulla loro comparazione a sistemi, invece, non perturbati (Madsen et al., 2010). In questo modo è possibile delucidare le informazioni inerenti ai meccanismi delle patologie (Zhu, 2018) e dei loro effetti biochimici (Jones & Cheung, 2007), sviluppando dei biomarkers per identificare, caratterizzare, monitorare e prevedere le patologie (Zhang et al., 2017) e dove per biomarkers si intendono caratteristiche oggettivamente misurabili al fine di indicare normali processi biologici, processi patologici o risposte farmacologiche ad interventi terapeutici (McIlwraith et al., 2018). Ciò è importante in quanto spesso alcune patologie vengono diagnosticate in stadi avanzati a causa della mancanza di sintomi specifici. Questo rende spesso le metodiche diagnostiche più invasive, così come i trattamenti. Mentre una diagnosi precoce potrebbe aumentarne il tasso di sopravvivenza (Thirumalaisamy et al., 2016).

Infine, un quarto ambito di applicazione è il benessere animale. Questo viene già migliorato dalla conoscenza delle patologie e dei loro trattamenti (Kirwan, 2014), ma viene ulteriormente incrementato dalla riduzione del bisogno di animali sottoposti ad eutanasia durante le ricerche farmaceutiche, contribuendo ad implementare le 3R (Jones and Cheung, 2007).

1.3.4 L'Analisi Metabolomica dei biofluidi nel periodo di transizione

La metabolomica potrebbe essere utilizzata nelle bovine in transizione come mezzo di screening, attraverso la determinazione di biomarkers, al fine di prevedere in prossimità del parto o nella prima fase di lattazione il possibile sviluppo di patologie (Ametaj, 2015) e, potenzialmente, potrebbe permettere la differenziazione tra la forma clinica e quella subclinica (Constable et al., 2017). Inoltre, offrirebbe un profilo metabolico completo utilizzando minime quantità di campione (Xu et al., 2016).

Per fare ciò, tuttavia, si rende necessaria la conoscenza dei biomarkers tramite un'analisi completa delle variabili del campione, ovvero attraverso lo studio dei profili metabolici prima, durante e dopo la diagnosi delle patologie (Zhang et al., 2017). Tale approccio offrirebbe una visione completa di come la bovina reagisca allo stress metabolico presente nella fase di transizione, permettendo di comprendere un momento così complesso e variegato (Basoglu et al., 2020).

Le tecniche principalmente utilizzate sono la NMR, la GC-MS e la LC-MS (Zhang et al., 2013; Shahzad, 2017). I biofluidi più comunemente utilizzati sono il latte, il plasma, il siero ed il liquido ruminale (Goldansaz et al., 2017), i quali sono già stati utilizzati per approfondire la conoscenza dei metaboliti in corso di chetosi, *milk fever*, lipidosi epatica, dislocazioni dell'abomaso, malattia di Johne, mastiti ed acidosi ruminale subacuta ed acuta (Ametaj, 2015). Tra questi biofluidi, quelli in cui sono stati identificati il maggior numero di metaboliti sono il latte, il plasma ed il siero, che costituiscono anche i più comuni campioni utilizzati dalla metabolomica per le indagini delle patologie che colpiscono il bovino. Ciò in quanto sono dei campioni facili da raccogliere e che minimizzano i problemi legati al benessere animale. Inoltre, il plasma ed il siero sono potenzialmente utili in quanto possono procurare metaboliti da tutti gli organi del corpo (Goldansaz et al., 2017), associandoli a diverse patologie metaboliche (Wang et al., 2016).

1.4 Il progetto di ricerca e gli obiettivi di questo studio

Tale studio è collocato all'interno del progetto di ricerca "*BOVINE OMICS - Lo sviluppo tecnologico delle scienze 'omiche' (metabolomica e metagenomica) per lo studio delle principali patologie dell'allevamento bovino: dalla diagnostica all'applicazione clinica*", finanziato da fondi di ricerca BIRD 2019 dell'ateneo di Padova.

Lo scopo principale di questo studio è stato quello di valutare il siero di bovine in chetosi subclinica, o in iperchetonemia, e sane, applicando l'analisi metabolomica mediante l'utilizzo della spettrometria di risonanza magnetica protonica ($^1\text{H-NMR}$) ad alta risoluzione.

Partendo da tali premesse, gli obiettivi che si è posto questo studio sono stati:

- Verificare l'applicabilità della metodica all'analisi del siero della bovina da latte;
- Caratterizzare il metaboloma di campioni sierologici di bovine sane ed in chetosi subclinica;
- Individuare le eventuali differenze metaboliche effettuando un'analisi comparata tra i campioni analizzati;
- Rendere questo tipo di analisi utilizzabile in ambito clinico valutando se i metaboliti associati alla chetosi svolgono un ruolo di potenziali biomarkers predittivi di diagnosi precoce.

Tale metodica potrebbe configurarsi come valido aiuto per il medico veterinario aziendale, non solo per una migliore comprensione delle malattie metaboliche del periodo di transizione, ma anche per una puntuale e tempestiva diagnosi differenziale, determinando un miglioramento del benessere animale e della gestione della mandria da parte dell'allevatore.

2. Materiali e Metodi

2.1 Aziende ed animali

Per tale studio sono state campionate 49 bovine di razza Frisona nell'immediato postparto. Le bovine si trovavano nella regione Veneto in un allevamento intensivo a stabulazione libera, con cuccette dotate di materassino. I capi in lattazione erano suddivisi in due gruppi in base all'ordine di parto, ovvero in primipare e pluripare. La durata dell'asciutta prevedeva un periodo di due mesi e non si adoperava lo streaming-up. L'alimentazione era costituita da un *unifeed*, le cui caratteristiche sono riportate in Tabella 1. Per ogni capo sono stati valutati: lo stato di salute generale, l'ordine di parto o *parity*, i *day in milk* (DIM) ed Kg di latte/giorno. Le bovine selezionate per lo studio erano sia primipare che pluripare, in un buono stato di salute generale, con un DIM di 26,5 giorni ed una produzione di latte giornaliera di circa 29,5 Kg.

Tabella 1: Composizione chimica del TMR (total mixed ration) delle bovine in lattazione ed in asciutta.

Composizione chimica	Lattazione %SS
UFL	0,96
CP	15,20
PD	12,11
PDIN	11,19
PDIE	11,32
PDIA	5,49
NDF	31,35
ADF	18,84
ADL	2,72
EE	4,60
ASH	7,35
ST	24,60
NSC	41,37
Ca	0,80
P	0,40

Legenda: UFL: unità foraggiera latte; CP: proteina grezza; PD: proteina digeribile; PDIN: proteina digeribile nell'intestino quando non vi è disponibilità di nitrogeno per le fermentazioni ruminali; PDIE: proteine digerite nel piccolo intestino quando l'energia per le fermentazioni ruminali è limitata; PDIA: aminoacidi assorbiti nell'intestino provenienti dalle proteine alimentari non degradate nel rumine; NDF: fibra neutrale deterosa; ADF: fibra acido deterosa; ADL: lignina acido deterosa; EE: etere estratto; ASH: ceneri; ST: amido; NSC: carboidrati non strutturali; Ca: calcio; P: fosforo.

2.2 Valutazione del Body Condition Score

Al momento della visita clinica delle bovine, prima dell'esecuzione del prelievo ematico, è stato valutato il BCS. Tale valutazione è stata eseguita tramite la valutazione dei profili corporei della regione posteriore, palpazione della colonna vertebrale, dei processi lombari e della regione della corda, al fine di identificare la quantità di riserve corporee energetiche della bovina sotto forma di tessuto adiposo o muscolare. La scala utilizzata è un parametro soggettivo e prevede uno score che va da 0 fino a 5. Con il punteggio 0 si identificano le bovine in stato di cachessia, mentre con il punteggio 5 le bovine in uno stato di esagerata nutrizione (Edmonson et al., 1989).

2.3 Campionamento ematico

Il campionamento ematico si è svolto in tarda mattinata. È stata eseguita una pulizia dell'area ventrale della coda e, successivamente, il prelievo della vena coccigea a livello S1-S2 o S2-S3 tramite un ago 22 gauge. Il sistema di prelievo prevedeva l'uso di vacutainer e di provette Venosafe con Clot Activator (9ml; Terumo Venosafe, Leuvel, Belgium). Tali provette sono state trasportate entro 1 ora in laboratorio, mantenendo una temperatura di 4°C, e centrifugate (Heraeus Labofuge 400, Thermo Scientific, Milano, Italia) a 3000 rpm per 10 minuti. Dal siero ricavato si sono ottenute due aliquote poste in provette Eppendorf da 1,5 ml. Un'aliquota è stata conservata alla temperatura di -20°C in attesa dell'analisi biochimica, l'altra è stata conservata a -80°C in attesa dell'analisi metabolica.

2.4 Valutazione della chetonemia in campo

Al momento del prelievo ematico è stata eseguita anche una valutazione in campo del BHB tramite lettore digitale Nuova Biomedical Express. Tale procedura prevede l'utilizzo di una striscia reattiva, idonea allo strumento utilizzato (Stat Strip Ket, Nova Biomedical), su cui viene posta una goccia di sangue. A questo punto si può procedere ad introdurre la striscia reattiva nel lettore digitale, il quale misura l'interazione tra i composti chimici (il BHB ematico e la striscia reattiva) e ci fornisce sul display la concentrazione ematica di BHB in un range di misura che è compreso tra 0,0 mmol/L ed 8,0 mmol/L. Tale valutazione ha permesso una prima differenziazione delle bovine in due gruppi, uno con un BHB inferiore a 1,0 mmol/L ed un secondo con un BHB superiore a tale valore.

2.5 Analisi di laboratorio

In laboratorio è stata eseguita un'analisi biochimica sul siero attraverso l'analizzatore automatico di chimica clinica (BT1500 Biotecnica instrument SPA, Roma, Italia) per la valutazione della concentrazione di BHB. Tali valori hanno permesso di differenziare definitivamente le bovine in tre gruppi:

- ❖ il gruppo BHB 0 è costituito da 12 bovine e presentava valori di BHB inferiori a 0,5 mmol/L, con una media di 0,42 mmol/L;
- ❖ il gruppo BHB 1 è costituito da 19 bovine e presentava valori di BHB compresi tra gli 0,5 ed 1 mmol/L, con una media di 0,71 mmol/L;
- ❖ il gruppo BHB 2 è costituito da 18 bovine e presentava valori di BHB superiori a 1,00 mmol/L, con una media di 1,36 mmol/L.

Tabella 2: Riassunto delle caratteristiche dei gruppi BHB 0, BHB 1 ed BHB 2.

	BHB 0	BHB 1	BHB 2	SEM
BHB (mmol/L)	0,42	0,71	1,36	0,018
DIM (giorni)	26,9	31,6	20,9	2,987
BCS	2,75	2,75	2,75	0,049
Parity	2,6	2,2	3,4	0,436
Kg Latte al giorno	29,2	29,8	29,5	2,157

Legenda: I valori dei gruppi BHB 0, BHB 1 e BHB 2 sono delle medie. SEM = errore standard dalla media

2.6 Analisi metabolomica ¹H-NMR

E' stata creata una soluzione per analisi NMR con sale di acido sodio 3-(trimetilsilil)-propionico-2,2,3,3-d₄ (TSP) 10 mM in D₂O, fissato a pH 7,00 ± 0,02 mediante tampone fosfato 1M, contenente anche 10 µL di NaN₃ 2 mM. Il TSP è stato impiegato come riferimento di spostamento chimico per l'NMR, mentre l'utilizzo del NaN₃ ha evitato la proliferazione microbica, come suggerito da Zhu et al. (2018).

I campioni di siero sono stati preparati per l'¹H-NMR attraverso scongelamento e centrifugazione di 1 mL di ciascun campione per 15 minuti a 18630 g e 4 ° C. Per ogni campione

sono stati prelevati 700 μL di surnatante a cui sono stati aggiunti 100 μL di soluzione per l'analisi NMR. Infine, ciascuno dei campioni così ottenuti è stato nuovamente centrifugato alle condizioni di cui sopra subito prima dell'analisi.

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati registrati a 298 K con uno spettrometro AVANCE III (Bruker, Milano, Italia) che opera a una frequenza di 600.13 MHz, dotato del software Topspin 3.5. Seguendo il procedimento di Zhu et al. (2018), i segnali caratterizzati da ampie risonanze e, quindi, provenienti da grandi molecole sono stati soppressi tramite un filtro CPMG composto da 400 echi con un τ di 400 μs e un impulso di 180° di 24 μs , per un filtro totale di 330 ms. Il segnale residuo HOD è stato soppresso mediante presaturazione. Ciò è stato fatto impiegando la sequenza *cpmgpr1d*, parte della libreria di sequenze degli impulsi standard. Ciascuno spettro è stato acquisito sommando 256 transitori ed utilizzando 32 K di punti dati su una finestra spettrale 7184 Hz, con un tempo di acquisizione di 2,28 s.

I differenti contenuti di acqua tra i diversi campioni sono stati presi in considerazione dalla normalizzazione probabilistica del quoziente (Dieterle et al., 2006), più affidabile della più comune normalizzazione sulla creatinina. La fase degli spettri è stata regolata manualmente in Topspin, mentre le successive regolazioni sono state eseguite in linguaggio computazionale R mediante *script* sviluppati internamente (R Core Team, 2018). Dopo la rimozione del segnale di acqua residua, gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati settati mediante il rilevamento del picco, secondo il principio del "*rolling ball*" (Kneen and Annegarn, 1996), implementato nel pacchetto base R (Liland et al., 2010). I segnali sono stati assegnati confrontando il loro spostamento chimico e la loro molteplicità con la libreria Chenomx software (Chenomx Inc., Canada, ver 8.3).

Al fine di applicare la NMR come tecnica quantitativa, il ritardo di riciclo è stato impostato su 5 secondi, considerando il tempo di rilassamento dei protoni in esame. Le molecole del primo campione di siero analizzato sono state quantificate per mezzo di uno standard esterno, sfruttando il principio di reciprocità (Hoult, 2011). La quantificazione delle molecole è stata eseguita mediante integrazione rettangolare, considerando uno dei segnali corrispondenti, privo di interferenze.

2.7 L'analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta in linguaggio computazionale R.

I confronti tra gruppi BHB 0: sano; il BHB 1: rischio di chetosi subclinica o di iperchetonemia; BHB 2: in chetosi subclinica o in iperchetonemia sono stati condotti utilizzando il test t-Student ed il test non parametrico di Mann-Whitney per i dati normalmente distribuiti e non, rispettivamente. Le variabili che non erano normalmente distribuite sono state trasformate secondo Box e Cox (Box and Cox, 2018).

Le molecole la cui concentrazione variava tra i gruppi nel siero bovino sono state ricercate con ANOVA sfruttando la funzione "lm" del pacchetto R "agricolae" (Mendiburu, 2012).

Per evidenziare le tendenze alla base del metaboloma dei campioni è stato effettuato un *Robust Principal Component Analysis* (rPCA) (Hubert et al., 2005), sulle molecole accettate dall'analisi univariata sopra descritta. Per ogni modello è stato calcolato con uno *scoreplot* la proiezione dei campioni del PC, per evidenziare la struttura dei dati. Inoltre, è stato calcolato il diagramma di correlazione di Pearson, correlando la concentrazione di ciascuna molecola ai componenti del modello. È stata generata una mappa di colore o *heatmap* gerarchica per rappresentare graficamente il livello di espressione dei metaboliti nei gruppi confrontati.

Per stabilire i valori soglia predittivi per ogni metabolita, oltre il quale l'animale viene considerato chetonemico, è stata valutata la curva ROC (Receiver Operating Characteristic), un metodo statistico frequentemente utilizzato in ambito biomedico per molte condizioni cliniche al fine di attuare una decisione binaria (malato/sano) sulla base della misurazione di un parametro, che nel nostro studio di ricerca coincide con i metaboliti sierici. L'analisi ROC è stata applicata, quindi, per esaminare la specificità e la sensibilità di questi potenziali biomarkers. L'area sotto la curva AUC (Area Under the Curve) è stata calcolata per valutarne la potenziale efficacia ed esprime il potere diagnostico del test. Un AUC = 1.0 test perfetto, da 0,9 a 1,0 = test altamente accurato, da 0,7 a 0,9 = test moderatamente accurato, da 0,5 a 0,7 = test poco accurato, da 0,5 = test non informativo (Swets, 1998).

Il software MetaboAnalyst 4.0 (www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalysts) è stato utilizzato per determinare l'analisi delle curve ROC multivariate ed il fattore di impatto dell'analisi topologica dei metaboliti, basato sull'Enciclopedia di geni e genomi di Kyoto (KEGG,

<http://www.kegg.jp>). MetaboAnalyst è un software disponibile sul web progettato per aiutare gli utenti ad eseguire le analisi metabolomiche ed interpretarne i dati (Chong et al., 2018).

Nel contesto è stato accettato un limite di significatività di $P < 0,05$.

3. Risultati

Sono stati valutati i parametri BHB, DIM, BCS, *Parity* e Kg di latte al giorno per valutarne la significatività. Soltanto il BHB ed il DIM hanno presentato un P value < 0,05 e, pertanto, sono risultati significativamente diversi tra i tre gruppi.

Tabella 3: Riassunto delle principali caratteristiche dei tre gruppi, BHB 0, BHB 1, e BHB 2 e loro P value

	BHB 0	BHB 1	BHB 2	SEM	P value
BHB (mmol/L)	0,42	0,71	1,36	0,018	0,0001
DIM (giorni)	26,9	31,6	20,9	2,987	0,005
BCS	2,75	2,75	2,75	0,049	0,186
Parity	2,6	2,2	3,4	0,436	0,221
Kg Latte al giorno	29,2	29,8	29,5	2,157	0,915

Legenda: I valori dei gruppi BHB 0, BHB 1 e BHB 2 sono delle medie. SEM = errore standard dalla media.

Nei campioni di siero bovino sono stati identificati 57 metaboliti (Tabella 4) di cui:

- 27 aminoacidi e derivati, tra cui metionina, valina, glutammina, leucina, isoleucina, treonina, istidina, aspartato, glicina, arginina, alanina, glutammato, prolina, lisina, fenilalanina, serina, tirosina, asparagina, taurina, creatina, creatinina, dimetilglicina, N6-acetil-lisina, betaina, sarcosina, 3-metilistidina e 2-amminobutirrato;
- 10 acidi organici, tra cui acetato, 3-idrossiisobutirrato, propionato, succinato, citrato, fumarato, 2-idrossibutirrato, piruvato, lattato e formiato;
- 5 alcool, tra cui etanolo, metanolo, 2,3-butanediolo, mio-inositolo e glicerolo;
- 4 carboidrati, tra cui lattosio, glucosio, gluconato e mannosio;
- 2 ammine e derivati, tra cui dimetilammina e TMAO;
- 2 acidi grassi, tra cui metilsuccinato ed isovalerato;
- 2 corpi chetonici, tra cui acetone e 3-idrossibutirrato;
- 1 sulfone, ovvero il dimetilsulfone;
- 1 vitamina, ovvero la colina;
- 1 imidazolo, ovvero l'allantoina;
- 1 nucleoside, ovvero l'uridina;
- 1 guanidina, ovvero la metilguanidina.

Tra tali metaboliti, 23 sono risultati statisticamente significativi tra i tre gruppi, vale a dire:

- 7 aminoacidi e derivati, tra cui aspartato, arginina, glutammato, prolina, serina, dimetilglicina e betaina;
- 3 acidi organici, tra cui 3-idrossiisobutirrato, succinato e formiato;
- 3 alcool, tra cui etanolo, metanolo e 2,3-butanediolo;
- 2 ammine e derivati, tra cui dimetilammina e TMAO;
- 2 acidi grassi, tra cui metilsuccinato ed isovalerato;
- 2 corpi chetonici, tra cui acetone ed 3-idrossibutirrato;
- 1 carboidrato, ovvero il glucosio;
- 1 sulfone, ovvero il dimetilsulfone;
- 1 vitamina, ovvero la colina;
- 1 imidazolo, ovvero l'allantoina.

Tabella 4: Elenco dei 57 metaboliti identificati (mediana (IRQ)) per i gruppo di bovine. Con *a*, *b* e *c* si identificano i metaboliti significativamente diversi.

	Ppm	BHB0	BHB1	BHB2	P value
Formiato	8.44	1.23*10⁻² (6.57*10⁻³)^a	9.44*10⁻³ (3.22*10⁻³)^{ab}	8.71*10⁻³ (4.35*10⁻³)^a	0.002
Fenilalanina	7.41	7.65*10 ⁻³ (1.68*10 ⁻³)	7.08*10 ⁻³ (1.85*10 ⁻³)	6.40*10 ⁻³ (2.24*10 ⁻³)	NS
Tirosina	7.17	7.37*10 ⁻³ (2.70*10 ⁻³)	6.89*10 ⁻³ (2.35*10 ⁻³)	6.96*10 ⁻³ (2.79*10 ⁻³)	NS
Istidina	7.11	1.57*10 ⁻² (4.22*10 ⁻³)	1.52*10 ⁻² (2.35*10 ⁻³)	1.57*10 ⁻² (2.23*10 ⁻³)	NS
3-Metilistidina	7.02	3.92*10 ⁻³ (1.10*10 ⁻³)	3.47*10 ⁻³ (8.28*10 ⁻⁴)	4.11*10 ⁻³ (2.44*10 ⁻³)	NS
Fumarato	6.51	7.17*10 ⁻⁴ (2.92*10 ⁻⁴)	6.60*10 ⁻⁴ (1.87*10 ⁻⁴)	6.91*10 ⁻⁴ (1.34*10 ⁻⁴)	NS
Uridina	5.91	4.66*10 ⁻³ (1.39*10 ⁻³)	4.33*10 ⁻³ (9.67*10 ⁻⁴)	4.65*10 ⁻³ (1.29*10 ⁻³)	NS
Allantoina	5.38	1.55*10⁻² (3.33*10⁻³)^{ab}	1.74*10⁻² (4.46*10⁻³)^a	1.62*10⁻² (6.56*10⁻³)^b	0.021
Mannosio	5.17	8.20*10 ⁻³ (1.60*10 ⁻³)	7.61*10 ⁻³ (1.98*10 ⁻³)	7.58*10 ⁻³ (2.57*10 ⁻³)	NS
Lattosio	4.44	9.61*10 ⁻³ (5.61*10 ⁻³)	1.05*10 ⁻² (5.89*10 ⁻³)	8.86*10 ⁻³ (9.27*10 ⁻³)	NS
Gluconato	4.13	5.21*10 ⁻² (6.76*10 ⁻²)	1.17*10 ⁻² (4.40*10 ⁻²)	3.56*10 ⁻² (4.24*10 ⁻²)	NS
Lattato	4.08	2.09*10 ⁻¹ (7.70*10 ⁻²)	1.46*10 ⁻¹ (6.50*10 ⁻²)	1.27*10 ⁻¹ (8.44*10 ⁻²)	NS
Mio-inositolo	4.05	5.86*10 ⁻³ (6.58*10 ⁻⁴)	8.31*10 ⁻³ (2.92*10 ⁻³)	5.81*10 ⁻³ (7.28*10 ⁻³)	NS

Serina	3.95	2.10*10⁻² (6.96*10 ⁻³) ^a	1.77*10⁻² (2.99*10 ⁻³) ^b	1.56*10⁻² (5.07*10 ⁻³) ^b	<0.001
Betaina	3.88	6.67*10⁻³ (2.86*10 ⁻³) ^{ab}	7.85*10⁻³ (2.74*10 ⁻³) ^a	5.44*10⁻³ (2.85*10 ⁻³) ^b	0.023
Treonina	3.58	1.78*10 ⁻² (9.81*10 ⁻³)	1.82*10 ⁻² (8.42*10 ⁻³)	2.16*10 ⁻² (8.81*10 ⁻³)	NS
Glicerolo	3.56	1.52*10 ⁻² (8.00*10 ⁻³)	9.66*10 ⁻³ (4.54*10 ⁻³)	9.09*10 ⁻³ (7.70*10 ⁻³)	NS
Glicina	3.55	1.01*10 ⁻¹ (2.45*10 ⁻²)	1.10*10 ⁻¹ (5.04*10 ⁻²)	1.02*10 ⁻¹ (3.80*10 ⁻²)	NS
Metanolo	3.34	3.05*10⁻³ (1.72*10 ⁻³) ^b	3.66*10⁻³ (2.46*10 ⁻³) ^{ab}	5.47*10⁻³ (1.01*10 ⁻²) ^a	0.011
Taurina	3.26	1.19*10 ⁻² (4.60*10 ⁻³)	1.25*10 ⁻² (3.28*10 ⁻³)	1.10*10 ⁻² (4.68*10 ⁻³)	NS
TMAO	3.25	8.91*10⁻³ (6.24*10 ⁻³) ^b	1.68*10⁻² (1.27*10 ⁻²) ^a	2.21*10⁻² (1.51*10 ⁻²) ^a	0.001
Glucosio	3.22	9.25*10⁻¹ (1.03*10 ⁻¹) ^b	1.00*10⁰ (1.24*10 ⁻¹) ^a	8.80*10⁻¹ (1.67*10 ⁻¹) ^b	0.002
Colina	3.18	1.69*10⁻³ (1.47*10 ⁻³) ^{ab}	1.94*10⁻³ (7.45*10 ⁻⁴) ^a	1.12*10⁻³ (8.11*10 ⁻⁴) ^b	0.030
Dimetilsulfone	3.13	5.52*10⁻³ (9.52*10 ⁻³) ^{ab}	1.08*10⁻² (8.53*10 ⁻³) ^a	5.30*10⁻³ (5.05*10 ⁻³) ^b	0.047
Creatinina	3.03	8.17*10 ⁻³ (2.05*10 ⁻³)	8.38*10 ⁻³ (3.05*10 ⁻³)	8.08*10 ⁻³ (3.25*10 ⁻³)	NS
Creatina	3.02	5.75*10 ⁻² (6.94*10 ⁻³)	5.92*10 ⁻² (1.18*10 ⁻²)	5.66*10 ⁻² (1.85*10 ⁻²)	NS
Lisina	3.00	1.30*10 ⁻² (3.16*10 ⁻³)	1.25*10 ⁻² (3.05*10 ⁻³)	1.18*10 ⁻² (1.79*10 ⁻³)	NS
Asparagina	2.93	1.12*10 ⁻² (1.88*10 ⁻³)	1.09*10 ⁻² (2.45*10 ⁻³)	9.76*10 ⁻³ (4.16*10 ⁻³)	NS
Dimetilglicina	2.91	1.80*10⁻⁴ (1.23*10 ⁻⁴) ^{ab}	1.40*10⁻⁴ (6.36*10 ⁻⁵) ^b	2.21*10⁻⁴ (1.07*10 ⁻⁴) ^a	0.014
Metilguanidina	2.82	1.10*10 ⁻³ (2.50*10 ⁻⁴)	9.86*10 ⁻⁴ (2.17*10 ⁻⁴)	8.95*10 ⁻⁴ (2.13*10 ⁻⁴)	NS
Aspartato	2.78	2.87*10⁻³ (7.70*10 ⁻⁴) ^a	2.64*10⁻³ (1.19*10 ⁻³) ^a	1.19*10⁻³ (7.73*10 ⁻⁴) ^b	0.002
Sarcosina	2.72	5.18*10 ⁻⁴ (1.89*10 ⁻⁴)	5.47*10 ⁻⁴ (1.37*10 ⁻⁴)	4.94*10 ⁻⁴ (1.08*10 ⁻⁴)	NS
Dimetilamina	2.71	4.72*10⁻⁴ (3.02*10 ⁻⁴) ^b	8.47*10⁻⁴ (6.54*10 ⁻⁴) ^a	8.02*10⁻⁴ (5.30*10 ⁻⁴) ^{ab}	0.012
Metionina	2.62	3.36*10 ⁻³ (1.81*10 ⁻³)	4.39*10 ⁻³ (1.55*10 ⁻³)	4.09*10 ⁻³ (1.28*10 ⁻³)	NS
Citrato	2.52	2.42*10 ⁻² (1.67*10 ⁻²)	3.11*10 ⁻² (6.89*10 ⁻³)	2.87*10 ⁻² (1.95*10 ⁻²)	NS
Glutammina	2.44	5.04*10 ⁻² (7.22*10 ⁻³)	5.36*10 ⁻² (1.22*10 ⁻²)	5.44*10 ⁻² (1.79*10 ⁻²)	NS
Succinato	2.39	1.97*10⁻³ (1.03*10 ⁻³) ^{ab}	1.68*10⁻³ (7.59*10 ⁻⁴) ^b	2.18*10⁻³ (6.80*10 ⁻⁴) ^a	0.038
Piruvato	2.35	4.30*10 ⁻³ (2.69*10 ⁻³)	4.74*10 ⁻³ (1.32*10 ⁻³)	4.33*10 ⁻³ (1.41*10 ⁻³)	NS

Glutammato	2.32	4.66*10⁻² (7.53*10 ⁻³) ^a	4.58*10⁻² (4.39*10 ⁻³) ^a	4.21*10⁻² (1.18*10 ⁻²) ^b	<0.0001
Acetone	2.21	3.14*10⁻³ (1.28*10 ⁻³) ^c	6.52*10⁻³ (2.64*10 ⁻³) ^b	1.46*10⁻² (1.97*10 ⁻²) ^a	<0.0001
Prolina	1.99	2.17*10⁻² (2.11*10 ⁻³) ^a	2.12*10⁻² (2.33*10 ⁻³) ^{ab}	1.99*10⁻² (3.67*10 ⁻³) ^b	0.046
N6-acetil-lisina	1.98	5.53*10 ⁻³ (2.32*10 ⁻³)	5.78*10 ⁻³ (1.59*10 ⁻³)	5.14*10 ⁻³ (1.63*10 ⁻³)	NS
Arginina	1.93	5.65*10⁻² (1.33*10 ⁻²) ^a	5.16*10⁻² (2.07*10 ⁻²) ^a	4.26*10⁻² (2.43*10 ⁻²) ^{ab}	0.0007
Acetato	1.90	1.67*10 ⁻¹ (5.25*10 ⁻²)	2.49*10 ⁻¹ (1.00*10 ⁻¹)	2.68*10 ⁻¹ (8.59*10 ⁻²)	NS
Alanina	1.47	5.95*10 ⁻² (1.73*10 ⁻²)	5.61*10 ⁻² (1.08*10 ⁻²)	5.50*10 ⁻² (2.47*10 ⁻²)	NS
3-Idrossibutirrato	1.18	4.84*10⁻² (1.59*10 ⁻²) ^c	7.41*10⁻² (2.90*10 ⁻²) ^b	1.09*10⁻¹ (1.12*10 ⁻¹) ^a	<0.0001
Etanolo	1.17	3.06*10⁻³ (7.68*10 ⁻⁴) ^b	3.58*10⁻³ (1.91*10 ⁻³) ^b	7.59*10⁻³ (7.53*10 ⁻³) ^a	<0.0001
2.3-Butandiolo	1.13	9.00*10⁻⁴ (7.09*10 ⁻⁴) ^b	1.14*10⁻³ (9.40*10 ⁻⁴) ^b	2.20*10⁻³ (1.95*10 ⁻³) ^a	0.011
Metilsuccinato	1.07	7.11*10⁻⁴ (2.59*10 ⁻⁴) ^b	7.05*10⁻⁴ (4.10*10 ⁻⁴) ^b	1.04*10⁻³ (7.11*10 ⁻⁴) ^a	0.028
3-idrossi-isobutirrato	1.06	3.90*10⁻³ (1.37*10 ⁻³) ^b	4.78*10⁻³ (2.74*10 ⁻³) ^b	6.76*10⁻³ (4.17*10 ⁻³) ^a	0.0007
Propionato	1.05	2.86*10 ⁻³ (2.55*10 ⁻³)	2.95*10 ⁻³ (1.67*10 ⁻³)	3.24*10 ⁻³ (2.19*10 ⁻³)	NS
Valina	1.02	4.48*10 ⁻² (1.40*10 ⁻²)	4.73*10 ⁻² (1.38*10 ⁻²)	4.96*10 ⁻² (1.07*10 ⁻²)	NS
Isoleucina	1.00	2.35*10 ⁻² (5.54*10 ⁻³)	2.27*10 ⁻² (4.85*10 ⁻³)	2.43*10 ⁻² (4.41*10 ⁻³)	NS
2-Aminobutirrato	0.96	9.56*10 ⁻³ (4.34*10 ⁻³)	8.95*10 ⁻³ (2.69*10 ⁻³)	9.13*10 ⁻³ (2.30*10 ⁻³)	NS
Leucina	0.95	2.51*10 ⁻² (8.92*10 ⁻³)	2.36*10 ⁻² (7.69*10 ⁻³)	2.68*10 ⁻² (6.38*10 ⁻³)	NS
Isovalerato	0.91	7.09*10⁻³ (1.01*10 ⁻³) ^a	6.70*10⁻³ (1.52*10 ⁻³) ^{ab}	6.19*10⁻³ (8.47*10 ⁻³) ^b	0.031
2-idrossibutirrato	0.88	5.79*10 ⁻³ (2.18*10 ⁻³)	5.33*10 ⁻³ (9.81*10 ⁻⁴)	5.10*10 ⁻³ (2.02*10 ⁻³)	NS

Legenda: Ppm: peso molecolare; mediana e IRQ sono espressi in mmol/L; NS: non significativo; P < 0.05.

Al fine di ottenere una panoramica delle tendenze delle molecole così evidenziate, le loro concentrazioni sono state impiegate come base per un modello di rPCA, mostrato in Figura 4. Il PC 1 dello scoreplot (Figura 4A), che rappresenta fino al 67,9% della variabilità dell'intero campione, riassume le differenze tra i campioni raccolti dai diversi gruppi.

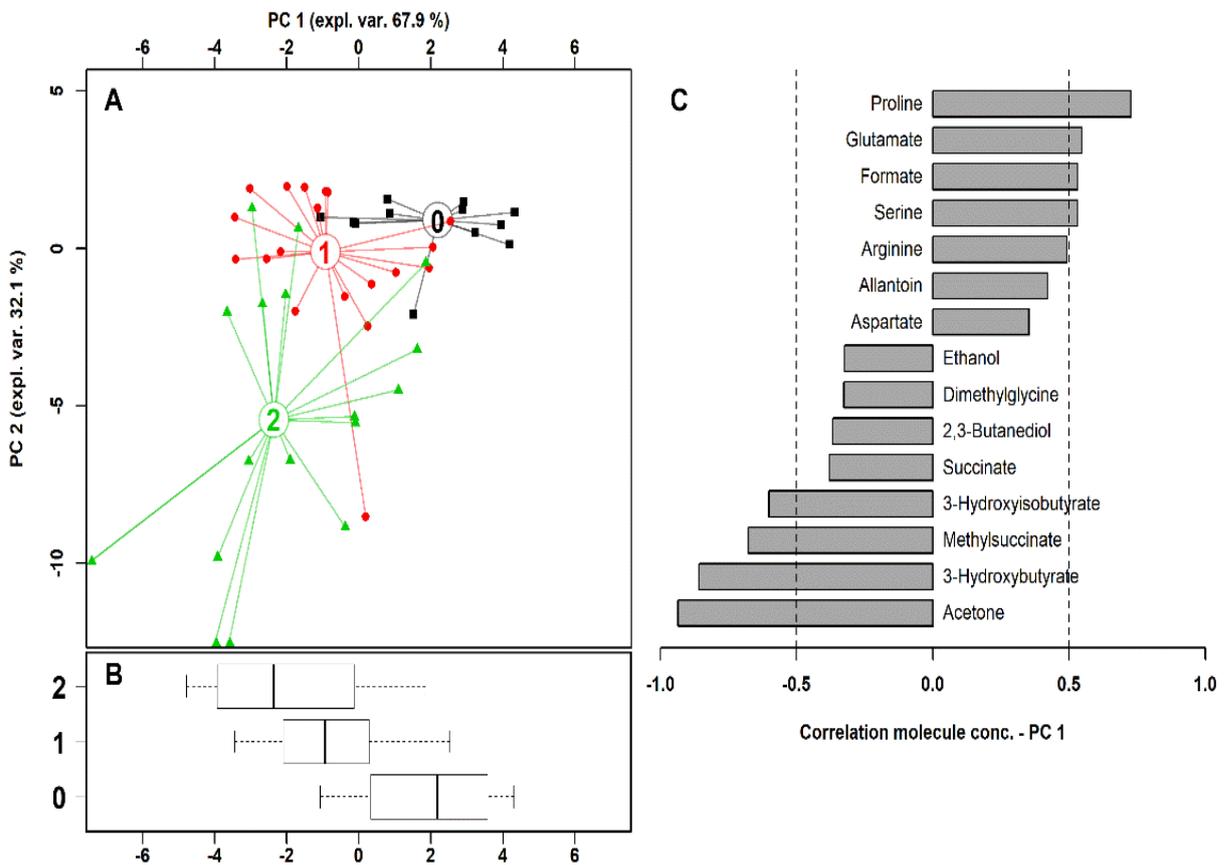
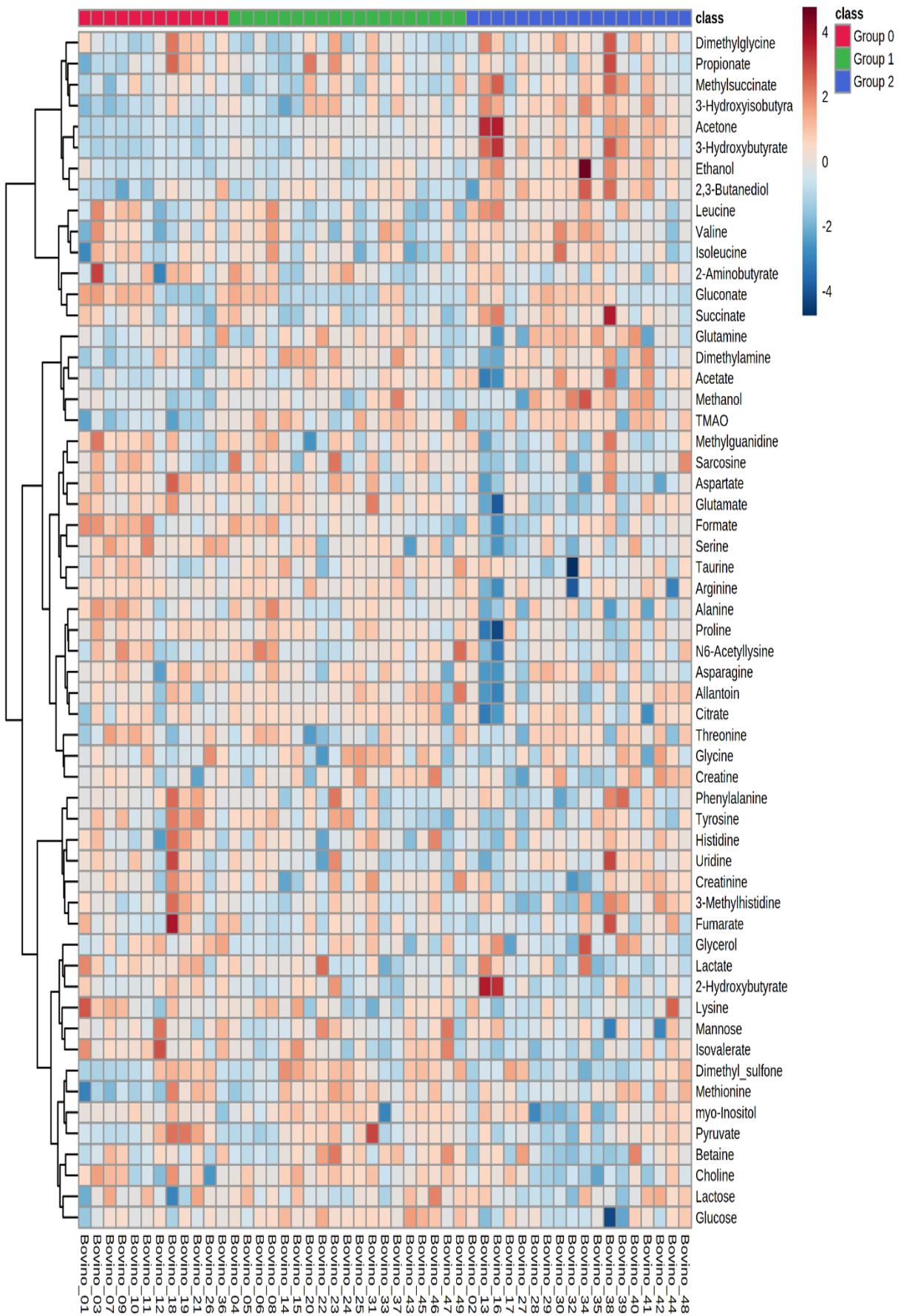


Figura 4: Modello rPCA ha mostrato una differenza statisticamente significativa tra i diversi gruppi. Nello scoreplot (A), i campioni dei tre gruppi sono rappresentati con quadrati (Gruppo BHB 0), cerchi (Gruppo BHB 1) e triangoli (Gruppo BHB 2). I cerchi ampi e vuoti rappresentano la mediana di ciascun gruppo di campioni. La posizione dei campioni lungo PC1 è riassunta nel Boxplot B. Il loading plot (C) riporta la correlazione significativa tra la concentrazione di ciascuna sostanza e la sua importanza sul PC 1 ($p < 0,05$).

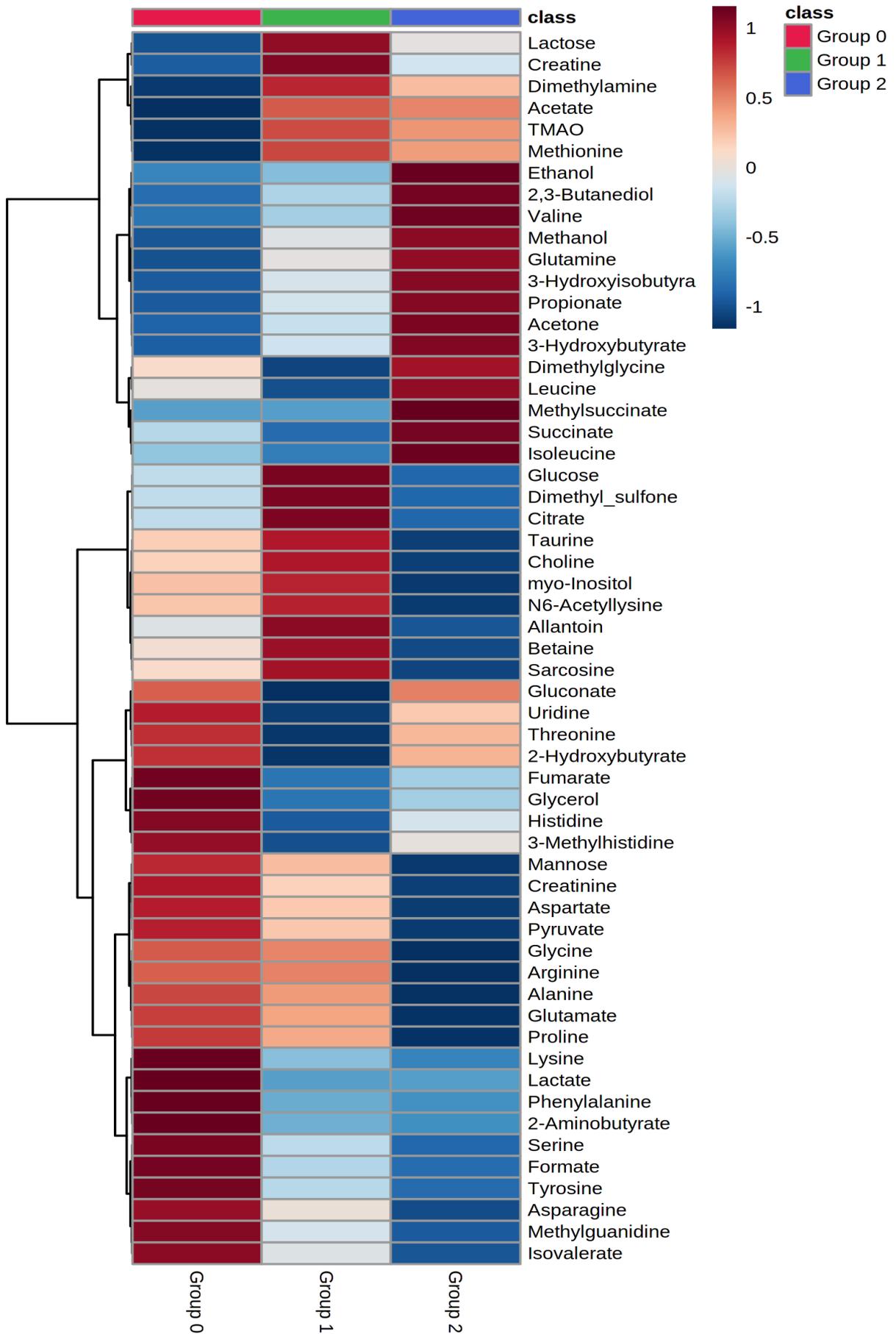
Figura 5: Heatmap dei metaboliti nei 49 animali campionati



Andando più nel dettaglio possiamo evidenziare delle importanti differenze di concentrazione dei metaboliti statisticamente significativi tra i tre gruppi (Figura 6):

- ❖ Il gruppo BHB 0, che ricordiamo avere un valore di BHB inferiore a 0,5 mmol/L presenta dei livelli più elevati di 5 aminoacidi e derivati (aspartato, arginina, glutammato, prolina e serina), 1 acido organico (formiato) ed 1 acido grasso (isovalerato). Mentre presenta dei livelli più bassi di 3 alcool (etanolo, metanolo e 2,3-butanediolo), 2 ammine e derivati (dimetilammina e TMAO), 2 corpi chetonici (acetone e 3-idrossibutirrato) ed 1 acido organico (3-idrossiisobutirrato).
- ❖ Il gruppo BHB 1, con valori di BHB compresi tra 0,5 e 1,0 mmol/L, presenta dei livelli più elevati di 2 ammine e derivati (dimetilammina e TMAO), 1 aminoacido e derivati (betaina), 1 carboidrato (glucosio), 1 sulfone (dimetilsulfone), 1 vitamina (colina) ed 1 imidazolo (allantoina). Mentre presenta dei livelli più bassi di 1 acido organico (succinato) ed 1 acido grasso (metilsuccinato).
- ❖ Il gruppo BHB 2, con valori di BHB superiori a 1,0 mmol/L, presenta dei livelli più elevati di 3 alcool (etanolo, metanolo e 2,3-butanediolo), 2 corpi chetonici (acetone e 3-idrossibutirrato), 2 acidi organici (3-idrossiisobutirrato e succinato), 1 aminoacido e derivato (dimetilglicina) ed 1 acido grasso (metilsuccinato). Mentre presenta dei valori più bassi di 6 aminoacidi e derivati (aspartato, arginina, glutammato, prolina, serina e betaina), 1 acido organico (formiato), 1 carboidrato (glucosio), 1 acido grasso (isovalerato), 1 sulfone (dimetilsulfone), 1 vitamina (colina) ed 1 imidazolo (allantoina).

Figura 6: Heatmap dei metaboliti identificati nei tre gruppi selezionati



Inoltre, sempre utilizzando il software MetaboAnalyst 4.0, è stato condotto uno studio sui 23 metaboliti statisticamente significativi per valutare quali cicli metabolici venissero influenzati in corso di chetosi. Nella Figura 7 le ascisse vanno ad indicare il valore di impatto del ciclo metabolico alterato, mentre le ordinate vanno ad indicare il valore logaritmo del P value ottenute dell'analisi di arricchimento dei cicli. Il gradiente di colore e la dimensione dei simboli rappresentano i cambiamenti significativi dei metaboliti del ciclo metabolico corrispondente. I cicli alterati in modo significativo si caratterizzano sia per un elevato valore del logaritmo del P value sia per un elevato valore di impatto. Nella tabella 5, inoltre, sono indicati i P value dei principali percorsi modificati.

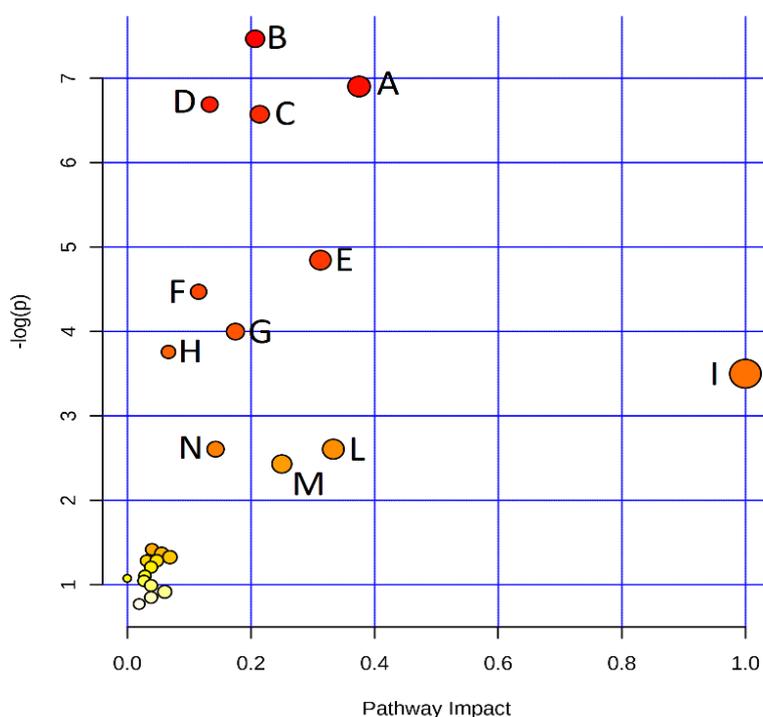


Figura 7: Pathway Impact dei metaboliti statisticamente significativi che evidenzia i cicli metabolici influenzati. **Legenda:** A= biosintesi dell'arginina; B= biosintesi dell'aminoacil-tRNA; C= metabolismo della glicina, serina e treonina; D= metabolismo del butanoato; E= metabolismo dell'alanina, aspartato e glutammato; F= metabolismo glicosilato e dicarbossilato; G= metabolismo dell'arginina e prolina; H=metabolismo dell'istidina; I= biosintesi della neomicina, kanamicina e gentamicina; L= metabolismo del D-glutammato e D-glutammina; M= metabolismo del nitrogeno; N=sintesi e degradazione dei corpi chetonici.

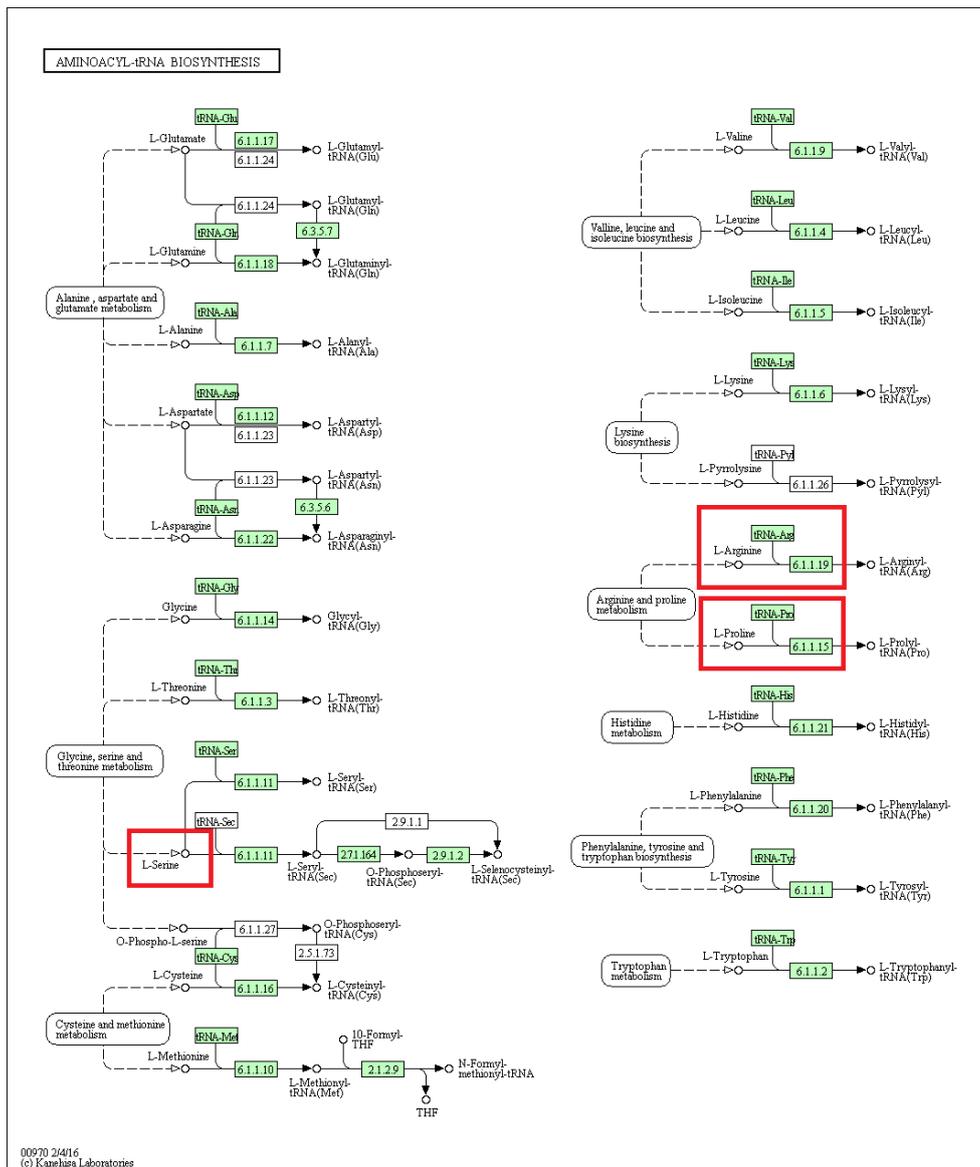


Figura 10: Ciclo metabolico della biosintesi dell'aminoacil-tRNA. I metaboliti statisticamente significativi coinvolti in tale ciclo sono evidenziati dai rettangoli rossi. Tali metaboliti sono fondamentali per l'associazione al tRNA e, dunque, alla sintesi proteica.

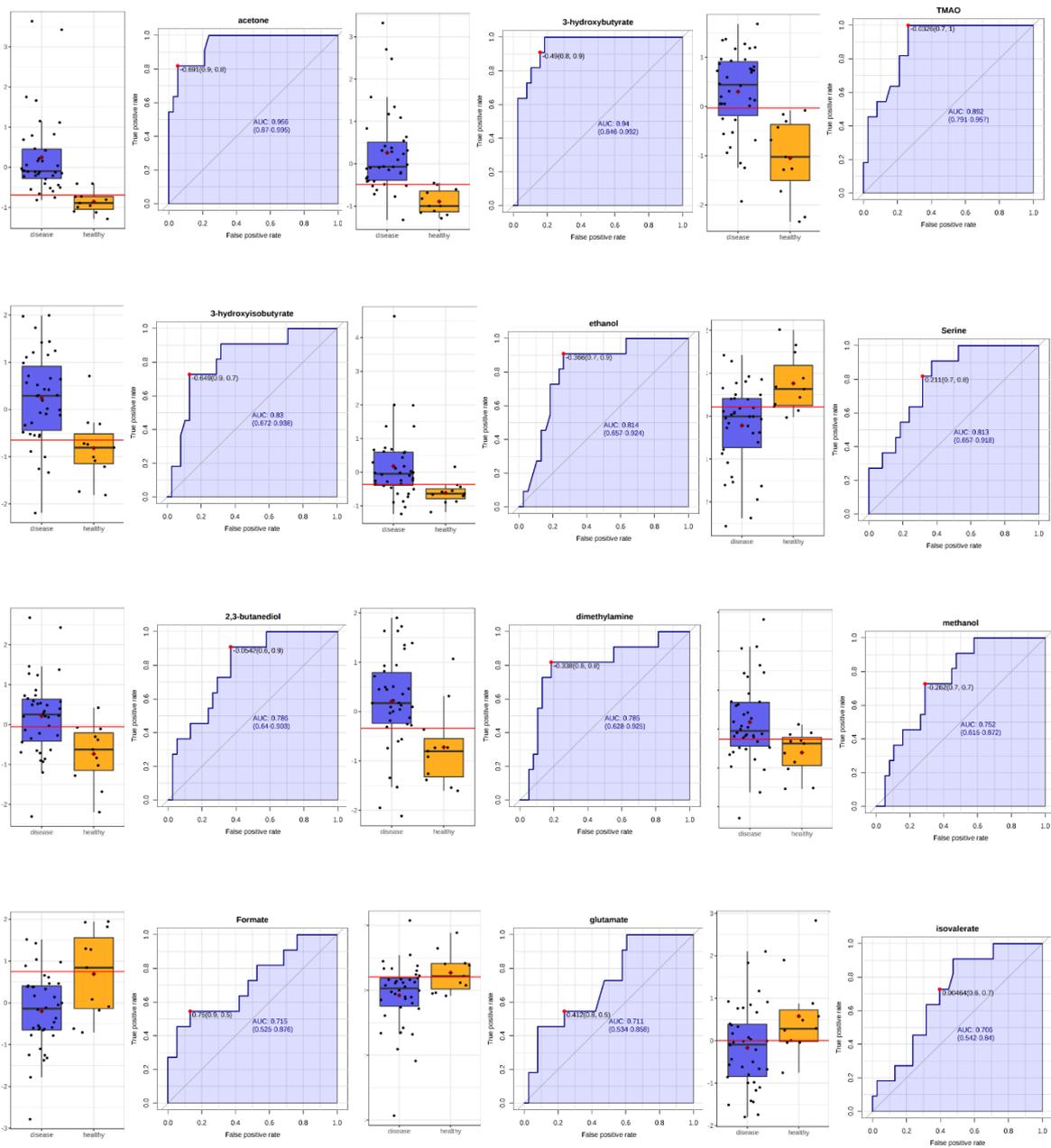
Successivamente è stata condotta l'analisi della curva ROC al fine di stabilire il potenziale utilizzo di ogni metabolita come biomarkers per la distinzione tra i soggetti sani (BHB < 0.5 mmol/L) ed i soggetti a rischio di chetosi subclinica o affetti da essa (BHB > 0.5 mmol/L). Per tale valutazione sono stati presi in considerazione soltanto i metaboliti statisticamente significativi che presentavano un AUC > 0.5.

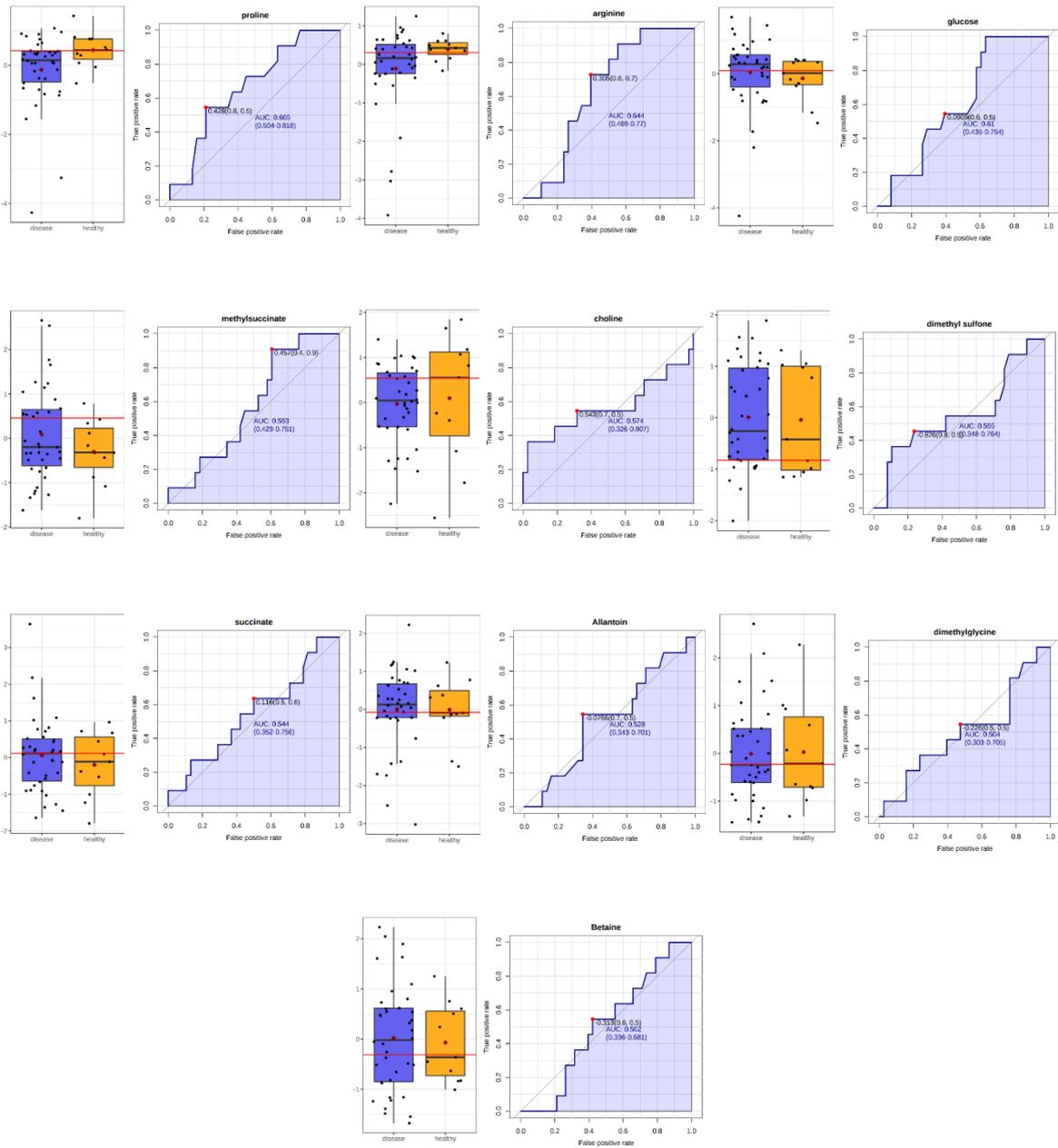
Sono stati, dunque, identificati:

- 2 metaboliti altamente accurati (AUC di 0.9-1), acetone e 3-idrossibutirrato;

- 10 metaboliti moderatamente accurati (AUC di 0.7-0.9), serina, 3-idrossiisobutirrato, etanolo, TMAO, glutammato, formiato, metanolo, 2,3-butanediolo, dimetilammina ed isovalerato;
- 10 metaboliti poco accurati (AUC di 0.5-0.7), arginina, prolina, glucosio, dimetilglicina, betaina, succinato, metilsuccinato, dimetilsulfone, colina ed allantoina.

Figura 11: ROC e Boxplot dei metaboliti riportati secondo funzione predittiva decrescente.





Al fine di migliorare la capacità predittiva dei metaboliti è stata sviluppata una combinazione di più di uno di questi tramite una *Class ROC*. La Figura 12 mostra come la combinazione di più metaboliti sia una discriminante altamente accurata (AUC = 0.944). Il modello in combinazione con 3 metaboliti ha ottenuto un valore di AUC più elevato.

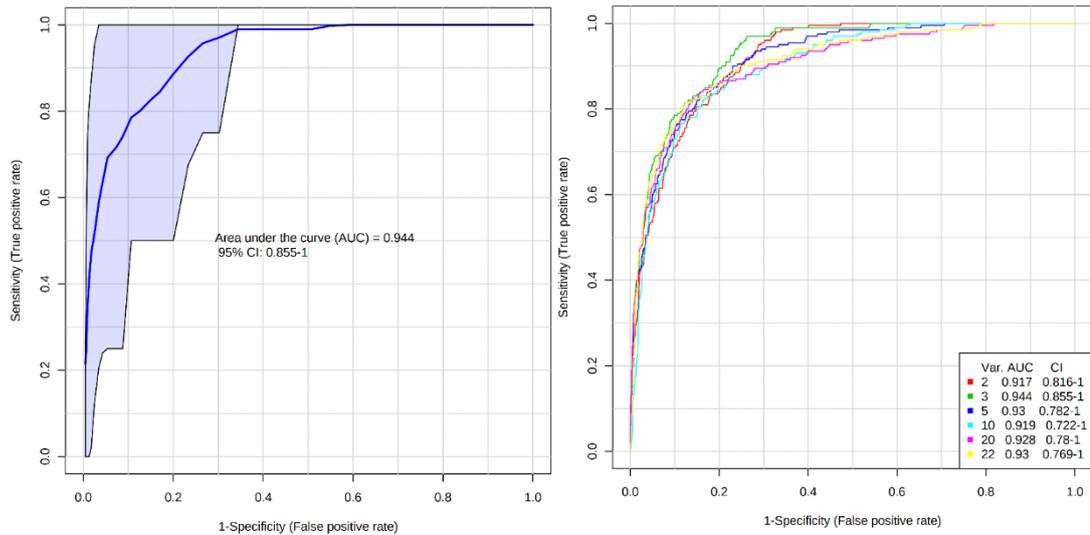


Figura 12: (A sinistra) *Class ROC* dei metaboliti indica una AUC di 0.944. (A destra) valore delle AUC utilizzando più metaboliti.

Alcuni dei metaboliti che hanno maggiormente contribuito a tale capacità predittiva possono essere utilizzati come discriminanti per differenziare tra il gruppo dei sani e quello dei patologici (Figura 13):

- per il gruppo sano sono stati identificati come discriminanti l'acetone, il 3-idrossibutirrato, il TMAO ed il 3-idrossiisobutirrato;
- per il gruppo patologico sono stati identificati come discriminanti l'etanolo, il 2,3-butanediolo, la serina, il glutammato, l'arginina e la prolina.

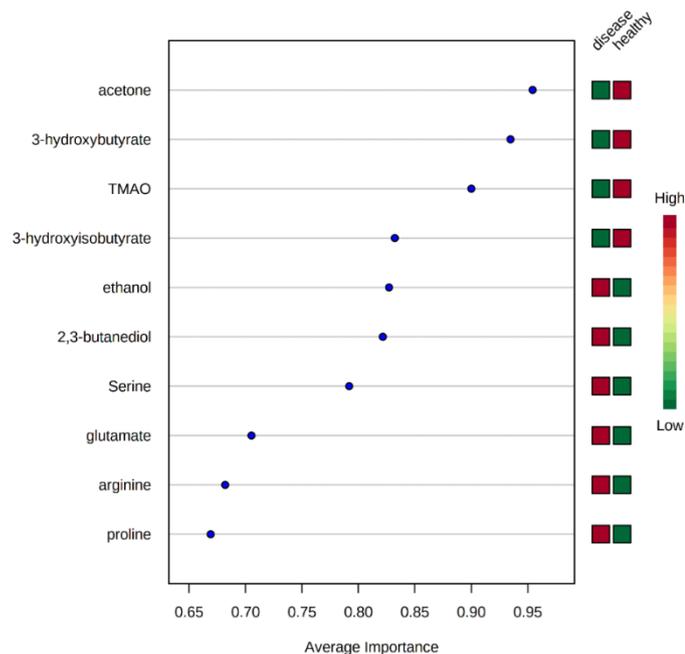


Figura 13: Average Importance dei metaboliti discriminanti tra il gruppo sano ed il gruppo patologico.

4. Discussione

A causa del rapido incremento delle richieste energetiche dopo il parto, dell'alto consumo di glucosio e della sua ridotta disponibilità, la bovina va incontro ad un NEB caratterizzato dall'ipoglicemia (Li et al., 2014). In risposta a tale condizione si realizza un incremento della gluconeogenesi (Xu et al., 2016). Dato che i carboidrati non strutturali come gli zuccheri e l'amido sono soggetti alle fermentazioni ruminali (Bell and Bauman, 1997), i principali substrati glucogenici sono costituiti dall'acido propionico, dall'acido lattico, dal glicerolo e degli aminoacidi glucogenici (Basoglu et al., 2020).

L'acido propionico può essere convertito in Propionil-CoA, che tramite altre reazioni, diviene Succinil-CoA. Questo è un intermedio del ciclo dell'acido tricarbossilico, o ciclo dell'acido citrico o ciclo di Krebs, e, come tutti gli altri intermedi (citrato, isocitrato, α -chetoglutarato, succinato, fumarato e malato), può essere convertito in ossalacetato da cui è possibile ottenere il glucosio. L'acido lattico può essere convertito in piruvato, che verrà a sua volta trasformato in ossalacetato e poi glucosio. Il glicerolo, in seguito a fosforilazione, verrà ossidato in diidrossiacetone, successivamente convertito il gliceraldeide-3-fosfato che seguirà la via glicolitica. Anche alcuni tipi di aminoacidi possono essere trasformati in intermedi del ciclo dell'acido tricarbossilico, portando alla produzione finale di glucosio, e pertanto vengono chiamati glucogenici. Tali aminoacidi sono l'alanina, la cisteina, la glicina, la serina ed il triptofano che possono portare alla formazione di piruvato; l'arginina, il glutammato, la glutammina, l'istidina e la prolina che portano alla formazione di α -chetoglutarato; l'isoleucina, la metionina, la treonina e la valina che portano alla formazione di Succinil-CoA; la fenilalanina e la tirosina che portano alla formazione del fumarato; l'asparagina e l'aspartato che portano alla formazione dell'ossalacetato (Nelson and Cox, 2006).

La carenza di tali substrati glucogenici è un'importante fattore di rischio per la patogenesi della chetosi (Basoglu et al., 2020), la quale si realizza generalmente tra le 2 e le 7 settimane del postparto. La maggior parte delle bovine presenta una chetosi subclinica che si caratterizza per un incremento dei corpi chetonici senza la manifestazione di segni clinici della patologia (Sun et al., 2014). Al fine di ottenere una diagnosi precoce per tale patologia è necessaria la conoscenza della stessa tramite lo studio completo del metaboloma degli animali che ne sono affetti (Singh et al., 2019). Ed è proprio la caratterizzazione di tale metaboloma su siero uno dei nostri obiettivi all'interno di tale studio, unitamente alla valutazione delle differenze

metaboliche tra i gruppi ed al potenziale sviluppo di biomarkers predittivi per una diagnosi precoce.

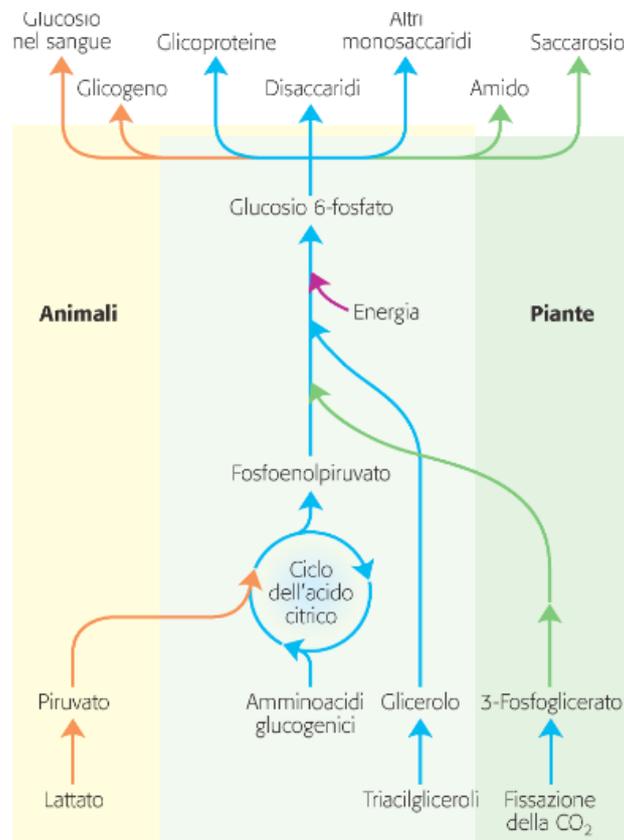


Figura 14: Sintesi dei precursori utilizzati per la gluconeogenesi. Fonte: Nelson and Cow, 2006

Nel gruppo BHB 2, che era stato identificato in chetosi subclinica o in iperchetonemia, si riscontra un incremento di etanolo e 2,3-butanediolo. Il primo può essere prodotto dalla microflora intestinale attraverso un processo di fermentazione anaerobica ed essere utilizzato nell'organismo per la produzione energetica attraverso la metabolizzazione in Acetyl-CoA. Il secondo è un prodotto della fermentazione anaerobica del glucosio. Ne consegue che in tale gruppo si può ipotizzare un incremento delle fermentazioni anaerobiche e dell'utilizzo di glucosio. Quest'ultimo inoltre, è stato identificato come metabolita influenzante il ciclo metabolico della biosintesi della neomicina, kanamicina e gentamicina. L'incremento della produzione energetica viene sostenuto anche dall'incremento del 3-idrossiisobutirrato, un metabolita derivante dall'acido propionico ed intermedio del metabolismo di un aminoacido glucogenico quale la valina. Da quest'ultimo aminoacido è possibile ottenere anche il succinato, metabolita intermedio del ciclo dell'acido tricarbossilico, la cui concentrazione era incrementata in tale gruppo.

L'aumentato utilizzo di aminoacidi glucogenici come l'aspartato e la prolina porta ad una conseguente riduzione della loro concentrazione. Il primo aminoacido citato è coinvolto anche nella sintesi di altri aminoacidi come l'arginina, la quale risulterà a sua volta ridotta. Il secondo è sintetizzato a partire dall'acido glutammico, anche questi ridotto. È interessante notare che secondo Zhang et al. (2017), elevate concentrazioni di prolina, arginina, glicina, istidina, fenilalanina e serina possono essere presenti in bovine che sono contemporaneamente affetti da più patologie in prossimità del parto, quali le mastiti, le metriti, le laminiti e la ritenzione di placenta. Possiamo, dunque, supporre che tali patologie non fossero presenti nel nostro gruppo. Un altro aminoacido glucogenico coinvolto e ridotto nella sua concentrazione è la serina. Secondo Zhang et al. (2017), l'arginina, il glutammato e la serina hanno anche la funzione di immunoregolatori in quanto partecipano all'attivazione delle cellule del sistema immunitario, come macrofagi, cellule Natural Killer, linfociti T e B; partecipano alla produzione di citochine, anticorpi e sostanze citotossiche; e contribuiscono allo stato di ossido-riduzione cellulare, all'espressione genica ed alla proliferazione dei linfociti. Sempre secondo tale studio, la serina e la glicina sono importanti metaboliti per il controllo dello stress ossidativo attraverso la regolazione della sintesi del glutatione.

La glicina è un aminoacido glucogenico prodotto a partire dalla colina ed aventi come intermedi nella sintesi la betaina e la dimetilglicina. Mentre la colina e la betaina risultano, in tale gruppo, ridotti nelle loro concentrazioni, si realizza un incremento della dimetilglicina, indicando una spostamento del metabolismo della colina verso la sintesi di glicina. Pertanto, si realizza un'importante influenza del ciclo metabolico denominato metabolismo della glicina, serina e treonina. Inoltre, la colina, secondo Sun et al. (2014), coadiuva al trasporto degli acidi grassi e ne promuove l'ossidazione, prevenendo l'accumulo di questi a livello epatico. Sue carenze sono, dunque, associabili a lipidosi epatica. Un altro metabolita coinvolto nella regolazione dell'ossidazione degli acidi grassi è l'allantoina, un prodotto dell'ossidazione dell'acido urico. Quest'ultimo, secondo Wang et al. (2016), è associato al metabolismo dei trigliceridi e suoi incrementi possono inibire l'attività enzimatica necessaria a catalizzare il catabolismo dei trigliceridi. All'interno del nostro gruppo, l'allantoina si presenta ridotta, indicando un potenziale incremento di acido urico con una conseguente riduzione dell'ossidazione dei trigliceridi.

In generale, l'incremento della mobilizzazione delle riserve corporee è evidenziabile da un incremento delle concentrazioni di BHB ed acetone. Infatti, il primo è un tipico prodotto

derivante dalla degradazione degli aminoacidi muscolari per la gluconeogenesi o sintetizzato dall'Acetyl-CoA e può essere utilizzato come risorsa energetica dai tessuti extraepatici. Secondo Zhang et al. (2017), è in grado di alterare la risposta infiammatoria inibendo la funzionalità dei macrofagi e riducendo la produzione di citochine proinfiammatorie. Il secondo è un altro corpo chetonico prodotto durante la chetoacidosi e derivante dall'acetoacetato. Incrementi delle concentrazioni ematiche ed urinarie di BHB, acetone ed acetoacetato si realizzano in corso di chetosi. Inoltre, secondo Basoglu et al. (2020), incrementi di BHB, acetone, glicina, valina, TMAO, citrullina ed isobutirrato, associate a riduzioni di alanina ed asparagina si riscontrano nei campioni di plasma di bovine affette da lipidosi epatica.

Nonostante queste importanti variazioni del metabolismo, la concentrazione di glucosio nel nostro gruppo permane bassa, probabilmente per l'elevata richiesta di tale metabolita a livello mammario, come descritto nei capitoli precedenti.

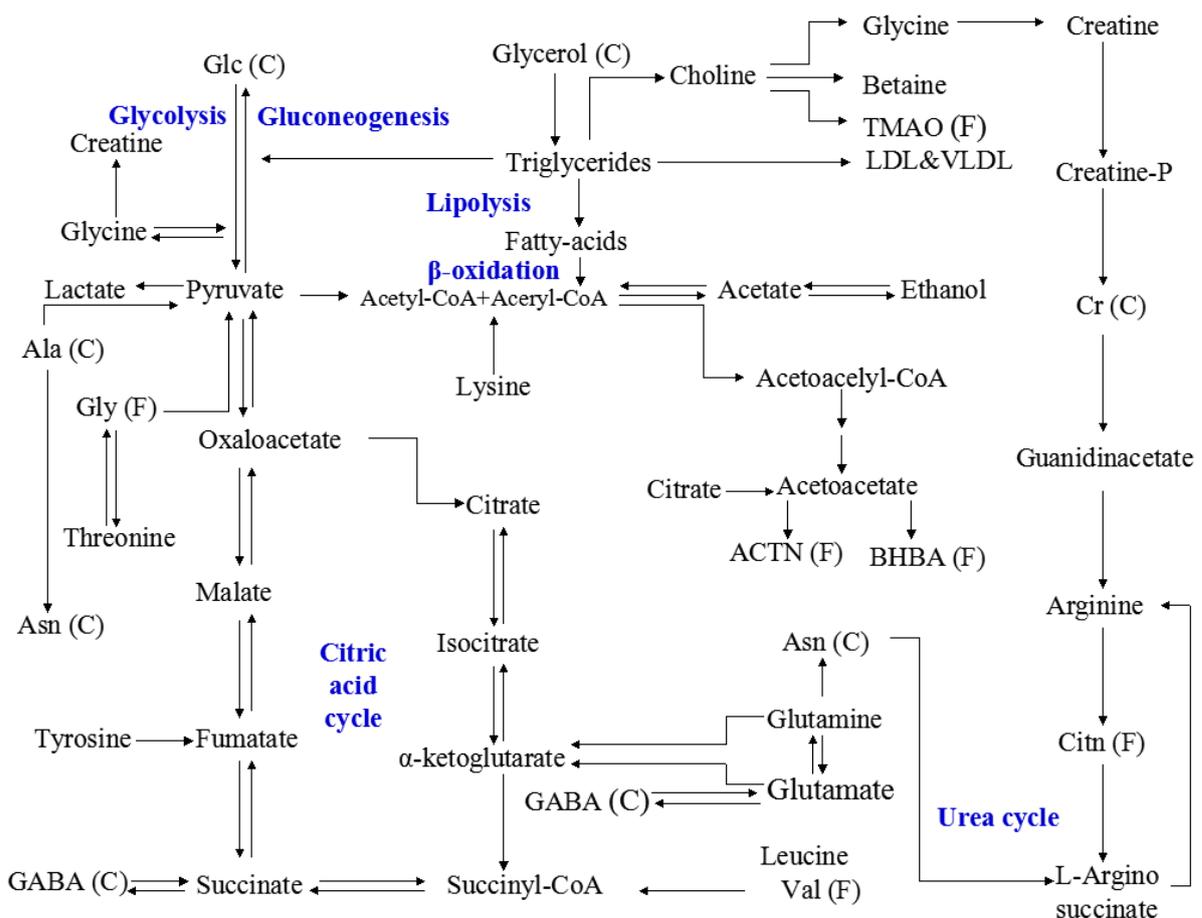


Figura 15: Rappresentazione schematica delle principali vie metaboliche coinvolte. Fonte: Xu et al. 2016

Paragonando il nostro studio a quello degli altri articoli scientifici, si è evidenziata una concordanza per alcuni metaboliti, ma non per tutti. Analogamente al nostro studio, secondo

gli studi di Wang et al. (2016) e di Zhang et al. (2017), il glutammato, la prolina ed il formiato risultano ridotti in corso di chetosi, così come, secondo gli studi di Li et al. (2014), l'arginina e, secondo gli studi di Xu et al. (2016), il glucosio. Al tempo stesso, secondo gli studi di Sun et al. (2014), risultano aumentati i corpi chetonici come l'acetone ed il BHB.

Tuttavia, secondo gli studi di Sun et al. (2014), Wang et al. (2016) e di Zhang et al. (2017), i livelli di glicina dovrebbero risultare aumentati, mentre nel nostro studio questi risultano ridotti, similmente al gruppo identificato in chetosi clinica di Wang et al. (2016). Sempre secondo quest'ultimo studio, anche l'allantoina dovrebbe risultare aumentata in corso di chetosi subclinica. Per quanto riguarda la colina, secondo gli studi di Sun et al. (2014) e di Wang et al. (2016), dovrebbe aumentare in corso di chetosi subclinica e ridursi in corso di chetosi clinica. Tuttavia, nel gruppo BHB 2 sia l'allantoina che la colina risultano ridotte. Le differenze con i nostri risultati potrebbero essere associate ad una diversa tecnica analitica per Zhang et al. (2017), in cui viene utilizzata la LC-MS anziché la $^1\text{H-NMR}$ ed a una diversa suddivisione rispetto ai valori di BHB dei gruppi analizzati per tutti gli studi sopracitati. La media di BHB nel gruppo affetto da chetosi subclinica e nel gruppo sano è, rispettivamente per gli studi di Sun et al. (2014) e di Wang et al. (2016), di 1.2 ed 1.22 mmol/L nel gruppo affetto da chetosi subclinica e di 0.74 e 0.82 mmol/L per il gruppo sano. Nel nostro studio, invece, il gruppo BHB 2 affetto da chetosi subclinica presenta un BHB medio di 1.36 mmol/L, mentre il gruppo BHB 1, che viene identificato a rischio di chetosi subclinica o di iperchetonemia, è 0.71 mmol/L, simile al valore del loro gruppo sano.

Considerando il gruppo BHB 1 si è, infatti, riscontrato un incremento della colina, necessaria al trasporto degli acidi grassi e promuovente l'ossidazione di questi, della betaina, del TMAO e della dimetilammina. Il TMAO è un'ammina derivante dal metabolismo della colina e da cui a sua volta deriva la dimetilammina. Secondo Xu et al. (2016), il TMAO deprime la glicolisi, stimola l'ossidazione degli acidi grassi ed incrementa i livelli di stress ossidativo. Inoltre, altera il metabolismo del colesterolo nell'intestino, fegato e pareti arteriose. Pertanto, le variazioni di questi metaboliti confermano un'alterazione del metabolismo lipidico. È anche presente l'incremento dell'allantoina, la quale potrebbe comportare un aumento dell'attività enzimatica per il catabolismo lipidico. I ridotti livelli di succinato potrebbero, inoltre, suggerire un iniziale stato di incremento della gluconeogenesi.

Nel gruppo BHB 0, che era stato identificato come sano, l'aspartato, l'arginina, il glutammato, la prolina e la serina permangono a livelli elevati, probabilmente per un minor utilizzo della via gluconeogenetica, così come il formiato, con una maggiore capacità, secondo gli studi di Sun et al. (2014), da parte dell'animale di contrastare le patologie infiammatorie. I ridotti livelli di etanolo, 2,3-butanediolo, 3-idrossiisobutirrato, acetone e 3-idrossibutirrato suggeriscono ulteriormente il basso livello di gluconeogenesi ed ossidazione degli acidi grassi rispetto al gruppo BHB 2. I ridotti livelli di TMAO e dimetilamina, sua derivata, potrebbero significare un ridotto metabolismo della colina e degli acidi grassi, con una glicolisi non inibita ed un metabolismo del colesterolo non alterato a livello epatico.

L'ultimo obiettivo di questo studio è la potenziale determinazione di biomarkers per la chetosi al fine di poter eseguire una diagnosi precoce. Utilizzando il gruppo BHB 0 come esempio di gruppo sano, in quanto presenta un BHB < 0.5 mmol/L, ed i gruppi BHB 1 e BHB 2 come esempio di gruppi patologici, in quanto presentano rispettivamente un BHB compreso tra 0.5 ed 1.0 mmol/L e un BHB > 1.0 mmol/L, si è valutato l'utilizzo dei metaboliti statisticamente significativi come potenziali biomarkers attraverso lo studio delle AUC. Dei 23 metaboliti analizzati, soltanto 12 presentavano un AUC > 0.7 e, pertanto, maggiormente significativi come biomarkers. Tra questi 12, due sono dei potenziali biomarkers altamente accurati (acetone AUC=0.956 e 3-idrossibutirrato AUC=0.940) e dieci moderatamente accurati (TMAO AUC=0.892, 3-idrossiisobutirrato AUC=0.830, etanolo AUC=0.814, serina AUC=0.813, 2,3-butanediolo AUC=0.786, dimetilamina AUC=0.785, metanolo AUC=0.752, formiato AUC=0.715, glutammato AUC=0.711 ed isovalerato AUC=0.706). Tra questi, l'acetone, il 3-idrossibutirrato, il TMAO ed il 3-idrossiisobutirrato sono risultati maggiormente discriminanti per l'individuazione del gruppo sano. Nel mentre, l'etanolo, il 2,3-butanediolo, la serina ed il glutammato sono risultati maggiormente discriminanti per il gruppo dei patologici. Fatta eccezione per l'acetone, tramite le *Class ROC* si è evidenziato che l'utilizzo di più metaboliti conferisce un valore predittivo superiore. Infatti, l'utilizzo dei 22 metaboliti raggiunge un valore predittivo di AUC=0.930, ma è utilizzando 3 metaboliti (acetone, 3-idrossibutirrato e TMAO) che si raggiunge il massimo valore predittivo di AUC=0.944 e, pertanto, una capacità altamente accurata come discriminante per la diagnosi precoce.

5. Conclusioni

L'analisi metabolomica tramite $^1\text{H-NMR}$ si è dimostrata un'utile strumento per lo studio dei profili metabolici correlati ai cambiamenti di β -idrossibutirrato ematico nel periodo di transizione della bovina da latte.

Durante tale studio, infatti, si sono evidenziate importanti differenze metaboliche di 23 metaboliti tra i gruppi studiati. Nel gruppo sano si è riscontrato un livello maggiore degli aminoacidi glucogenici, ridotti livelli di corpi chetonici, ridotti livelli di metaboliti coinvolti nelle fermentazioni del glucosio, come l'etanolo ed il 2,3-butanediolo, e nell'ossidazione degli acidi grassi, come la dimetilammina ed il TMAO. Nel gruppo a rischio di chetosi subclinica o di iperchetonemia, invece, i metaboliti coinvolti nell'ossidazione degli acidi grassi risultavano aumentati. Nel gruppo in chetosi subclinica o in iperchetonemia, invece, si è riscontrato un'importante incremento dei corpi chetonici e dei metaboliti coinvolti nelle fermentazioni del glucosio, mentre si è riscontrata una riduzione degli aminoacidi glucogenici.

Inoltre, si è riscontrata un'importante influenza di tre cicli metabolici, quali il metabolismo della glicina, serina e treonina; la biosintesi di neomicina, kanamicina e gentamicina; la biosintesi di aminoacil-tRNA.

Tale metodica d'indagine ha anche permesso l'identificazione di 12 metaboliti come potenziali biomarkers discriminanti tra i soggetti sani ed i soggetti affetti da chetosi subclinica. In particolare, 3 metaboliti (acetone, 3-idrossibutirrato ed TMAO) presentano il maggiore potere discriminante che, fatta eccezione per l'acetone, aumenterebbe ulteriormente se venissero utilizzati contemporaneamente. Ciò, anche unitamente con altri studi scientifici, potrebbe permettere l'attuazione di metodiche finalizzate ad una diagnosi precoce di chetosi, utile per un trattamento tempestivo al fine di salvaguardare la salute ed il benessere degli animali, ma anche la produttività di questi.

Ciò dimostra come la metabolomica possa permettere una migliore conoscenza delle patologie, della loro relativa patogenesi e lo sviluppo di metodiche di diagnostica precoce.

Nel futuro potrebbe rivelarsi interessante approfondire ulteriormente tale ricerca, anche per chiarire gli aspetti legati alla differenza della concentrazione di taluni metaboliti nel nostro gruppo in chetosi subclinica rispetto ad altri articoli scientifici. Tale approfondimento potrebbe essere eseguito tramite l'utilizzo di due o più tecniche analitiche in contemporanea

su una stessa tipologia di campione o anche tramite lo studio del metaboloma di altri biofluidi, al fine di approfondire le conoscenze relative alla patogenesi della chetosi ed allo sviluppo di metodiche per la diagnosi precoce e per un approccio terapeutico più efficace.

Bibliografija

1. Ametaj B.N. (2015). A systems veterinary approach in understanding transition cow disease: Metabolomics. Proceedings of 4th International Symposium on Dairy Cow Nutrition and Milk Quality, Session 1, Advances in Fundamental Research, May 8-10, Beijing, China. p. 78-85.
2. Baird D.G. (1982). Primary Ketosis in the High-Producing Dairy Cow: Clinical and Subclinical Disorders, Treatment, Prevention, and Outlook. *Journal of Dairy Science*, 65(1):1–10.
3. Basoglu A., Baspinar N., Tenori L., Licari C., and Gulersoy E. (2020). Nuclear magnetic resonance (NMR)- based metabolome profile evaluation in dairy cows with and without displaced abomasum. *Veterinary Quarterly*, 40(1):1-15.
4. Bauman D.E., and Currie W.B. (1980). Partitioning of Nutrients During Pregnancy and Lactation: A Review of Mechanisms Involving Homeostasis and Homeorhesis. *Journal of Dairy Science*, 63(9):1514–29.
5. Behluli B., Musliu A., Sherifi K., and Youngs C.R. (2017). Risk factors for occurrence of displaced abomasum and their relation to nutritional management of Holstein dairy cattle. *Veterinarski Arhiv*, 87(4):419-430.
6. Bell A.W. (1995). Regulation of Organic Nutrient Metabolism during Transition from Late Pregnancy to Early Lactation. *Journal of Animal Science*, 73:2804–2819.
7. Bell A.W., and Bauman D.E. (1997). Adaptations of Glucose Metabolism during Pregnancy and Lactation. *Journal Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2(3):265–278.
8. Bertoni G., Trevisi E., Han X., and Bionaz M. (2008). Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91:3300–3310.
9. Block E. (2010). Transition Cow Research – What Makes Sense Today? High Plains Dairy Conference 75–98.
10. Bobe G., Young J.W., and Beitz D.C. (2004). Invited Review: Pathology, Etiology, Prevention, and Treatment of Fatty Liver in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 87:3105-3124.
11. Box G.E.P., and Cox D.R. (2018). An Analysis of Transformations. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 26(2):211–243.

12. Burton A.J., Nydam D.V., Ollivett T.L., and Divers T.J. (2009). Prognostic indicators for nonambulatory cattle treated by use of a flotation tank system in a referral hospital: 51 cases (1997-2008). *Journal of American Veterinary Medical Association*, 234:1177-1182.
13. Butler W.R. (2010). Metabolismo energetico ed insulinoresistenza nella bovina da latte. *Large Animal Review*, 16(6):301–304.
14. Butler W.R. (2000). Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Animal Reproduction Science* 60-61: 449-457.
15. Calabro' A., Gralka E., Luchinat C., Saccenti E., and Tenori L. (2014). A metabolomic perspective on celiac disease. *Autoimmune Disease*, 2014:1-13.
16. Carraro S., Giordano G., Reniero F., Perilongo G., and Baraldi E. (2009). Metabolomics: a new frontier for research in pediatrics. *The Journal of Pediatrics*, 154(5):638-44.
17. Chapinal N., Carson M., Duffield T.F., Capel M., Godden S., Overton M.W., Santos J.E.P., and LeBlanc S.J. (2011). The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. *Journal of Dairy Science* 94: 4897–4903.
18. Chapinal N., Carson M., LeBlanc S.J., Leslie K.E., Godden S., Capel M., Santos J.E.P., Overton M.W., and Duffield T.F. (2012). The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. *Journal of Dairy Science* 95: 1301–1309.
19. Chong J., Soufan O., Li C., Caraus I., Li S., Bourque G., Wishart D.S., and Xia J. (2018). MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res*, 46(W1): W486–94.
20. Constable P.D. (2014). *Proceedings of XXVII World Buiatric Congress*. Cairns, 59-63.
21. Constable P.D., Hinchcliff K.P., Done S.H., and Grünberg W. (2017). *Veterinary Medicine, a Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Horses, Sheep, Pigs and Goats*, 11(2):1662-1757.
22. Constable P.D., Miller G.Y., Hoffsis G.F., Hull B.L., and Rings D.M. (1992). Risk factors for abomasal volvulus and left abomasal displacement in cattle, *American Journal Veterinary Research*. 53:1184-1192.
23. Contreras G.A., O'Boyle N.J., Herdt T.H., and 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(6):2508-2516.

24. Cook N.B., and Nordlund K.V. (2004). Behavioral needs of the transition cow and considerations for special needs facility design. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practise*, 20: 495–520.
25. De Garis P.J., and Lean I.J. (2009). Milk fever in dairy cows: a review of pathophysiology and control principles. *Veterinary Journal*, 176:58-59.
26. Di Ciommo F. XXI Ciclo. Metabolismo minerale della bovina da latte in transizione: impatto sull'efficienza riproduttiva. Università degli studi di Parma, XXI ciclo di dottorato.
27. Dieterle F., Ross A., Schlotterbeck G., and Senn H. (2006). Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in ¹H NMR metabonomics. *Analytical Chemistry*, 78(13), 4281–4290.
28. Dirksen G. (1962). *Vorbetrachtungen zur Topographie, Die Erweiterung, Verlagerung und Drehung des Lebmages beim Rind*, Verlag Paul Parey, Berlin and Hamburg.
29. Dirksen G., Gründer H., and Stöber M. (2004). *Medicina Interna e Chirurgia del Bovino*, 1ª edizione italiana, Milano, Italia, Le Point Vétérinaire Italir srl, pp. 649-664, 863-871.
30. Divers T.J., and Peek S.F. (2007). *Rebhun's disease of dairy cattle*. 2 edizione Saunders, pages 402-416.
31. Doepel L., Lapierre H., and 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.
32. Dohmen M.J. (2005). Effect of retained placenta on postpartum reproduction performance of Frisian cows. *Egyptian Journal of Animal Production*, 40:111-121.
33. Drackley J. K. (1999). Biology of Dairy Cows During the Transition Period: The Final Frontier? *Journal of Dairy Science* 82(11): 2259–73.
34. Drackley J.K., Dann H.M., Douglas G.N., Janovick–Guretzky N.A., Litherland N.B., Underwood J.P., and Looor J.J. (2005) Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Italian Journal of Animal Science*, 4: 323–344.
35. Drackley J.K., Overton T.R., and Douglas G.N. (2001). Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science* 84: 1231-1237.
36. Duffield T. (2000). Subclinical Ketosis in Lactating Dairy Cattle. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 16(2):231–253.

37. Duffield T.F., Lissemore K.D., McBride B.W. and Leslie K.E. (2009). Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *Journal of Dairy Science*, 92:571–580.
38. Edgerton L.A., and Hafs H.D. (1973). Serum luteinizing hormone, prolactin, glucocorticoid, and progesterin in dairy cows from calving to gestation. *Journal of Dairy Science*, 56(4):451–458.
39. Edmonson A.J., Lean I.J., Weaver L.D., Farver T., and Webster G. (1989). A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 72(1):68–78.
40. Elsasser T.H., Klasing K.C., Filipov N., and Thompson F. (2000). The metabolic consequences of stress: Targets for stress and priorities of nutrient use. CABI Publishing, pp. 77–110.
41. Esposito G., Irons P.C., Webb E.C., and Chapwanya A. (2014). Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 144:60-71.
42. Ferguson J.D. (1987). Body Condition Scoring. Review.
43. Fiehn O. (2002). Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48:155-171.
44. Fiore E., Piccione G., Giancesella M., Pratico V., Vazzana I., Dara S., and Morgante M. (2015). Serum thyroid hormone evaluation during transition periods in dairy cows. *Arch. Anim. Breed.*, 58:403–406.
45. Fox F.H. (1971). Clinical Diagnosis and Treatment of Ketosis. *Journal of Dairy Science*, 54(6):974–978.
46. Geishauser T., Leslie K., and Duffield T. (2000). Metabolic Aspects in the Etiology of Displaced Abomasum. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 16(2): 255–265.
47. Geishauser T., Leslie K., Kelton D., and Duffield T. (2001). Monitoring for Subclinical Ketosis in Dairy Herds. *Compendium on continuing education for the practising veterinarian- North American Edition*, 23(8):65–71.
48. Geisler C.E., and Renquist B.J. (2017). Hepatic lipid accumulation: Cause and consequence of dysregulated gluoregulatory hormones. *Journal of Endocrinology*, 234(1): R1–R21.
49. Goff J.P. (2006). Major Advances in Our Understanding of Nutritional Influences on Bovine Health. *Journal of Dairy Science* 89(4): 1292–1301.

50. Goff J.P. (2008). The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *The Veterinary Journal*, 176:50-57.
51. Goff J.P. (2014). Calcium and Magnesium Disorders. *Veterinary Clinician of North America: Food Animal Practice*, 30(2):359-81.
52. Goff J.P., and Horst R.L. (1997). Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *Journal of Dairy Science* 80: 1260-1268.
53. Goff J.P., Horst R.L., Jardon P.W., Borelli C., and Wedam J. (1996). Field trials of oral calcium propionate as an aid to prevent milk fever in preparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* 3, 378–383.
54. Goldansaz S.A., Guo A.C., Sajed T., Steele M.A., Plastow G.S., and Wishart D.S. (2017). Livestock metabolomics and the livestock metabolome: a systematic review. *PLoS One*, 12(5): e0177675.
55. Grant R.J., and Albright J.L. (1995). Feeding Behavior and Management Factor During the Transition Period in Dairy Cattle. *Journal of Animal Science*, 73:2791–2803.
56. Green D.A., Brink D.R., and Bauer M.L. (1994). Characterization of Feed Intake and Estradiol-17 β during Gestation and Lactation in Twin-Bearing Ewes. *Small Ruminant Research* 13(2): 153–158.
57. Grummer R.R. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of Animal Science*, 73:2820–2833.
58. Grummer R.R., Mashek D.G., and Hayirli A. (2004). Dry Matter Intake and Energy Balance in the Transition Period. *Veterinary Clinician of North America Food Animal Practice*, 20:447–470.
59. Grummer R.R., Sandra J., Bertics J., Lacount W., Snow J.A., Dentine M.R., and Stauffacher R.H. (1990). Estrogen Induction of Fatty Liver in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 73(6):1537–1543.
60. Guyot H., Detilleux J., Lebreton P., Garnier C., Bonvoisin M., Rollin F., and Sandersen C. (2017). Comparison of Various Indices of Energy Metabolism in Recumbent and Healthy Dairy Cows. *PloS one*, 12(1): e0169716.
61. Hammon D.S., Evje I.M., Dhiman T.R., Goff J.P., and Walters J.L. (2006). Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113(1–2):21–29.

62. Harris D.J. (1981). Factors predisposing to parturient paresis. *Australian Veterinary Journal*, 57:357–361.
63. 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.
64. Heuer C., Schukken Y.H., and Dobbelaar P. (1999). Postpartum 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.
65. Hollywood K., Brison D.R., and Goodacre R. (2006). Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics*, 6:4716-4723.
66. Holtenius P., and Traven M. (1990). Impaired glucose tolerance and heterogeneity of insulin responses in cows with abomasal displacement. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe A*, 37: 445.451.
67. Hoult D.I. (2011). The principle of reciprocity. *Journal of Magnetic Resonance*, 213: 344-346.
68. Houseknecht K.L., Dwyer D.A., Lanna D.P.D., and Bauman D.E. (1995). Effect of Somatotropin on Adipose Tissue Metabolism: Ontogeny of the Enhanced Response to Adrenergic Challenge in the Lactating Cow. *Domestic Animal Endocrinology*, 12(1):105–113.
69. Hubert M., Rousseeuw P.J., and Vanden Branden K. (2005). ROBPCA: A new approach to robust principal component analysis. *Technometrics*, 47(1):64–79.
70. Hugel T., Kovacs H., Heijen I.A.F.M., Daikeler T., Baisch U., Hicks J.M., and Valderrabano V. (2012). Synovial fluid metabolomics in different forms of arthritis assessed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 30(2):240-5.
71. Huzzey J.M., Veira D.M., Weary D.M., and von Keyserlingk M.A.G. (2007). Prepartum Behavior and Dry Matter Intake Identify Dairy Cows at Risk for Metritis. *Journal of Dairy Science*, 90(7):3220–3233.
72. Ingvartsen K.L., Dewhurst R.J., and Friggens N.C. (2003). On the Relationship between Lactational Performance and Health: Is It Yield or Metabolic Imbalance That Cause Production Diseases in Dairy Cattle? A Position Paper. *Livestock Production Science*, 83(2–3): 277–308.

73. Jaster E.H., and Wegner T.N. (1981). Beta-Adrenergic Receptor Involvement in Lipolysis of Dairy Cattle Subcutaneous Adipose Tissue During Dry and Lactating State. *Journal of Dairy Science*, 64(8):1655–1663.
74. Jones O.A.H., and Cheung V.L. (2007). An introduction to metabolomics and its potential application in veterinary science. *Comparative medicine*, 57(5):436-442.
75. Joosten I., Sanders M.F., and Hensen E.J. (1991). Involvement of major histocompatibility complex class I compatibility between dam and calf in the aetiology of bovine retained placenta. *Animal Genetics* 22(6):455-463.
76. Joyce A.R., and Palsson B. (2006). The model organism as a system: integrating 'omics' data sets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7:198-210.
77. Jubb T.F., Malmo J., Davis G.M., and Vawser A.S. (1991). Left-side displacement of the abomasum in dairy cows at pasture. *Australian Veterinary Journal*, 68:140-142.
78. Kahn C.R. (1978). Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: A necessary distinction. *Metabolism*, 27:1893–1902.
79. Karcagi R.G., Gaál T., Wágner L., and Husvéth F. (2008). Effect of various dietary fat supplementations on liver lipid and glycogen of high-yielding dairy cows in the peripartal period. *Acta Veterinaria Hungarica* 56:57–70.
80. Kim Ill-H., and Suh G.H. (2003). Effect of the amount of body condition loss from the dry to near calving periods on the subsequent body condition change, occurrence of postpartum diseases, metabolic parameters and reproductive performance in holstein dairy cows. *Theriogenology*, 60(8):1445–1456.
81. Kimura K., Goff J.P., Kehrl M.E., and Reinhardt T.A. (2002). Decreased Neutrophil Function as a Cause of Retained Placenta in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science* 85(3): 544–550.
82. Kimura K., Reinhardt T.A., and Goff J.P. (2006). Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 89, 2588–2595.
83. Kirwan J. 2014. Metabolomics for the practising vet. In *Practise*, 35:438-445.
84. Kneen M.A., and Annegarn H.J. (1996). Algorithm for fitting XRF, SEM and PIXE X-ray spectra backgrounds. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 109–110, 209–213.
85. Lacetera N., Franci O., Scalia D., Bernabucci U., Ronchi B., and Nardone A. (2002). Effects of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate on functions of mononuclear cells obtained from ewes. *American Journal of Veterinary Research*, 63(3):414–418.

86. Lanna D.P.D., and Bauman D.E. (1999). Effect of Somatotropin, Insulin, and Glucocorticoid on Lipolysis in Chronic Cultures of Adipose Tissue from Lactating Cows. *Journal of Dairy Science*, 82(1):60–68.
87. Laven R.A., and Peters A.R. (1996). Bovine retained placenta: aetiology, pathogenesis and economic loss. *Veterinary Record*, 139:465-471.
88. LeBlanc S.J., Leslie K.E., and Duffield T.F. (2005). Metabolic Predictors of Displaced Abomasum in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 88(1):159–170.
89. Liland K.H., Almøy T., and Mevik B.H. (2010). Optimal choice of baseline correction for multivariate calibration of spectra. *Applied Spectroscopy*, 64(9):1007–1016.
90. Li Y., Xu C., Xia C., Zhang H., Sun L., and Gao Y. (2014). Plasma metabolite profiling of dairy cows affected with clinical ketosis using LC/MS technology. *Veterinary Quarterly*, 34(3):152-158.
91. Madsen R., Lundstedt T., and Trygg J. (2010). Chemometrics in metabolomics – a review in human disease diagnosis. *Analytica Chimica Acta*, 659:23-33.
92. McArt J.A.A., Nydam D.V., Oetzel G.R., Overton T.R., and Ospina P.A. (2013). Elevated non-esterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *Veterinary Journal*, 198:560–570.
93. McIlwraith C.W., Kawcak C.E., Frisbie D.D., Little C.B., Clegg P.D., Peffers M.J., Karsdal M.A., Ekman S., Laverty S., Slayden R.A., Sandell L.J., Lohmander L.S., and Kraus V.B. (2018). Biomarker for equine joint injury and osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*, 36(3):823-831.
94. McNamara J.P., and Hillers J. K. (1986). Adaptations in lipid metabolism of bovine adipose tissue in lactogenesis and lactation. *Journal of Lipid Research*, 27:150–157.
95. 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.
96. Melendez P., Donovan A., Risco C.A., Hall M.B., Littell R., and Goff J. (2002). Metabolic responses of transition Holstein cows fed anionic salts and supplemented at calving with calcium and energy. *Journal of Dairy Science*, 85:1085–1092.
97. Ménard L., and Thompson A. (2007). Milk fever and alert downer cows: does hypophosphatemia affect the treatment response? *Canadian Veterinary Journal*, 48:487-4919.

98. Mendiburu De F. (2012). *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*.
99. Moe P.W., and Tyrrell H.F. (1972). Metabolizable Energy Requirements of Pregnant Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 55(4):480–483.
100. Nelson D.L., and Cox M.M. (2006). *I principi di biochimica di Lehninger*. Zanichelli, pagine 530-567; 612-668.
101. Nicholson J.K., Holmes E., and Lindon J.C. (2007). *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*. Elsevier Science, pages 1-33.
102. Nicholson J.K., Lindon J.C., and Holmes E. (1999). 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological nmr spectroscopic data. *Xenobiotica*, 29:11.
103. Nicholson J.K., and Wilson I.D. (2003). Understanding global systems biology: metabolomics and the continuum of metabolism. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2:668-676.
104. Ospina P.A., Nydam D.V., Stokol T., and Overton T.R. (2010). Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level. *Journal of Dairy Science* 93: 3595-3601.
105. Paganini M., and Serafini C. (2004). *Il periodo di transizione nella vacca da latte*. Point Veterinaire, Italia.
106. Poulton P.J. (2014). *Proceedings of XXVIII World Buiatrics Congress*, 212-218.
107. Qu Y., Fadden A.N., Traber M.G., and Bobe G. (2014). Potential Risk Indicators of Retained Placenta and Other Diseases in Multiparous Cows. *Journal of Dairy Science*, 97(7):4151–4165.
108. Quiroz-Rocha G.F., LeBlanc S., Duffield T., Wood D., Leslie K.E., and Jacobs R.M. (2009). Evaluation of prepartum serum cholesterol and fatty acids concentrations as predictors of postpartum retention of the placenta in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 234(6):790–793.
109. R Core Team. (2018). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria.
110. Reinhardt T.A., Lippolis J.D., McCluskey B.J., Goff J.P., and Horst R.L. (2011). Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *The Veterinary Journal* 188: 122–124.

111. Reynolds, L.P., Ferrell C.L., Robertson D.A., and Ford S.P. (1986). Metabolism of the gravid uterus, foetus and utero-placenta at several stages of gestation in cows. *The Journal of Agricultural Science*, 106(3):437–444.
112. Robertson D.G., Reily M., and Baker J.D. (2007). Metabonomics in pharmaceutical discovery and development. *Journal of Proteome Research*, 6:526-539.
113. Scott P.R., Penny C.D., and Macrae A.I. (2011). *Cattle Medicine*. 1 edizione CRC Press, pages 17-27; 248-258.
114. Shahzad K. (2017). *Systems physiology and nutrition in dairy cattle: applications of omics and bioinformatics to better understand the hepatic metabolomics and transcriptomics adaptations in transition dairy cows*, University of Illinois at Urbana-Champaign.
115. Sheldon I.M. (2011). Mechanisms of infection and immunity in the bovine female genital tract post-partum. *Dairy symposium proceedings*; Milwaukee, Wisconsin.
116. Sheldon I.M., Lewis G.S., LeBlanc S., and Gilbert R.O. (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, 65(8):1516–1530.
117. Sheldon I.M., and Owens S.E. (2017). Postpartum uterine infection and endometritis in dairy cattle. *Animal Reproduction*, 14:622-629.
118. Sherwood L., Klandhorf H., and Yancey P. (2006). *Fisiologia degli animali*. Zanichelli, Bologna.
119. Singh B., Mal G., Gautam S.K., and Mukesh M. (2019). Metabolomics in livestock sciences. *Advances in Animal Biotechnology*, pages 397-403.
120. Sjaastad V., Sand O., and Hove K. (2013). *Fisiologia degli animali domestici*. Casa Editrice Ambrosiana, pp. 212-250.
121. Sordillo L.M., and Aitken S.L. (2009). Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128:104–109.
122. Starke A., Schmidt S., Haudum A., Scholbach T., Wohlsein P., Beyerbach M., and Rehage J. (2011). Evaluation of portal blood flow using transcutaneous and intraoperative Doppler ultrasonography in dairy cows with fatty liver. *Journal of Dairy Science*, 94:2964–2971.
123. Stull C.L., Payne M.A., Berry S.L., and Reynolds J.P. (2007). A review of the causes, prevention, and welfare of nonambulatory cattle. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 231:227-234.

124. Sun L.W., Zhang H.Y., Wu L., Xia C., Xu C., and Zheng J.S. (2014). ¹H-Nuclear magnetic resonance-based plasma metabolic profiling of dairy cows with clinical and subclinical ketosis. *Journal of Dairy Science*, 97:1552-1562.
125. Swets J.A. (1998). Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*, 240:1285-1293.
126. Thirumalaisamy G., Muralidharan J., Senthilkumar S., Sayee H., and Priyadharsini M. (2016). Blood metabolomics for detection of metabolic disorders in dairy animals. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 5(6):4575-4579.
127. Trevisi E., Han X.T., Piccioli-Cappelli F., and Bertoni G. (2002). Intake reduction before parturition affects milk yield and metabolism in dairy cows. Page 54 in Proc. 53rd Annu. Mtg. EAAP, Cairo, Egypt. Y. van der Honing, ed. Wageningen Acad. Publ., Wageningen, the Netherlands.
128. Tucho T.T., and Ahmed W.M. (2017). Economic and Reproductive Impacts of Retained Placenta in Dairy Cows. *Journal of Reproduction and Infertility*, 8(1): 18-27.
129. Turner M.L., Cronin J.G., Noleto P.G., and Sheldon I.M. (2016). Glucose availability and AMP-activated protein kinase link energy metabolism and innate immunity in the bovine endometrium. *PLOS One*, 11: e0151416.
130. Van Saun J.R. (1991). Dry cow nutrition: The key to improve fresh cow performance. *Veterinary Clinics of North America* 7: 599–620.
131. Van Saun J. (2016). Indicators of dairy cow transition risks: Metabolic profiling revisited, *Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere*.
132. Van Winden S.C., Jorritsma R., Muller K.E., and Noordhuizen J.P. (2003). Feed intake, milk yield and metabolic parameters prior to left displaced abomasums in dairy cows. *J Dairy Sci.*, 86:1465–1471.
133. Vazquez-Añon M., Bertics S., Luck M., Grummer R. R., and Pinheiro J. (1994). Peripartum Liver Triglyceride and Plasma Metabolites In Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 77:1521–1528.
134. Wang Y., Gao Y., Xia C., Zhang H., Qian W., and Cao Y. (2016). Pathway analysis of plasma different metabolites for dairy cow ketosis. *Italian Journal of Animal Science*, 15(3):545-551.

135. Wittrock J.M., Proucifoot K.L., Weary D.M., and Von Keyserlingk M.A.G. (2011). Short communication: metritis affects milk production and cup rate of Hosten multiparous cows differently. *Journal of Dairy Science*, 94:2408-2412.
136. Xu C., Sun L., Xia C., Zhang H., Zheng J., and Wang J. (2016). ¹H-Nuclear Magnetic Resonance-based plasma metabolic profiling of dairy cows with fatty liver. *Asian Australas Journal of Animal Science*, 29(2):219-229.
137. Youngquist R.S., and Threlfall W.R. (2007). *Current Therapy in large Animal Theriogenology*, 2nd ed., Saunders, and imprint of Elsevier Inc, USA.
138. Zachary J.F. (2016). *Pathologic basis of veterinary disease*. Elsevier, pages 438-457.
139. Zarrin M., Grossen-Rosti L., Bruckmaier R.M., and Gross J.J. (2017). Elevation of blood beta-hydroxybutyrate concentration affects glucose metabolism in dairy cows before and after parturition. *J. Dairy Sci.* 100, 2323–2333.
140. Zarrin M., Wellnitz O., van Dorland H.A., Gross J.J., and Bruckmaier R.M. (2014). Hyperketonemia during lipopolysaccharide-induced mastitis affects systemic and local intramammary metabolism in dairy cows. *J Dairy Sci.* 97(6):3531–3541.
141. Zhang G., Dervishi E., Dunn S.M., Mandal R., Liu P., Han B., Wishart D.S., and Ametaj B.N. (2017). Metabotyping reveals distinct metabolic alterations in ketotic cows and identifies early predictive serum biomarkers for the risk of disease. *Metabolomics*,13:43.
142. Zhang G., Hailemariam D., Dervishi E., Goldansaz S.A., Deng Q., Dunn S.M. and Ametaj B. N. (2016). Dairy cows affected by ketosis show alterations in innate immunity and lipid and carbohydrate metabolism during the dry off period and postpartum. *Research in Veterinary Science*, 107, 246–256.
143. Zhang H., Wu L., Xu C., Xia C., Sun L., and Shu S. (2013). Plasma metabolomic profiling of dairy cows affected with ketosis using gas chromatography mass spectrometry. *BioMedical Central Veterinary Research*, 9:186.
144. Zhao F.Q., Moseley W.M., Tucker H.A., and Kennelly J.J. (1995). Regulation of Glucose Transporter Gene Expression in Mammary Gland, Muscle, and Fat of Lactating Cows by Administration of Bovine Growth Hormone and Bovine Growth Hormone-Releasing Factor. *Journal Animal Science*, 74:183–89.
145. Zheng K., Shen N., Chen H., Ni S., Zhang T., Hu M., Wang J., Sun L., and Yang X. (2017). Global and targeted metabolomics of synovial fluid discovers special osteoarthritis metabolites. *Journal of Orthopaedic Research*, 35(9):1973-1981.

146. Zhu C. (2018). ^1H -NMR spectroscopy to investigate the connection between food characteristics and health. Giornata del dottorato 2018-Curriculum in Scienze e Biotecnologie degli alimenti.
147. Zhu C., Faillace V., Laus F., Bazzano M., and Laghi L. (2018). Characterization of trotter horses urine metabolome by means of proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Metabolomics*, 14(8):106.

Sitografia

1. <https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>