



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

Dottorato di Ricerca in
PRODUZIONI ANIMALI, BIOTECNOLOGIE VETERINARIE, QUALITÀ E
SICUREZZA DEGLI ALIMENTI

XXIV CICLO

Alimentazione e fertilità nella bovina da latte

Nutrition and fertility in dairy cows

Coordinatore:

Chiar.ma Prof.ssa Paola Superchi

Tutor:

Chiar.mo Prof. Afro Quarantelli

Chiar.mo Prof. Federico Righi

Dottorando: Dott. Rossi Federico

Anno 2010-2011

ABSTRACT

Nutrition has an important impact on the reproductive performance of dairy cattle.

Energy is the major nutrient required by adult cattle and inadequate energy intake has a detrimental impact on reproductive activity of bovine. Cows under negative energy balance have extended periods of anovulation. Postpartum anestrus, as well as infertility, is magnified by losses of body condition during the early postpartum period. Resumption of ovulatory cycles is associated with energy balance, but seems to be mediated by a rise in plasma IGF-I; which is linked to nutritional status and concentrations of insulin in blood.

Feeding diets that promote higher plasma glucose and insulin may improve the metabolic and endocrine status of cows. Feeding behavior of dairy cows during the transition period, particularly a decline in feed intake prior to calving, is associated with risk of postpartum uterine disease, such as metritis. Because metritis has a profound negative effect on risk of pregnancy in dairy cows, providing adequate bunk space and environment to maximize feed intake is expected to minimize the risk of uterine diseases and improve fertility.

The aim of this thesis was to investigate the relationships between nutrition and management on reproductive efficiency and metabolism of transition dairy cows.

The first study used lactating dairy cows to examine the effects of silymarin from Milk Thistle on metabolism, production, milk composition and fertility of dairy cows.

The second experiment investigated the effects of salicin from willow on metabolism, production and milk composition. The reproductive indices were also been collected.

In the last study, length of dry period was correlated with body condition score and energy balance of transition cows. Furthermore, the relationship between dry period length and performance of dairy cows was examined (production, milk composition and fertility).

INDICE

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE AI PRINCIPALI MECCANISMI ENDOCRINI CHE REGOLANO IL RAPPORTO ALIMENTAZIONE-FERTILITA'

- 1.1) Cenni di fisiopatologia e adattamenti metabolici della bovina da latte in fase di transizione pag. 1
- 1.2) Influenza delle variazioni metabolico-ormonali del periodo di transizione sulla fertilità della bovina pag. 5
 - 1.2.1 Attività regolatoria a controllo centrale pag. 7
 - 1.2.2 Attività regolatoria a controllo periferico pag. 7
 - a) Insulina pag. 9
 - b) Sistema IGF e ormone della crescita (GH) pag. 12
 - c) Leptina pag. 16
 - d) Grelina pag. 25

CAPITOLO 2

INFLUENZA DEL BILANCIO ENERGETICO E DEL BODY CONDITION SCORE (BCS) SULL'EFFICIENZA RIPRODUTTIVA DELLA BOVINA

- 2.1) Principali variazioni metabolico-ormonali indotte dal bilancio energetico negativo pag. 26
- 2.2) Bilancio energetico negativo e funzionalità riproduttiva
 - 2.2.1 Qualità dell'oocita e dell'embrione pag. 29
 - 2.2.2 Condizioni uterine post-parto pag. 31
- 2.3) Variazioni del Body Condition Score (BCS) ed effetto sulla fertilità pag. 32

CAPITOLO 3

SUPPLEMENTAZIONE DI ACIDI GRASSI NELLA DIETA: RAPPORTO CON LA FERTILITA'

- 3.1) Effetto dei lipidi sulla secrezione degli ormoni riproduttivi, sulla dinamica follicolare e la qualità dell'embrione pag. 35
 - 3.1.1 Bilancio Energetico pag. 36
 - 3.1.2 Insulina pag. 36
 - 3.1.3 Steroidogenesi pag. 37
 - 3.1.4 Sintesi di prostaglandina F2 α pag. 38
- 3.2) Influenza dei lipidi inclusi nella razione sulle performance riproduttive pag. 43

CAPITOLO 4

LIVELLO PROTEICO DELLA DIETA, DEGRADABILITA' RUMINALE DELLE PROTEINE E LIVELLO DI UREA EMATICA: EFFETTO SULLA CAPACITA' RIPRODUTTIVA DELLA BOVINA

- 4.1) Variazione delle caratteristiche del fluido follicolare pag. 45
- 4.2) Modificazioni a carico dell'ambiente uterino pag. 46
- 4.3) Variazione della concentrazione plasmatica di progesterone pag. 48
- 4.4) Effetto della concentrazione di urea nel latte sui parametri riproduttivi pag. 48
- 4.5) Interazione tra l'eccesso di proteine nella dieta e il bilancio energetico negativo pag. 49

CAPITOLO 5

EFFETTO DELL'INTEGRAZIONE VITAMINO-MINERALE SULLA FERTILITA' DELLA BOVINA DA LATTE

- 5.1) Vitamina E e selenio (Se) pag. 51
- 5.2) Vitamina A e beta-carotene pag. 54
- 5.3) Minerali pag. 56

CAPITOLO 6

PARTE SPERIMENTALE

PROVA 1 Utilizzo di molecole/nutrienti con attività migliorativa sul metabolismo di bovine da latte in fase di transizione: Estratto di "*Sylibum marianum*" pag. 57

PROVA 2 Utilizzo di molecole/nutrienti con attività migliorativa sul metabolismo di bovine da latte in fase di transizione: Estratto di "*Salix alba*" pag. 68

PROVA 3 Monitoraggio della situazione produttiva, dell'efficienza riproduttiva e della gestione del periodo di asciutta in un allevamento di bovine di razza Bruna Italiana sito nel comprensorio del formaggio Parmigiano-Reggiano pag. 76

Bibliografia

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE AI PRINCIPALI MECCANISMI ENDOCRINI CHE REGOLANO IL RAPPORTO ALIMENTAZIONE-FERTILITA'

1.1 Cenni di fisiopatologia e adattamenti metabolici della bovina da latte in fase di transizione

La vacca da latte durante il periodo di transizione è sottoposta ad importanti variazioni fisiologiche che saranno determinanti per lo stato di salute, la produttività e la fertilità nel corso della lattazione successiva.

Durante gli ultimi 20 giorni di gravidanza si osserva un aumento dei fabbisogni energetici e proteici mediato dallo sviluppo fetale. La richiesta energetica per lo sviluppo del feto, in una bovina di razza frisona, si attesta intorno a 2,3 Mcal NEI/die (Bell, 1995). In particolare il 35-40% del fabbisogno fetale viene coperto dal glucosio, il 55% dagli aminoacidi e il restante 5-10% dall'acido acetico.

Già a partire da alcuni giorni prima del parto, i cambiamenti omeoretici causano importanti variazioni a carico del tessuto mammario, con sviluppo cellulare, incremento del flusso ematico e conseguente aumento della capacità secretoria delle cellule alveolari.

L'elevata richiesta di nutrienti per la galattopoiesi è mediata da variazioni nei tessuti periferici e esita in una mobilitazione o in una formazione di nutrienti per supportare la produzione di latte. Questa mobilitazione di nutrienti porta l'animale in una condizione di bilancio negativo dei nutrienti, in particolare bilancio energetico negativo (NEB).

Durante l'ultimo periodo di gestazione l'assunzione di sostanza secca diminuisce drasticamente nonostante l'aumento dei fabbisogni dovuto allo sviluppo fetale. Questa down-regulation dell'appetito è mediata in particolar modo da tre fattori:

- 1) Incremento della concentrazione ematica di ormoni sessuali
- 2) Incremento della lipomobilizzazione
- 3) Ingombro addominale del feto e ridotta capacità dilatativa del rumine

All'inizio della lattazione l'appetito dell'animale aumenta a causa dell'incremento dei fabbisogni produttivi ed è mediato dal sistema nervoso centrale stimolato da segnali ormonali (es. citochine).

Al momento del parto la concentrazione del progesterone ematico diminuisce drasticamente, mentre si assiste ad un aumento rapido del livello di estrogeni. Questa variazione è considerata uno dei maggiori fattori che contribuiscono alla riduzione dell'assunzione di sostanza secca (DMI) durante l'inizio della

lattazione (Grummer, 1993). Normalmente l'assunzione di alimento durante le ultime tre settimane di asciutta è ridotta del 10-30% rispetto all'inizio del medesimo periodo (Friggens, 2003).

La ridotta DMI alla fine dell'asciutta e nelle prime settimane di lattazione non permette alla bovina di soddisfare i suoi bisogni energetici solo con la dieta, ma stimola l'organismo ad utilizzare le riserve lipidiche e muscolari per produrre glucosio. La gluconeogenesi è mediata soprattutto dalla continua richiesta (insulino-indipendente) di glucosio da parte della ghiandola mammaria per la produzione del lattosio (Drackley et al., 2001).

L'alto rapporto GH/insulina ematici permette la mobilitazione degli acidi grassi a lunga catena dalle riserve adipose. Questi acidi grassi circolanti (NEFA) sono la più importante fonte di energia per la bovina durante le prime settimane di lattazione.

La concentrazione ematica di NEFA è quindi direttamente correlata ad una situazione di bilancio energetico negativo post-parto (Bell, 1995).

Il meccanismo della lipolisi è controllato da segnali endocrini mediati da epinefrina e norepinefrina, che aumentano di intensità durante il parto e durante la manifestazione di un qualsiasi fattore stressante. Di conseguenza, lo stress e un errato management alimentare possono causare riduzione della DMI con bilancio energetico negativo (NEB) e aumento dei NEFA circolanti (McNamara, 1991).

I NEFA presenti in circolo vengono metabolizzati nel fegato, attraverso 3 vie principali:

- 1) Ossidazione completa con produzione di energia per il fegato
- 2) Ossidazione parziale con produzione di corpi chetonici, fonte di energia per altri tessuti
- 3) Riconversione a grassi di deposito (trigliceridi)

L'associazione tra elevata riconversione in trigliceridi e bassa produzione di lipoproteine a bassa densità (VLDL), necessarie al trasporto in circolo dei trigliceridi, porta ad un accumulo di lipidi nel fegato caratteristico della bovina in transizione. Questa situazione fisiologica può diventare patologica a seconda del livello di NEFA in circolo e dell'entità della captazione degli stessi da parte del fegato.

Il mantenimento di un'ottimale funzionalità epatica durante il periodo di transizione è fondamentale per la salute e le performance della bovina durante la lattazione.

L'accumulo di lipidi negli adipociti condiziona negativamente la loro attività metabolica. In particolare sembra che ad un accumulo di trigliceridi nel fegato si associno una minor capacità di convertire l'ammoniaca in urea (Strang et al., 1998).

Questa alterazione si verifica soprattutto nelle bovine che hanno da poco partorito e, secondo alcuni studi (Overton et al., 1999; Drackley et al., 2001), potrebbe essere uno dei fattori responsabili della variazione negativa nella gluconeogenesi epatica.

Fattore chiave della prima settimana dopo il parto è la capacità della bovina di rispondere adeguatamente alla continua domanda di glucosio per la produzione di latte. È stato stimato che la fornitura di glucosio derivante dalla fermentazione ruminale dei carboidrati potrebbe sopperire alla domanda fisiologica di glucosio di circa 500 g/die (Drackley et al., 2001). Rientrano in questi processi anche alcuni aminoacidi e il glicerolo derivante dalla lipomobilizzazione.

L'inizio della lattazione porta inoltre ad una notevole domanda di calcio per la produzione di latte. Come risposta si arriva ad un aumento dell'assorbimento intestinale di minerali e ad una maggior mobilizzazione dalle ossa, processi fondamentali per il mantenimento della lattazione (Horst et al., 1994). L'ipocalcemia subclinica che si viene a creare può portare ad un aumento dei livelli di cortisolo in circolo e ad un possibile aumento di incidenza della ritenzione placentare (Goff, 1999).

Durante il periodo di transizione spesso si ha una forte depressione della funzionalità del sistema immunitario. La riduzione della capacità immunitaria di rispondere all'azione dei microorganismi è alla base della maggior incidenza di alcune patologie (soprattutto mastiti e metriti). Questa riduzione nella risposta immunitaria è imputabile a diversi fattori, molti dei quali di origine alimentare (Mallard et al., 1998). In particolare sembra che un ruolo preponderante venga svolto dall'integrazione minerale-vitaminica, dal bilancio energetico negativo e dalla carenza di proteina metabolizzabile (Goff, 1999).

Processo metabolico	Risposta	Tessuto maggiormente coinvolto
Sintesi di latte	> Numero di cellule mammarie secretorie > Flusso di sangue in mammella > Consumo di nutrienti	Tessuto mammario
Metabolismo dei lipidi	< Sintesi di lipidi < Assorbimento di acidi grassi < Esterificazione degli acidi grassi > Lipolisi > Utilizzo dei lipidi come energia	Tessuto adiposo
Metabolismo del glucosio	> Dimensioni del fegato > Flusso di sangue al fegato > Tasso di gluconeogenesi < Utilizzo del glucosio come energia	Fegato
Metabolismo delle proteine	< Sintesi di proteine muscolari > Sintesi di proteine in altri tessuti > Proteolisi	Tutti i tessuti
Metabolismo minerale	> Assorbimento > Mobilizzazione	Intestino Tessuto osseo
Assunzione di alimento (DMI)	> DMI	Sistema nervoso centrale
Digestione	> Ipertrofia del tratto digerente > Tasso e capacità di assorbimento > Attività metabolica	Tratto gastro-intestinale

Tabella 1: Elenco dei più importanti processi metabolici associati al periodo di transizione (Bauman et Currie, 1980, modificata).

Ormoni		Metà Gestazione	Fine Gestazione	Inizio lattazione
Ormoni omeorettici	Progesterone	>	<	<
	Lattogeno placentare		>	<
	Estrogeni		>	<
	Prolattina		>	>
	Somatotropina		>	>
	Cortisolo		>	>
	Leptina	>	>/<	<
Ormoni omeostatici	Insulina		>/<	<
	Glucagone			>
	CCK e somatostatina	?	?	?
	Ormoni paratiroidei		>	>
	1,25-DHV-D3		>	>
	Calcitonina		<	<
Sensibilità tissutale	Insulina	>	<	<
	Catecolamine		>	>
Risposta tissutale	Insulina		<	<
	Catecolamine	<	>	>

Tabella 2: Alcune variazioni ormonali e di sensibilità/risposta tissutale durante la fase di transizione (Ingvarsen et Andersen, 2000, modificata).

1.2 Influenza delle variazioni metabolico-ormonali del periodo di transizione sulla fertilità della bovina

La placenta produce una grande quantità di steroidi (progesterone, estrogeni e derivati) durante l'ultima fase di gestazione. Questi steroidi sono in grado di bloccare la produzione ipotalamo-ipofisaria di ormoni riproduttivi.

Quindi, la prima fase riproduttiva post-parto consiste nell'adattamento dell'attività dell'asse ipotalamo-ipofisario dopo la scomparsa dell'effetto ormonale della gestazione e nella ripresa della secrezione di ormone follicolo-stimolante (FSH) e di ormone luteinizzante (LH). Questa prima fase è relativamente breve e la produzione pulsatile di LH torna a livelli normali già alla seconda settimana dopo il parto.

I fattori che possono influenzare la ripresa della secrezione di LH sono molti e l'impatto di questi fattori dipende essenzialmente dalla loro intensità.

La produzione di FSH non è limitante per la ripresa dell'attività ciclica della bovina, infatti alcuni animali in anaestro presentano livelli alti di questo ormone.

La seconda fase della ripresa dell'attività riproduttiva post-parto consiste nell'involutione uterina. Questo fenomeno inizia normalmente già dai primi giorni dopo il parto e viene completato dopo circa 35-40 giorni, con qualche variazione individuale.

Questo aspetto è molto importante in caso di intervallo parto/prima fecondazione corto (ridotto tempo di attesa volontario) e viene fortemente influenzato dall'attività ormonale e dalla presenza di patologie uterine (ritenzione placentare, endometriti subcliniche, metriti).

L'aspetto più importante dell'attività riproduttiva del post-parto sembra essere comunque la ripresa della attività ciclica dell'ovaio.

Lo sviluppo follicolare continua durante la gestazione, ma i follicoli rimangono di ridotte dimensioni a causa della scarsa secrezione di LH; questo accade in particolare durante l'ultima fase della gestazione.

Il primo follicolo dominante può andare incontro ad uno dei seguenti tre processi:

- 1) Ovulazione
- 2) Atresia e ripresa di una nuova ondata follicolare
- 3) Formazione di una cisti follicolare

Questi tre processi sono mediati in particolare dalla secrezione pulsatile di LH. Infatti, la ridotta pulsatilità è associata ad anaestro, una moderata secrezione

porta all'ovulazione del follicolo dominante e la mancanza di secrezione può terminare nella formazione di cisti ovariche (Silvia et al., 2002).

Le variazioni degli ormoni metabolici nel periodo post-parto sono molto dinamiche e riflettono la situazione metabolica mutevole dell'organismo.

La concentrazione ematica di insulin-like growth factor 1 (IGF-1), insulina e leptina diminuiscono gradualmente durante le ultime settimane prima del parto (Butler, 2000; Lucy, 2000; Block et al, 2001). In seguito al parto il livello di insulina e IGF-1 aumenta progressivamente, mentre i livelli di leptina rimangono piuttosto bassi.

Le variazioni nelle concentrazioni di tali ormoni portano a modificazioni nella produzione di GnRH direttamente responsabile della secrezione di LH ed FSH. Gli stessi ormoni possono influenzare direttamente l'ovaio modificando la sensibilità delle cellule ovariche agli stessi LH ed FSH.

La bovina nel periodo post-parto inizia la sua attività riproduttiva normale quando la secrezione pulsatile di LH raggiunge una certa soglia critica, quindi quando è in grado di raggiungere l'ovulazione in presenza di follicolo dominante.

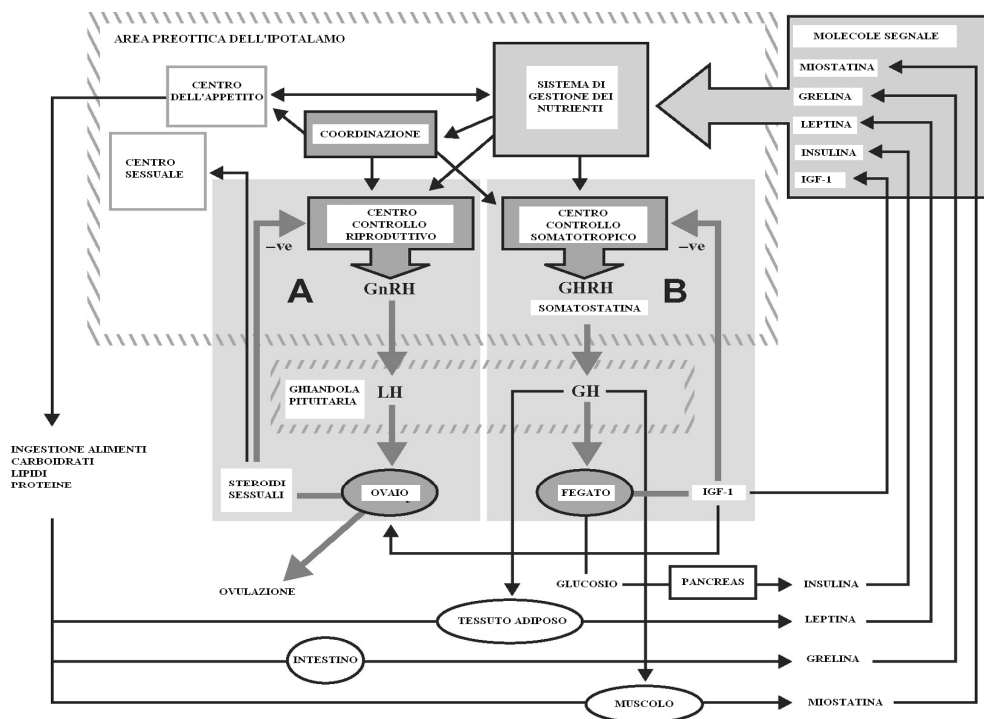


Figura 1: Schema a feedback che regola l'attività riproduttiva e che mette in relazione gli input metabolici e nutrizionali con la fertilità A: comparto riproduttivo B: comparto produttivo (Chagas et al., 2007, modificata).

1.2.1 Attività regolatoria a controllo centrale

L'attività dell'area preottica dell'ipotalamo è coinvolta in vari meccanismi come la stimolazione dell'appetito (Wynne et al., 2005), il comportamento durante il periodo estrale (Pfaff, 2005) e il controllo dell'assunzione di alimento (Wade et Jones, 2004).

Inoltre questa parte anatomica è coinvolta nel rilascio degli ormoni che controllano la secrezione di gonadotropine e somatotropine, le prime in particolare che regolano l'attività riproduttiva. Oltre all'attività dell'area ipotalamica preottica sono implicate altre vie metaboliche extra-ipotalamiche, come recettori per la leptina e fibre nervose noradrenergiche (Chagas et al., 2007).

Il neuro-peptide Y (NPY) è un polipeptide trasmettitore presente nel sistema nervoso la cui azione è strettamente correlata al comportamento alimentare di quasi tutti gli animali, in particolare la preferenza verso i carboidrati della dieta. Il legame tra l'attività nel NPY e lo stato nutrizionale dell'animale è stato messo in evidenza quando alcuni ricercatori (O'Shea et Gundlach, 1991) hanno scoperto che la concentrazione ipotalamica di questa sostanza aumenta drasticamente quando l'animale presenta un ridotta ingestione di alimento.

Sembra che questo peptide sia in grado di influenzare direttamente la secrezione di GnRH e quindi indirettamente la concentrazione plasmatica di LH (McShane et al., 1993). La maggior o minor sintesi di NPY nel sistema nervoso è mediata dalla concentrazione plasmatica di insulina.

Alcuni oppiacei endogeni possono rientrare nel meccanismo metabolico per cui una situazione di ipo-nutrizione porta alla minor secrezione di LH. In particolare sembra che durante una restrizione alimentare (soprattutto energetica) aumenti nell'area preottica dell'ipotalamo la encefalina, un peptide oppioide in grado di sopprimere la secrezione di LH (Conner et al., 1990).

1.2.2 Attività regolatoria a controllo periferico

Oltre all'encefalo molti altri organi e tessuti sono coinvolti nella regolazione metabolico-ormonale tra nutrizione e fertilità. In particolare sembra che l'ormone della crescita (growth hormone GH) sia il maggior coordinatore di queste attività (Lucy, 2003). La liberazione di metaboliti, come glucosio e NEFA, in fegato, tessuto muscolare e adiposo porta alla liberazione di IGF-1, insulina, leptina e grelina (peptide di rilascio del GH). Per esempio, l'aumento dei livelli ematici di glucosio e NEFA possono portare ad una situazione di insulino-resistenza nella bovina post-parto (Lucy, 2007). Questo fenomeno

riduce la captazione di glucosio da parte dei tessuti extra-mammari che presentano trasportatori di glucosio insulino-dipendenti, allo scopo di sostenere la produzione di latte.

Il GH è in grado di influenzare l'attività riproduttiva anche attraverso il suo effetto sul metabolismo muscolare. Essendo uno degli "organi" più grandi dell'organismo, il tessuto muscolare è fondamentale per sostenere il metabolismo durante i periodi di maggior domanda di energia e aminoacidi. Attraverso i recettori muscolari il GH induce la produzione di IGF-1, che a sua volta stimola il mantenimento delle miofibre muscolari.

In caso di carenza energetica il tessuto muscolare può andare incontro ad atrofia a causa della liberazione di miostatina. Questo ormone induce la mobilitazione delle proteine muscolari (rendendole disponibili per la produzione di energia negli altri tessuti) ed inoltre sembra avere un ruolo nel fenomeno dell'insulino-resistenza.

Il ruolo metabolico del tessuto muscolare nella bovina post-parto non può essere sottostimato, in quanto si manifesta in particolare durante il bilancio energetico negativo (Lucy, 2003).

L'aumento dei fabbisogni e della velocità dei processi metabolici tipica del post-parto risulta in una maggior ripartizione di estrogeni e progesterone, modificando così il loro effetto feed-back (Wiltbank et al., 2006). Il risultato di questi processi si può osservare nelle bovine molto produttive e con un'elevata ingestione di alimento, che presentano bassi livelli di estrogeni in circolo, quindi si avrà un'minor manifestazione del comportamento estrale.

L'assunzione di alimento può influenzare la riproduzione anche attraverso la liberazione di ormoni al momento della digestione dell'alimento. In particolare durante un calo di assunzione di sostanza secca (DMI) si osserva un aumento dei livelli ematici di GH, che a sua volta può causare la soppressione dell'attività dell'asse ipotalamo-ipofisario. Alcune di queste risposte metaboliche sono mediate dalla produzione di grelina, che peraltro aumenta in caso di maggior ingestione di alimento.

Il GH inoltre è in grado di agire direttamente sulle strutture riproduttive come follicoli, corpo luteo, embrione ed endometrio. All'interno dei follicoli la produzione locale di IGF-2 e IGF-1 (quest'ultimo rilevabile in circolo) influenza direttamente la risposta delle cellule della teca e della granulosa alle gonadotropine ipofisarie. La disponibilità di IGF per queste cellule è assicurata grazie alla produzione di IGF-binding protein (IGFBP). L'espressione di mRNA per le IGFBP nei follicoli antrali risulta essere alterata dalle variazioni nella dieta, con influenza diretta sullo sviluppo follicolare (Armstrong et al., 2003).

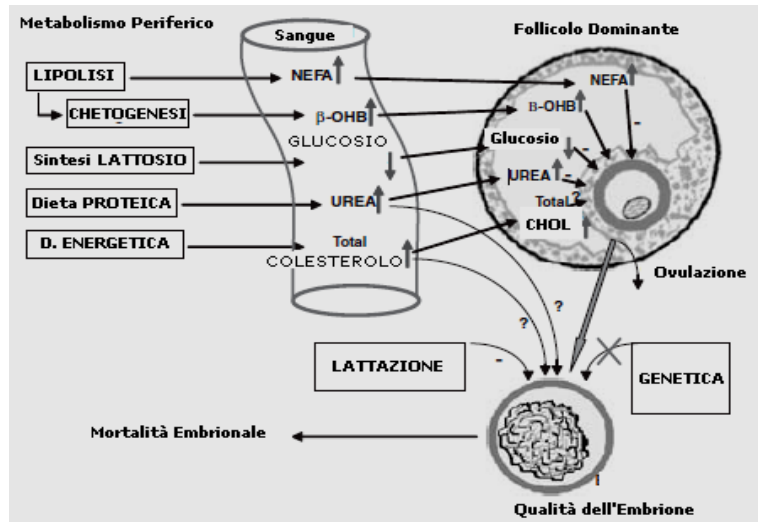


Figura 2: Meccanismi metabolici che possono influenzare l'attività riproduttiva nella bovina da latte (Leroy et al., 2008, modificata).

a) Insulina

L'insulina è un ormone metabolico legato alla concentrazione di glucosio nel sangue, che sembra avere un ruolo molto importante nel rapporto alimentazione-fertilità. A livello ipotalamico l'insulina legata al glucosio è in grado di stimolare il rilascio di GnRH, mentre a livello epatico stimola la produzione di IGF-1 (Webb et al., 2004). Nell'ovaio l'insulina stimola la proliferazione cellulare e la steroidogenesi (Wettemann et Bossis, 2000).

L'aumento dei livelli ematici di insulina e la concomitante diminuzione dei livelli di GH creano una relazione metabolica molto importante nel meccanismo che lega alimentazione e fertilità.

L'insulina funge da segnale ormonale in caso di variazioni nutrizionali acute che possono influenzare l'attività riproduttiva (Butler, 2000). I livelli ematici di insulina presentano variazioni giornaliere ma possono presentare importanti modificazioni anche durante il ciclo estrale. In particolare, sembra che il livello di insulina aumenti durante la fase preovulatoria del ciclo (Armstrong et al., 2001). Le cause di queste variazioni risiedono nell'azione degli estrogeni, con un aumento parallelo dei due ormoni al momento dell'ovulazione.

Sembra che nelle bovine altamente produttive, un eventuale ritardo nella prima ovulazione post-parto sia associata anche ad un basso livello ematico di insulina (Butler, 2000).

La somministrazione di una dieta che promuove l'aumento dei livelli plasmatici di insulina è correlata ad un aumento degli estrogeni prodotti dalle cellule della granulosa follicolare (Armstrong et al., 2002).

Livello genetico	Dieta			
	Bassa Insulina		Alta Insulina	
	Basso	Alto	Basso	Alto
Bovine che hanno ovulato nei primi 50 DIM (%)	60	50	100	80
Intervallo parto prima ovulazione (gg)	43	54	28	41
Conception rate (CR) alla prima inseminazione (%)	63	38	67	44

Tabella 3: Una dieta che stimola la produzione di insulina incrementa significativamente ($p < 0,05$) la percentuale di bovine che hanno ovulato nei primi 50 giorni dopo il parto e riduce significativamente ($p < 0,01$) l'intervallo parto concepimento. Il livello genetico ha influenza significativa sull'intervallo parto concepimento e sul conception rate (Gong et al, 2002, modificata).

Durante le ultime settimane di gestazione le bovine presentano livelli ematici di insulina piuttosto elevati (spesso $>100 \mu\text{U/ml}$), che poi si riducono durante i primi giorni post-parto, in particolare nelle bovine che presentano anche ipocalcemia subclinica (Blum et al., 1972).

Nelle bovine da latte in fase post-parto la caduta dei livelli ematici di insulina rispecchia la situazione di bilancio energetico negativo. Durante l'ultima fase di lattazione il bilancio energetico torna in equilibrio e i livelli ematici di insulina tornano a salire, come anche la concentrazione di IGF-1.

Durante uno studio americano (Robert et al., 2004) è stata messa in evidenza la relazione tra livelli di insulina, livelli di IGF-1 e GH nelle diverse fasi di lattazione. La somministrazione di insulina ha prodotto un raddoppiamento della concentrazione ematica di IGF-1 e un aumento della disponibilità epatica di mRNA codificante per l'IGF-1. Associato a questo, è stato osservato anche un aumento dei recettori per il GH presenti nel fegato e nel tessuto adiposo.

La bovina nelle prime settimane di lattazione presenta un situazione metabolica di insulino-resistenza dei tessuti extra-epatici, responsabile della ripartizione dei principi nutritivi derivanti dalla dieta.

Per insulino-resistenza (IR) si intende lo stato in cui un livello fisiologico di insulina produce una risposta inferiore a quella ritenuta normale (Hayiri, 2006). Il meccanismo molecolare dell'IR nella bovina in transizione sembra riflettere un'alterazione dell'interazione dell'ormone con i suoi recettori o difetti nella trasmissione dei segnali intracellulari e nella traslocazione dei trasportatori del glucosio.

I fattori metabolico-ormonali che possono influenzare uno stato di insulino-resistenza sono molteplici:

- 1) Estrogeni circolanti: l'aumento di estradiolo negli ultimi giorni di gestazione può causare una riduzione dell'espressione genica dei recettori dell'insulina, ma sembra non interferisca con i segnali intracellulari dopo il legame recettore-insulina (Pravettoni et al., 2004; Bossaert et al., 2008).
- 2) NEFA: Durante la lipidosi epatica, l'elevata concentrazione di NEFA plasmatici causa l'inibizione della captazione insulino-dipendente del glucosio e del suo impiego nei tessuti periferici, come tessuto adiposo e muscolare (Hayirl, 2006; Bradford et al., 2009).

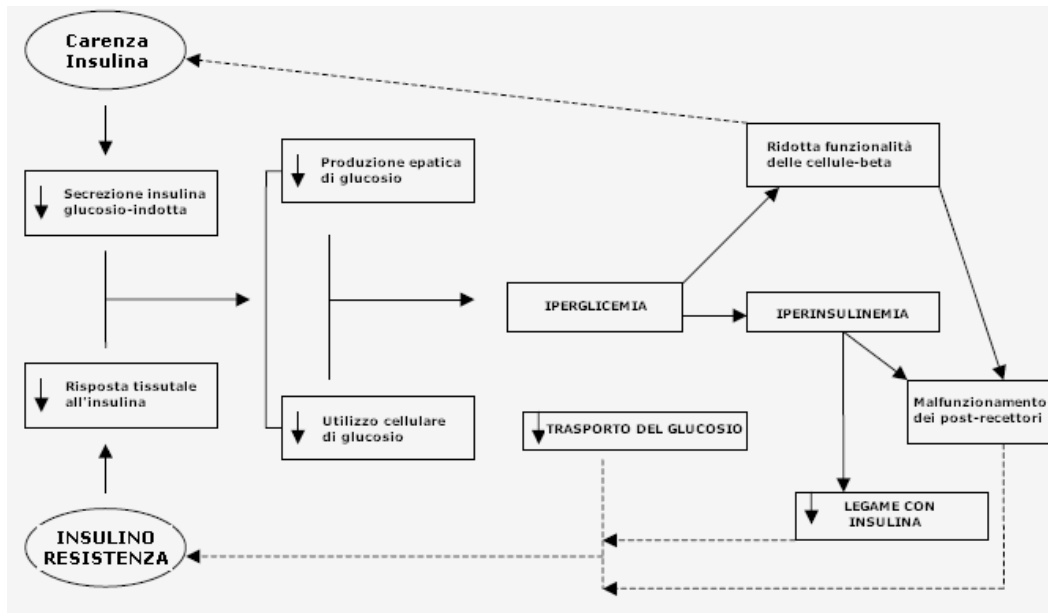


Figura 3: Meccanismo patogenetico che regola il fenomeno della insulino-resistenza (Hayirl, 2006, modificata).

L'insulino-resistenza si può osservare normalmente nelle bovine in fine gestazione o nelle prime fasi di lattazione. In particolare sembra che nelle ultime fasi di gestazione l'aumento della concentrazione di estrogeni, progesterone e prolattina possa influenzare la sensibilità dei tessuti periferici all'insulina (Ryan and Enns, 1988).

La ridotta sensibilità tissutale periferica all'azione dell'insulina si può osservare anche durante stati patologici, come in corso di chetosi e acidosi (Holtenius et al., 2003; Steen et al., 1997).

Alcuni ricercatori (Bossaert et al., 2008) hanno misurato il grado di insulino-resistenza tramite il test di tolleranza al glucosio (GTT) due settimane prima

del parto, a 14 DIM e a 42 DIM, monitorando inoltre l'attività ovarica e l'ovulazione delle bovine da latte. Lo stato di insulino-resistenza post-parto può portare ad un aumento dei NEFA in circolo, di conseguenza viene compromessa la secrezione di insulina indotta dal glucosio e viene ritardata la prima ovulazione. In un altro studio (Smith et al., 2009) è stato osservato che somministrando alle bovine composti insulino-sensibilizzanti (in questo caso i tiazolinedioni TZD) la situazione di bilancio energetico negativo viene migliorata, il livello ematico di NEFA risulta più basso e l'intervallo parto/prima ovulazione si accorcia.

b) Sistema IGF e ormone della crescita (GH)

Il ruolo del GH nella regolazione nutrizionale della riproduzione è molto complesso in quanto la produzione di questo ormone è direttamente controllata dalle secrezioni ipotalamiche (Keisler et Lucy, 1996).

I follicoli ovarici della bovina sono quasi privi di recettori specifici per il GH, anche se quest'ultimo è in grado di influenzare direttamente queste strutture riproduttive (Lucy et al., 1999). Al contrario, questi recettori sono presenti a livello delle cellule luteiniche del corpo luteo.

L'attività metabolica classica del GH è la stimolazione, a livello epatico (nel fegato si ha la maggior concentrazione di recettori per il GH), dell'espressione genetica e della liberazione dell'IGF-1, inoltre l'insulina interagisce con il GH nella regolazione della secrezione epatica ed extraepatica dell'IGF-1.

Il GH causa un aumento della secrezione di IGF-1 e delle proteine leganti l'IGF, soprattutto l'IGFBP-3 (Lucy, 2000).

Sembra che queste interazioni siano alla base dell'attività dell'ormone della crescita (GH) sulla riproduzione della bovina.

In alcuni studi sono stati individuati recettori per il GH anche nelle cellule della granulosa, nelle cellule del cumulo ooforo e nell'oocita (Carlsson et al., 1993; Izadyar et al., 1999).

Vari studi (Bachelot et al., 2002; Slot et al., 2006; Kaiser et al., 2006) hanno dimostrato che la mancanza di funzionalità dei recettori ovarici per il GH porta ad una mancata maturazione del follicolo con una riduzione del numero di follicoli primari, secondari e antrali e un aumento nel numero dei follicoli atresici.

Il GH è responsabile dello sviluppo e del mantenimento della sensibilità alle gonadotropine delle cellule follicolari. Alcuni studi hanno dimostrato che l'attività del GH (mediata anche dall'IGF-1) stimola lo sviluppo dei follicoli antrali (Eckery et al., 1997) e la differenziazione delle cellule della granulosa (Gong et al., 1996; Going et al., 1997).

Nel sistema IGF sono presenti due ligandi (IGF-1 e IGF-2) e due recettori. Di questi l'IGF-IR tipo 1 ha una alta affinità per l'IGF-1 e per l'insulina.

Considerare l'IGF-1 come il maggior mediatore dell'asse somatotropica non è del tutto corretto, in quanto il 95% circa dell'IGF-1 presente in circolo è legato ad alcune proteine (IGFBP). L'effetto anabolico sistemico dell'IGF-1 risulta legato in particolar modo alla presenza di IGFBP-3, mentre durante i periodi di scarsa assunzione di nutrienti interviene la IGFBP-2 (Armstrong et Benoit, 1996).

Molte ricercatori hanno studiato il coinvolgimento del sistema IGF nella regolazione intraovarica della follicologenesi.

La maggior parte dei componenti del sistema IGF è presente nei follicoli e l'ovaio è uno dei maggiori siti di espressione genica dell'IGF (Adashi, 1998).

Nelle cellule della granulosa e dell'oocita vengono espressi i recettori per l'IGF-1, l'IGFBP-2 e l'IGFBP-3, non sono invece stati rilevati l'IGF-1 e l'IGF-2 (Armstrong et al., 2002). L'espressione dei recettori per l'IGF-1 aumenta durante lo sviluppo dei follicoli primari a follicoli antrali (Wandij et al., 1992).

Questo aumento si osserva anche nella fase finale di crescita dei follicoli antrali (Schams et al., 2002).

L'espressione di mRNA codificante per le IGFBP si osserva nella parte anteriore della ghiandola pituitaria e nelle cellule ovariche. In particolare questi complessi sono rilevabili nel fluido follicolare dei follicoli antrali, mentre la concentrazione follicolare è molto bassa nei follicoli dominanti (Webb et al., 2004; Wettemann et al., 2003). L'IGFBP-3 è l'unica proteina rilevata nel liquido follicolare dei follicoli preovulatori (Funston et al., 1996).

Nella bovina, la fase iniziale dello sviluppo follicolare è regolata in parte dalla concentrazione di IGF nel follicolo stesso (Fortune et al., 2004) soprattutto nelle fasi seguenti l'inizio della crescita del follicolo primordiale. Nelle cellule dei follicoli pre-antrali l'IGFBP-2 e l'IGFBP-3 legano l'IGF proveniente dal circolo ematico e dagli altri follicoli antrali, regolando l'accesso verso i recettori IGF-IR tipo 1 (Kezele et al., 2002).

Secondo una ricerca (Thomas et al., 2007) durante la coltura in vitro dei follicoli pre-antrali, l'aggiunta di IGF-1 aumenta il diametro follicolare e la produzione di estrogeni.

L'IGF-1 promuove la proliferazione delle cellule della granulosa nei follicoli antrali di piccole dimensioni (1-3mm di diametro) e la produzione di progesterone dalle cellule della granulosa dei follicoli con diametro >5mm (Monniaux et al., 1992).

Nella bovina l'IGF-1 sembra avere un ruolo chiave nell'aumento della sensibilità dei follicoli antrali di piccole dimensione verso le gonadotropine e nella transizione di questi follicoli alla fase gonodotropino-dipendente (Monget et al.,

calo di IGF-1 nel post-parto è associato anche alla riduzione delle concentrazioni ematiche di glucosio ed insulina (Grummer, 1995).

Questo fenomeno dipende in particolar modo dalla minore attività dei recettori per il GH negli epatociti durante il periodo post-partum (Kobayashi et al., 2002).

Variazioni repentine della dieta causano modificazioni dei livelli ematici di IGF-1; questo fenomeno è mediato soprattutto dal GH che stimola il rilascio di IGF-1 nel fegato. Sembra che in questo meccanismo rivesta un ruolo importante il livello di estrogeni che, oltre ad essere legato alle variazioni di insulina, può portare ad un aumento della concentrazione di GH e alla stimolazione della secrezione di IGF-1 (Simpson et al., 1997).

I meccanismi metabolici che regolano queste variazioni delle concentrazioni ormonali non sono comunque ancora del tutto conosciuti.

Probabilmente un ruolo importante è rivestito dalla situazione di bilancio energetico negativo che caratterizza molte bovine nella fase post-parto, in quanto l'assunzione di nutrienti influenza la sintesi e la secrezione dell'IGF-1 (Thissen et al., 1994). La variazione della concentrazione di somatotropina è invece secondaria alle modificazioni del livello di IGF-1, infatti quest'ultimo viene indicato come il principale inibitore del meccanismo a feedback negativo che regola la produzione di ST.

Le variazioni dell'IGF-1 circolante sono direttamente collegate alle variazioni di espressione dei recettori epatici per la somatotropina (Lucy, 2000).

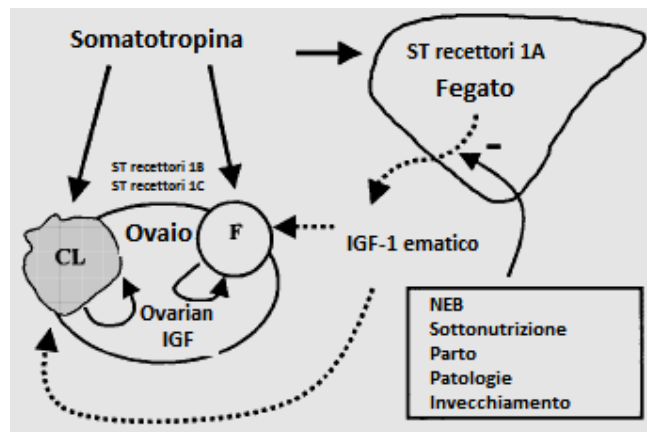


Figura 5: Attività di somatotropina e IGF-1 sulle cellule ovariche (Lucy, 2000, modificata).

Le bovine in bilancio energetico negativo post-parto sono caratterizzate da bassi livelli ematici di IGF-1.

Secondo uno studio (Armstrong et al., 2001) diete ad alto livello di energia nel periodo post-parto aumentano significativamente le concentrazioni plasmatiche

di insulina e IGF-1, rispetto a diete ipo-energetiche. A questo è stato inoltre associato un aumento di dimensione del follicolo dominante.

Risultati simili sono stati osservati dopo somministrazione di diete ad alto contenuto energetico a bovine da latte durante il periodo pre-ovulatorio del ciclo estrale (Lucy et al., 1992).

Tatcher et al. (1996) hanno evidenziato come bovine da latte con anaestros post-parto presentano livelli ematici di IGF-1 molto inferiori rispetto a bovine in cui la ripresa dell'attività ciclica post-parto è normale. Risultati simili sono stati rilevati anche nei bovini da carne (Roberts et al., 1997).

In uno studio recente (Falkenberg et al., 2008) è stato messo in evidenza che a bassi livelli ematici di IGF-1 nei primi 10 giorni post-parto si associa un minor tasso di concepimento alla prima inseminazione e un minor tasso di concepimento totale.

Risultati molto simili sono stati descritti anche in studi precedenti (Patton et al., 2007; Taylor et al., 2004; Jorritsma et al., 2003).

Nella vacca da latte la riduzione dei livelli di IGF-1 circolante è presente soprattutto nel periodo periparto e nelle fasi di calo dell'ingestione di sostanza secca. Questo fenomeno dipende in particolar modo dalla minore attività dei recettori per il GH negli epatociti durante il periodo post-partum (Kobayashi et al., 2002).

Variazioni repentine della dieta causano modificazioni dei livelli ematici di IGF-1; questo fenomeno è mediato soprattutto dal GH che stimola il rilascio di IGF-1 nel fegato. Sembra che in questo meccanismo rivesta un ruolo importante il livello di estrogeni che, oltre ad essere legato alle variazioni di insulina, può portare ad un aumento della concentrazione di GH e alla stimolazione della secrezione di IGF-1 (Simpson et al., 1997).

c) Leptina

Uno dei segnali metabolici più importanti che regolano il rapporto tra nutrizione e fertilità, è costituito dalla leptina, ormone proteico sintetizzato nelle cellule del tessuto adiposo.

La concentrazione di leptina nel sangue è regolata dallo stato nutrizionale e dal bilancio energetico dell'animale. Nei ruminanti, a differenza delle altre specie monogastriche, i livelli di leptina nel periodo post-prandiale sono molto discontinui e non sempre evidenziabili. Infatti alcuni autori hanno rinvenuto aumenti di leptina 2-8 ore dopo il pasto nelle pecore (Marie et al., 2001), al contrario nella bovina in asciutta le concentrazioni postprandiali sono ridotte (Delavaud et al., 1999).

Queste differenze sono mediate dall'ingestione di alimento, infatti bassi livelli di leptina sono presenti in bovine con alta ingestione, mentre sono elevati negli animali sottonutriti (Delavaud et al., 2000). La concentrazione plasmatica di leptina presenta variazioni repentine in caso di cambiamenti improvvisi del piano alimentare.

Nella bovina da latte le maggiori variazioni dei livelli di leptina nel sangue si possono osservare da 35 giorni prima del parto fino a 56 giorni post-parto (Block et al., 2001). La concentrazione di leptina è alta all'inizio dell'asciutta e si riduce, anche del 50%, nel periodo periparto, per poi mantenersi a bassi livelli anche durante il periodo iniziale della lattazione.

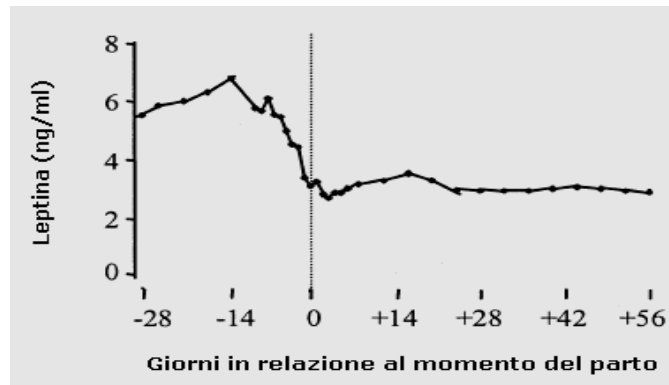


Figura 6: Variazione della concentrazione plasmatica della leptina durante il periodo peri-parto (Block et al., 2001, modificata).

Questa riduzione post-parto della concentrazione plasmatica di leptina è mediata dal bilancio energetico negativo, quindi dal numero di adipociti presenti nell'organismo.

In parte la regolazione del livello plasmatico di leptina è mediata dalla riduzione della concentrazione di insulina e dall'aumento del livello di ormone della crescita (GH) nelle prime settimane di lattazione (Block et al., 2001). In particolare sembra che somministrando insulina nell'ultima fase della gravidanza e nei primi giorni post-parto aumenti direttamente anche il livello di leptina, mentre la somministrazione di GH apparentemente non produce alcun effetto (Leury et al., 2003).

In definitiva, la regolazione della concentrazione ematica di leptina sembra dipendere da molti meccanismi, tra cui il livello energetico e la secrezione di insulina, mentre ha un effetto minore la produzione di ormone della crescita (GH). Secondo Sauerwein et al. (2004) il GH avrebbe un effetto negativo sulla concentrazione di leptina solo durante le primissime fasi di gestazione.

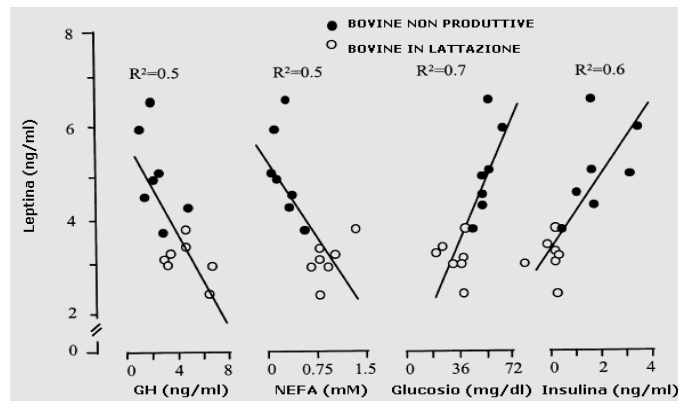


Figura 7: Relazione tra livelli plasmatici di leptina, ormone della crescita (GH), insulina, glucosio e NEFA (Block et al., 2001, modificata).

La riduzione della concentrazione plasmatica della leptina nella bovina da latte durante il periodo peri-parto è da attribuire a due fattori chiave (Leury et al., 2003):

- 1) Inizio del bilancio energetico negativo, correlato positivamente con un calo dei livelli di leptina
- 2) Riduzione dell'espressione genica della leptina nel tessuto adiposo durante l'inizio della lattazione

Secondo alcuni ricercatori (Leury et al., 2003) la risposta della leptina alla somministrazione di insulina è maggiore di circa 6 volte nelle bovine a fine lattazione rispetto a quelle ad inizio produzione. Anche i livelli ematici di insulina presentano lo stesso comportamento.

D'altronde il grado di iperinsulinemia durante la lattazione è leggermente basso a causa della ridotta secrezione endogena di insulina. Questo fattore però, da solo, non è in grado di spiegare la risposta attenuata della leptina durante il periodo di inizio lattazione.

Durante le prime settimane post-parto infatti, la captazione insulino-dipendente del glucosio è in parte compromessa; il glucosio viene considerato come il fattore determinante nella secrezione di leptina da parte del tessuto adiposo (Mueller et al., 1998).

Il glucosio esercita questo effetto tramite la stimolazione alla produzione di metaboliti (come UDP-N-acetylglucosammina) che evidenziano lo stato energetico degli adipociti e stimolano la secrezione di leptina.

L'ormone della crescita (GH) influenza la produzione di leptina tramite la inibizione della captazione insulino-dipendente del glucosio da parte del tessuto adiposo.

La somministrazione di GH esogeno non altera la produzione di leptina durante l'inizio della lattazione quando la concentrazione di insulina rimane inalterata. Questo indica che il GH esercita solamente un'azione indiretta sulla

concentrazione ematica di leptina, attraverso un'attività antagonista sull'insulina (Houseknecht et al., 2000). Durante un periodo di sottanutrizione, quando il livello di insulina è basso, il GH sembra non avere una particolare influenza sui livelli circolanti di leptina (Block et al., 2003).

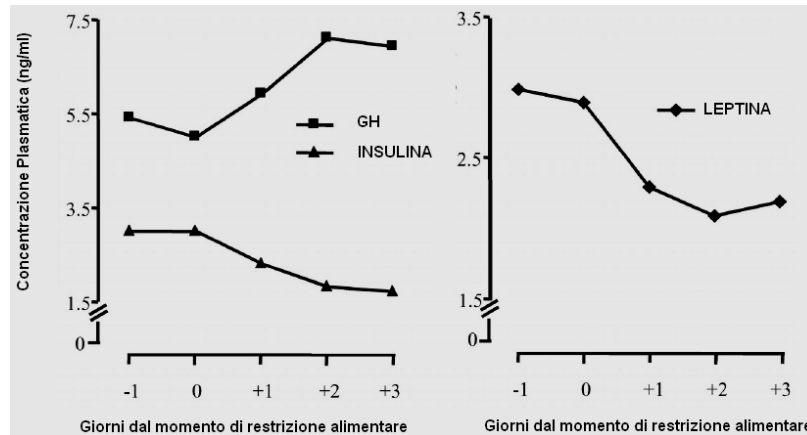


Figura 8: Variazioni ormonali di GH ($p < 0,001$), insulina ($p < 0,01$) e leptina ($p < 0,001$) durante un periodo di restrizione alimentare (Block et al., 2003, modificata).

Le bovine nel periodo peri-parto sono caratterizzate da una riduzione dell'assunzione di sostanza secca (DMI) mediata dalla variazione nella topografia degli organi in cavità addominale e dalle modificazioni metaboliche del periodo. In particolare sembra che questa variazione in DMI sia condizionata dall'aumento di estrogeni in circolo e dalla continua lipomobilitazione (Ingvarsen et Andersen, 2000).

I bassi livelli di leptina nel post-parto stimolano il continuo aumento dell'ingestione, infatti l'assunzione di alimento volontaria è ridotta dalla somministrazione esogena di leptina (Morrison et al., 2001). L'ingestione non è particolarmente influenzata dalla somministrazione di leptina durante la fine della lattazione quando è maggiormente funzionante la risposta insulino-dipendente della leptina plasmatica, mentre si osserva una riduzione dell'ingestione ad inizio lattazione quando la risposta della leptina è meno attiva (Leury et al., 2003).

L'azione metabolica più importante della leptina consiste probabilmente nella regolazione dei meccanismi adattativi di risposta ad uno stato di sottanutrizione o comunque di carenza di alimento disponibile (Ahima et al., 1999). Nelle bovine ad inizio lattazione i ridotti livelli ematici di leptina permettono di ridurre la risposta dei tessuti periferici all'azione dell'insulina, condizione adattativa chiave per promuovere l'utilizzo del glucosio ematico da

parte della ghiandola mammaria (Bell et Bauman, 1997; Etherton et Bauman, 1998).

La leptina ha un'azione diretta anche sulla funzionalità del sistema immunitario che può condizionare la resistenza agli agenti patogeni attraverso l'attività regolatoria sull'emopoiesi e sulle cellule immunitarie (Gainsford et Alexander, 1999; Fantuzzi et Faggioni, 2000). La leptina ha un'attività positiva sull'ematopoiesi stimolando la produzione di leucociti; in particolare sembra che una carenza di leptina possa causare una compromissione dell'immunità mediata dai linfociti-T e nella regolazione dell'attività dei macrofagi (Loffreda et al., 1998).

L'associazione positiva tra la concentrazione di leptina e il body condition score (BCS) della bovina è stata valutata da diversi gruppi di ricerca negli ultimi anni (Chilliard et al., 1998; Ehrhardt et al., 2000; Reist et al., 2003). Nella bovina la leptina non è solamente correlata al BCS e all'assunzione di alimento (DMI), ma è anche coinvolta nella regolazione del bilancio energetico e nella distribuzione dell'energia nell'organismo.

Alcuni ricercatori (Chilliard et al., 1998) hanno evidenziato la correlazione positiva tra leptina e peso corporeo (BW) dell'animale, con un aumento della quantità di tessuto adiposo associato ad un aumento della leptina circolante. Il livello ematico di leptina riflette lo stato energetico dell'animale, infatti la perdita di tessuto adiposo tipica del post-parto riduce la produzione di quest'ormone (Liefers et al., 2003).

I livelli ematici di leptina sono correlati positivamente con il fotoperiodo, l'intensità luminosa e la temperatura ambientale, infatti tendono ad essere maggiori nelle bovine che hanno partorito nella stagione primaverile (Reist et al., 2003).

L'attività della leptina sulla funzionalità riproduttiva della bovina dipende dallo stato metabolico della bovina stessa. Infatti alcuni ricercatori hanno evidenziato come la somministrazione di leptina possa influenzare positivamente la secrezione di LH, ma solamente nelle bovine grasse, mentre le bovine razionate non hanno presentato variazioni significative nelle concentrazioni ematiche di LH (Williams et al., 2002). Nelle bovine sensibili all'azione della leptina esogena è stato osservato anche un aumento marcato della concentrazione di insulina.

All'interno del sistema nervoso centrale, l'ipotalamo è l'area in cui si svolge la maggior azione della leptina sul controllo dell'ingestione di alimento e del consumo di energia. Infatti, in quest'area è stata isolata una grande quantità di recettori (Dyer et al., 1997).

L'azione della leptina a livello centrale viene regolata dai recettori specifici presenti nel nucleo arcuato nell'ipotalamo, in particolare nei neuroni contenenti

neuro peptide-Y (NPY) e pro-opiomelancortina (POMC). Le cellule del nucleo arcuato sono in grado a loro volta di influenzare alcune cellule che regolano in parte l'appetito, la risposta allo stress e le funzioni riproduttive.

Focalizzando l'attenzione sulla riproduzione sembra che la maggior parte dell'attività della leptina venga mediata dalla secrezione di GnRH. Infatti la leptina agisce soprattutto sulle cellule contenenti GnRH attraverso il legame a recettori specifici (Clarke et Henry, 1999).

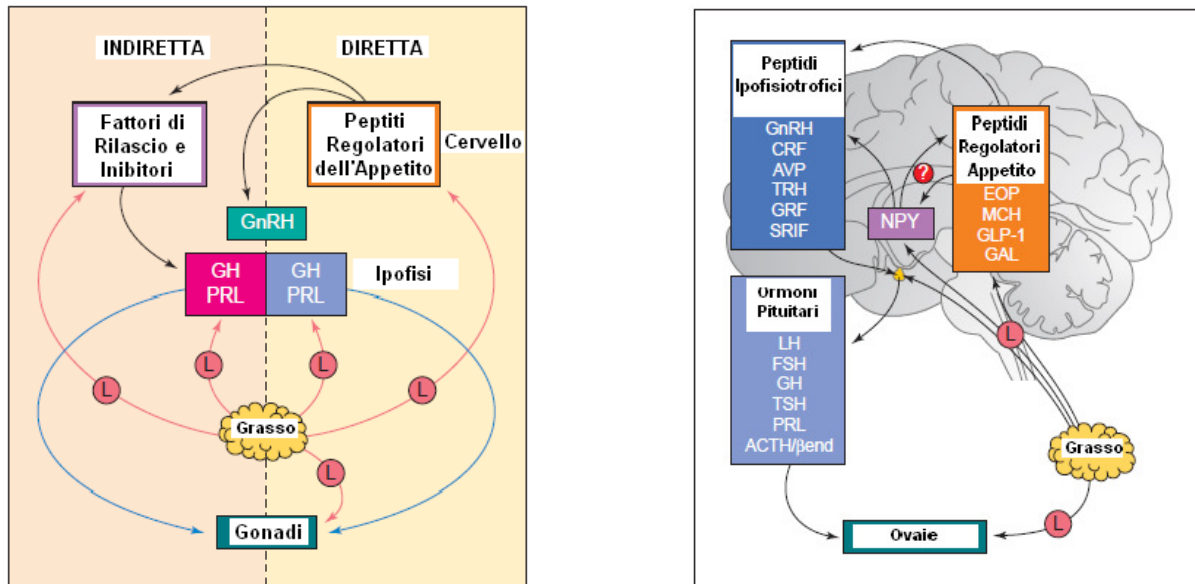


Figura 10: Schema dell'azione diretta ed indiretta della leptina (L) sull'asse ipotalamo-ipofisi-ovaie (Clarke et Henry, 1999, modificata).

Molti dei neurotrasmettitori e dei peptidi coinvolti nella regolazione dell'appetito e dell'assunzione di alimento possono essere implicati anche nella secrezione di GnRH.

Il neuropeptide-y (NPY) è il più importante peptide oressizzante conosciuto e la leptina partecipa attivamente alla sua espressione nel nucleo arcuato (Jang et al., 2000). Le cellule contenenti l'NPY comprendono anche recettori per gli estrogeni che regolano la secrezione di GnRH. Altri sistemi neuronali, come l'ormone concentrante la melanina (MCH) e la pro-opiomelancortina (POMC), sono influenzati direttamente dalla leptina e a loro volta possono influenzare positivamente (MCH) oppure negativamente (POMC) la liberazione di GnRH (Clarke et Henry, 1999).

La leptina interagisce con questo sistema regolatorio centrale inibendo il segnale nervoso dell'NPY, con conseguente riduzione dell'ingestione di alimento

(Jang et al., 2000), liberazione delle gonadotropine ipofisarie (Amstalden et al., 2003) e del GH dalla ghiandola pituitaria (Zieba et al., 2003).

Sembra che la leptina, negli animali sottoposti a bilancio energetico negativo nel periodo post-parto, possa influenzare l'entità e l'andamento della produzione pulsatile di LH (Kadokawa et al., 2006). In particolare in questa ricerca è stata evidenziata una forte correlazione positiva tra bilancio energetico della bovina e frequenza della pulsazione nella secrezione di LH. Inoltre è stata osservata correlazione positiva tra i livelli ematici di leptina, la frequenza e l'ampiezza della secrezione pulsatile di LH.

Sembra che la leptina possa inibire l'attività ovarica attraverso altri meccanismi metabolici, anche con una azione diretta. Secondo Spicer et Francisco (1998) la leptina può inibire la secrezione insulino-indotta di progesterone (P4) e androstenedione da parte di cellule tecali del bovino e può ridurre la produzione di estrogeni (E2) e progesterone nelle cellule della granulosa, sempre attraverso l'antagonismo con l'insulina.

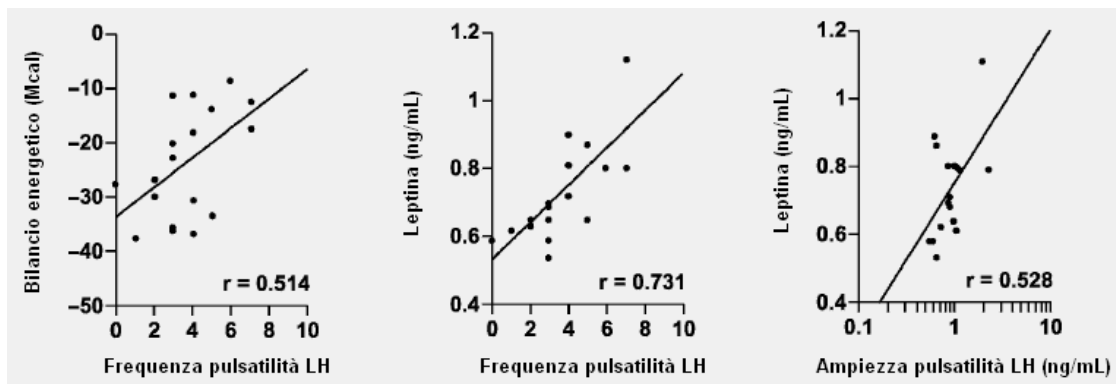


Figura 11: Relazione tra bilancio energetico, leptina e caratteristiche della secrezione pulsatile dell'LH (Kadokawa et al., 2006, modificata).

In uno studio in-vitro (Spicer et al., 2000) è stato evidenziato per la prima volta che:

- 1) La leptina non ha effetto sulla steroidogenesi delle cellule tecali indotta dall'IGF-1, ma è in grado di inibire la produzione di androstenedione indotta dall'LH delle medesime cellule
- 2) La leptina non ha effetto sulla proliferazione delle cellule tecali indotta dall'IGF-1
- 3) La leptina non ha effetto sulla produzione IGF-indotta di estradiolo da parte delle cellule della granulosa in follicoli di piccole e grandi dimensioni
- 4) L'aumento significativo di leptina può inibire la proliferazione cellulare e la produzione di progesterone, IGF-indotte

Questo può significare che l'azione della leptina sulle cellule tecali e sulle cellule della granulosa non è mediata dalla sua interazione con l'IGF-1, ma probabilmente è più significativo il rapporto con l'insulina.

In uno *in vitro* studio (Spicer et Francisco, 1997) infatti, è stato evidenziato che la leptina è in grado di inibire la produzione insulino-indotta di progesterone ed soprattutto estrogeni dalle cellule della granulosa dei follicoli, ma non influenza la proliferazione cellulare. Gli stessi ricercatori hanno evidenziato *in vitro*, che in assenza di insulina l'attività della leptina sulla steroidogenesi delle cellule della granulosa è molto ridotta o assente.

Secondo Barkan et al. (1999) la leptina è in grado di inibire o ridurre la produzione di progesterone dalle cellule della granulosa quando sono convolti FSH, IGF-1 e insulina. A livelli fisiologici la leptina può attenuare l'attività steroidogenica di alcuni segnali che normalmente migliorano l'attività dell'FSH. La leptina è in grado di inibire la steroidogenesi delle cellule della granulosa interferendo con l'azione stimolatrice delle gonadotropine (FSH) solo in presenza di insulina (Brannian et al., 1999). Una dose fisiologica di leptina (10-50 ng/ml) è in grado di sopprimere la produzione di progesterone in 4h; la leptina è probabilmente in grado quindi di inibire la steroidogenesi anche a dosi molto più ridotte (0.1 ng/ml).

L'immunizzazione passiva delle pecore contro la leptina durante la fase follicolare del ciclo estrale porta ad un aumento della secrezione ovarica di estradiolo, al contrario se durante questa fase l'ovaio è esposto a livelli fisiologici di leptina (<10 ng/ml), la produzione di estradiolo è notevolmente ridotta. Questa modulazione diretta della funzionalità ovarica è indipendente dalle variazioni del livello ematico di gonadotropine (Kendall et al., 2004).

Alla luce delle nuove conoscenze sul ruolo della leptina nella regolazione metabolico-ormonale della nutrizione sulla capacità riproduttiva della bovina, alcuni ricercatori hanno cercato di mettere in relazione i livelli ematici di leptina con gli indici riproduttivi aziendali.

In uno studio sono stati analizzati alcune variabili metaboliche e i livelli ematici di leptina in bovine con anomalie nel ciclo estrale post-parto (Mann et al., 2005). I ricercatori hanno osservato diversi livelli di leptina nelle bovine con ciclo estrale normale e anormale (rispettivamente $1,86 \pm 0,10$ ng/ml e $1,47 \pm 0,09$; $p < 0,01$), valutato tramite misurazione del progesterone nel latte.

Parametro	Ciclo Normale (n=45)	Ciclo Anormale (n=39)	p-value
Produzione di latte (l/giorno)	29.7±0.7	32.7±1.3	<0.05
BCS	1.99±0.06	1.88±0.08	Ns
Variatione mensile BCS	+ 0.16±0.03	+ 0.05±0.04	<0.05
Variatione BW (kg/giorno)	+ 0.23±0.05	+ 0.01±0.11	<0.05
Urea plasmatica (mmol/l)	6.94±0.20	7.18±0.31	Ns
BHB plasmatico (mmol/l)	0.86±0.04	0.99±0.05	<0.05
Glucosio plasmatico (mmol/l)	3.59±0.07	3.50±0.07	Ns
Leptina plasmatica (mmol/l)	1.86±0.10	1.47±0.09	<0.01
Intervallo parto/1°FA (giorni)	63.8±2.6	77.3±3.9	<0,01
Bovine gravide a 100 DIM (%)	66.7	34.5	<0.01

Tabella 4: Parametri ematici, produttivi e riproduttivi in bovine con ciclo estrale e ciclo problematico (Mann et al., 2005, modificata).

Un gruppo di ricercatori giapponesi (Kadokawa et al., 2000) ha messo in relazione la concentrazione plasmatica di leptina e l'intervallo parto/prima ovulazione. In questo studio è stata evidenziata la riduzione progressiva del livello ematico di leptina nel periodo post-parto.

Infatti, la concentrazione di leptina si attesta intorno a $1,81 \pm 0,31$ ng/ml nel periodo pre-parto e raggiunge il livello minimo a circa 10 giorni post-parto ($0,74 \pm 0,17$ ng/ml). In seguito i livelli ematici si rialzano nel periodo pre-ovulatorio ($1,32 \pm 0,21$ ng/ml) e nel periodo post-ovulatorio ($1,61 \pm 0,24$ ng/ml). Le differenze tra i vari periodi hanno significatività statistica ($p < 0,01$).

L'intervallo parto/prima ovulazione ($25,9 \pm 2,0$ giorni) è correlato significativamente ($r = 0,83$; $p < 0,0001$) solo con la concentrazione minima della leptina a circa 10 DIM.

Questi dati suggeriscono che un ritardo nella ripresa dei livelli ematici di leptina potrebbero causare un ritardo nella ripresa dell'attività ciclica post-parto e nell'intervallo parto/prima ovulazione (Kadokawa et al., 2000).

Altre ricerche non hanno trovato relazione statisticamente significativa tra i livelli ematici di leptina, l'intervallo parto/primo estro osservato e il giorno di ripresa dell'attività luteinica (Liefers et al., 2003).

d) Grelina

La grelina è un ormone è secreto in particolar modo dalle cellule endocrine presenti nella mucosa dell'intestino e dello stomaco. Il suo ruolo nell'interazione alimentazione-riproduzione si esplica nella regolazione del bilancio energetico, con un'azione opposta a quella della leptina (Horvath et al., 2001).

Infatti, l'attività metabolica della grelina inibisce la secrezione pulsatile dell'ormone luteinizzante (LH), inoltre riduce significativamente la capacità di risposta delle cellule secernenti l'LH nei confronti del GnRH (Fernandez-Fernandez et al., 2004).

Alcuni ricercatori (Kawamura et al., 2003) hanno scoperto che la grelina ha un ruolo negativo nello sviluppo embrionale durante la prima metà della gestazione.

Sembra quindi che la grelina possa fungere da segnale chiave durante uno stato di carenza energetica nelle prime settimane di gestazione, agendo come fattore inibitorio sullo sviluppo embrionale precoce.

CAPITOLO 2

INFLUENZA DEL BILANCIO ENERGETICO E DEL BODY CONDITION SCORE (BCS) SULL'EFFICIENZA RIPRODUTTIVA DELLA BOVINA

2.1 Principali variazioni metabolico-ormonali indotte dal bilancio energetico negativo

La concentrazione plasmatica di leptina è generalmente elevata (5-9 ng/ml) durante il periodo di asciutta (Kokkonen et al., 2002). Inizia a ridursi tra dalla quarta settimana prima del parto e raggiunge il livello minimo durante la prima settimana post-parto (3-6 ng/ml). La concentrazione rimane bassa fino alla fase di metà lattazione (Reist et al., 2003) sia nelle bovine gravide sia nelle bovine in cui non è avvenuto il concepimento (Sauerwein et al., 2004; Chelikani et al., 2003).

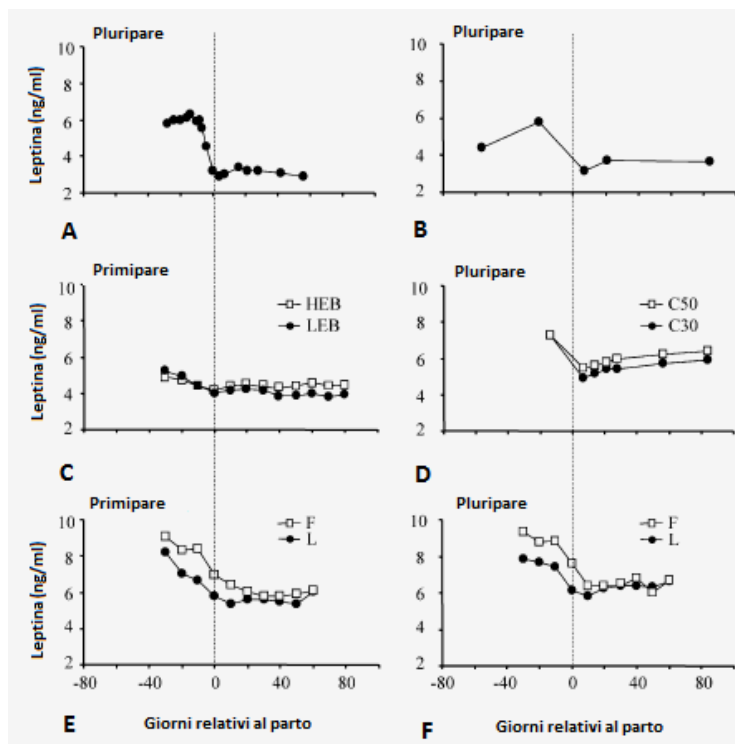


Figura 12: Variazione dei livelli plasmatici di leptina nel periodo peri-parto ("A": Block et al., 2001, 8 bovine; "B": Holtenius et al., 2003, 24 bovine; "C": Liefers et al., 2003, 423 bovine, HEB +9 Mj/gg o LEB -14 Mj/gg di bilancio energetico; "D": Reist et al., 2003, 90 bovine, C50 50% di concentrati o C30 30% di concentrati; "E e F": Meikle et al., 2004, 21 primipare e 21 pluripare, F o L con BCS al parto rispettivamente > o < di 3).

Liefers et al. (2003) hanno evidenziato che le bovine con un bilancio energetico positivo (9 Mj/gg) presentavano una maggior assunzione di alimento e una maggior concentrazione plasmatica di leptina, rispetto alle bovine con bilancio energetico di -14 Mj/gg. Reist et al. (2001) hanno ipotizzato l'esistenza di una componente genetica che agisce sulla variazione dei livelli plasmatici di leptina in caso di bilancio energetico negativo post-parto.

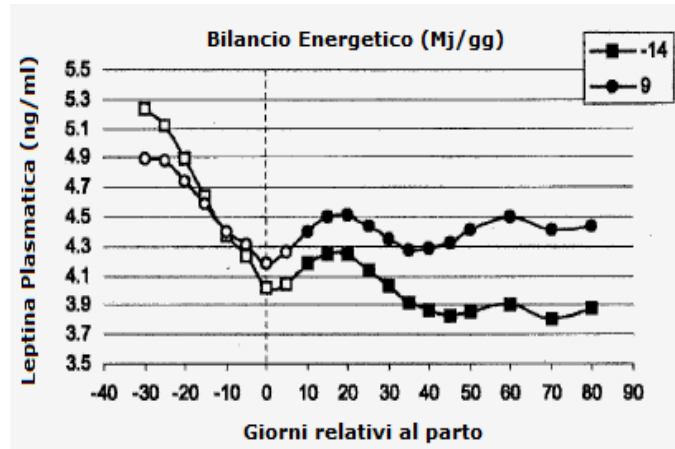


Figura 13: Relazione tra bilancio energetico e concentrazione plasmatica di leptina. I quadrati e i cerchi neri indicano differenze statisticamente significative ($p < 0,05$), i quadrati e i cerchi vuoti indicano differenze non significative ($p > 0,05$) (Liefers et al., 2003).

Oltre ad alcune differenze nella concentrazione ematica di leptina possono essere osservate variazioni nella ripresa della concentrazione normale dopo il minimo livello che solitamente viene raggiunto al momento del parto.

Le bovine in bilancio energetico positivo hanno una ridotta lipomobilizzazione e presentano un rapido recupero della concentrazione ematica di leptina dopo il parto. Infatti sembra che questo recupero dipenda principalmente dalla quantità di tessuto adiposo presente nell'organismo dell'animale (Liefers et al., 2003).

La condizione corporea al momento del parto (espressa come BCS) può influenzare la concentrazione ematica di leptina.

In uno studio (Maikle et al., 2004) le bovine che presentano elevato BCS mostrano elevati livelli di leptina a fine gestazione e nelle prime due settimane di lattazione. Inoltre nelle bovine con BCS alto il livello minimo plasmatico di leptina viene raggiunto circa 10 giorni dopo rispetto alle bovine tendenzialmente magre. Relazioni simili sono state evidenziate anche in altri studi recenti (Ehrhart et al., 2000).

Il bilancio energetico negativo della bovina post-parto influenza negativamente la concentrazione di leptina, ma nelle bovine grasse questo effetto viene mascherato dalla concomitante secrezione di leptina dalle cellule del tessuto adiposo.

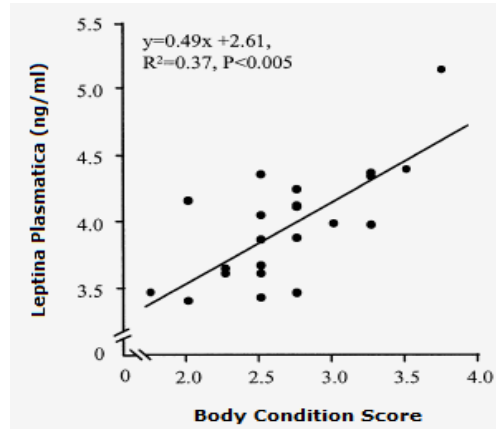


Figura 14: Relazione tra concentrazione plasmatica della leptina e ingrassamento della specie bovina. Misurazione dei livelli plasmatici di leptina in bovine a fine lattazione e valutazione del BCS (Ehrhart et al., 2000).

Il bilancio energetico della bovina durante il periodo post parto è la principale causa della chetosi e della lipidosi epatica.

Il profilo metabolico durante le prime settimane post-partum include basse concentrazioni ematiche di insulina e glucosio, e alte concentrazioni di glucagone, GH, beta-idrossibutirrato (BHBA) e NEFA. Profili metabolici di questo tipo sono stati osservati in vari studi riguardanti la lipidosi epatica e stati di chetosi metabolica (Veenhuizen et al., 1991; Drackley et al., 1992).

Alla depressione dell'assunzione di alimento nelle settimane seguenti il parto (direttamente correlata al NEB) sono stati associati bassi livelli ematici di insulina ed acetato, alti livelli di NEFA e un aumento del tasso di rimozione del glicerolo dalle cellule epatiche (Reynolds et al., 2003).

In assenza di patologie metaboliche, la maggior parte dei trigliceridi (TG) viene asportata dal fegato tramite le lipoproteine a bassa densità (VLDL).

Tra i maggiori fattori che possono influenzare l'insorgenza di lipidosi epatica vengono considerati la carenza di acidi grassi a lunga catena, la mancata incorporazione dei TG nelle VLDL e un difetto nel trasporto VLDL-mediato (Gruffat et al., 1996).

Una riduzione della Apolipoproteina-B 100 (apoB), una delle principali lipoproteine incorporate nelle VLDL nel fegato, è accompagnata dall'aumento della concentrazione epatica di TG (Gruffat et al., 1997).

L'effetto della sintesi e della degradazione dell'insulina sull'attività delle VLDL è controverso. Infatti alcuni ricercatori (Chirieac et al., 2000) suggeriscono un effetto negativo sulla secrezione delle VLDL in particolare dell'apoB, mentre altri hanno evidenziato un effetto positivo (Bjorsson et al., 1992).

In uno studio recente (Liu et al, 2010) è stata comparata l'espressione genica per i recettori epatici per l'insulina (IR) in bovine con fegato normale, in bovine in corso di chetosi e in bovine con lipidosi epatica.

Nelle bovine con fegato sano l'espressione genica era significativamente superiore rispetto agli altri due gruppi. La riduzione di espressione genica dei recettori epatici indica che si può avere una marcata diminuzione della risposta all'insulina, probabilmente mediata dall'insulino-resistenza.

È stato comunque osservato in alcuni studi che diete stimolanti la produzione di insulina migliorano la ripresa dell'attività ciclica dell'ovaio dopo il parto, anche senza influenzare significativamente il bilancio energetico (Garnsworthy et al., 2009; Miyoshi et al., 2001).

La concentrazione plasmatica di IGF-1 è principalmente mediata dalla funzionalità del fegato, sotto stimolo dell'ormone della crescita (GH). In situazioni di aumentata richiesta energetica, come in caso di bilancio energetico negativo, l'asse GH-IGF è disaccoppiata nel fegato e questo è associato ad una riduzione dell'IGF-1 circolante ed ad un aumento del GH (Thissen et al., 1994).

Il livello di IGF-1 è regolato a differenti livelli. Nella vacca da latte la riduzione nel periodo peri-parto della sintesi di IGF-1 è associata, in particolare, alla concomitante riduzione dei recettori per il GH tipo 1 nel tessuto epatico (Le Roith et al., 2001; Jiang et al., 2005).

2.2 Bilancio energetico negativo e funzionalità riproduttiva

2.2.1 Qualità dell'ocita e dell'embrione

È ormai da molti dimostrato che il bilancio energetico negativo è in grado di influenzare la crescita follicolare a livello dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio (Beam and Butler, 1997; Lucy, 2000; Lucy, 2003; Webb et al., 2004):

- 1) Variazioni metabolico-ormonali che alterano la sensibilità dell'ovaio alle gonadotropine e riducono l'entità e la pulsatilità della secrezione di LH, fondamentale per la crescita e la maturazione degli oociti (azione indiretta).

- 2) Variazione della concentrazione di estrogeni (azione diretta), dovuta ad una bassa estrogenicità dei follicoli che hanno bisogno di una fase di crescita più lunga per accrescere le loro dimensioni e stimolare così la secrezione di LH (Lopez et al., 2004; Sartori et al., 2004).

Inoltre è stato riportato che durante la fase post-parto, una situazione di bilancio energetico negativo può stimolare il metabolismo estrogenico da parte delle cellule epatiche, riducendo così la concentrazione plasmatica di estrogeni in fase pre-ovulatoria (Sangsritavong et al.,

2002). L'alterata concentrazione di estrogeni interferisce con la maturazione follicolare.

Queste variazioni ormonali possono spiegare la tendenza al prolungamento della fase di crescita follicolare e al ritardo dell'ovulazione, che caratterizza spesso l'attività ovarica delle bovine ad alta produzione durante il periodo post-parto.

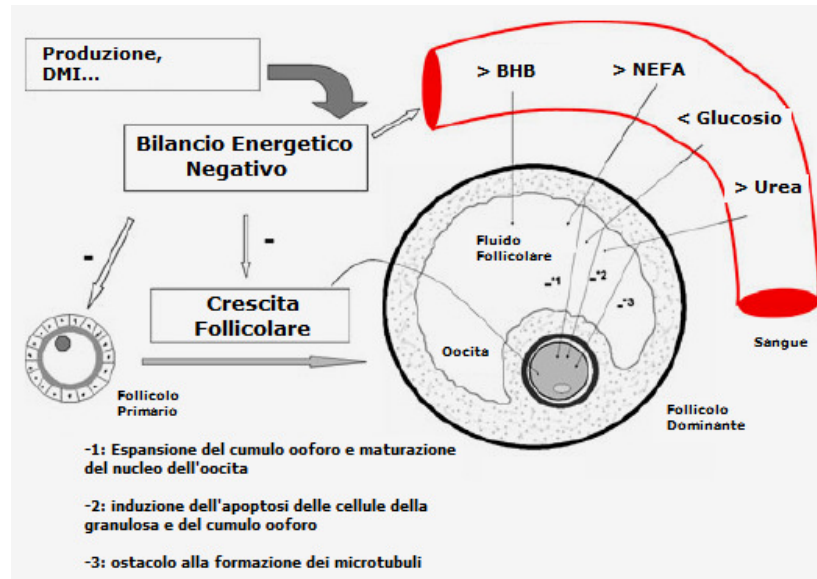


Figura 15: Meccanismi metabolici che legano il bilancio energetico negativo con l'attività follicolare delle bovine (Leroy et al., 2008a)

Lo stato di ipoglicemia che caratterizza il bilancio energetico negativo può influire direttamente sulla qualità degli oociti. Infatti, il glucosio presente nel fluido follicolare è di fondamentale importanza per i processi di maturazione e sviluppo dell'oocita, tramite la via metabolica dei pentoso-fosfati (Leroy et al., 2004).

La liberazione di acidi grassi non esterificati (NEFA) e corpi chetonici nel circolo ematico durante il NEB, può compromettere lo sviluppo follicolare. I NEFA hanno un forte effetto citotossico diretto sulle cellule dell'oocita in quanto ad alte concentrazioni ematiche corrispondono alti livelli di NEFA nel fluido follicolare (Leroy et al., 2005).

Durante la mobilizzazione dei lipidi di riserva, si può verificare il rilascio di progesterone conservato negli adipociti, portando il progesterone plasmatico a livelli sopra-basali. Queste concentrazioni (> 5nmol/l) al momento della prima inseminazione post-parto possono portare ad una diminuzione del tasso di concepimento (Waldmann et al., 2001).

2.2.2 Condizioni uterine post-parto

L'utero della bovina durante il periodo post-parto è particolarmente suscettibile agli agenti patogeni e la suscettibilità all'infezione batterica sembra associata allo stato di immunosoppressione e allo stato energetico di questo periodo produttivo.

I neutrofili (PMN) sono le cellule che svolgono il ruolo immunitario maggiore, come prima linea di difesa contro la colonizzazione batterica nell'utero. La funzione difensiva dei neutrofili inizia a ridursi a partire da 3-5 settimane prima del parto (con un minimo al momento del parto) e ritorna lentamente a livelli normali solo a partire da 2-4 settimane post-parto.

Secondo i dati raccolti in uno studio (Hammon et al., 2006) esiste un'associazione tra bilancio energetico durante il periodo pre-parto e la compromissione della funzionalità dei neutrofili. L'attività dei neutrofili e la concentrazione plasmatica di NEFA sono correlate negativamente, questo suggerisce che le bovine in bilancio energetico negativo sono predisposte a stati di immunosoppressione post-parto.

Risultati simili sono stati osservati anche in altri studi. Secondo Reist et al. (2003b) ad una alta concentrazione di acetone nel latte si associa un aumento del rischio di insorgenza di ritenzione di placenta e metriti.

In uno studio recente (Wathes et al., 2009) sono stati prelevati campioni di tessuto endometriale di bovine a circa 15 giorni post-parto, allo scopo di valutare l'espressione genica e la risposta immunitaria dell'endometrio durante il NEB.

Le bovine con NEB più grave risultano ancora sottoposte ad una risposta infiammatoria uterina più attiva in confronto alle bovine con bilancio energetico normale.

Un bilancio energetico negativo grave impedisce una risposta immunitaria efficace all'attacco dei batteri dopo il parto, prolungando le tempistiche di guarigione dell'utero e compromettendo in seguito l'efficienza riproduttiva.

2.3 Variazioni del Body Condition Score (BCS) ed effetto sulla fertilità

Data la ormai conosciuta influenza del bilancio energetico negativo sul controllo metabolico-ormonale dell'efficienza riproduttiva, molti gruppi di ricerca hanno valutato l'effetto del body condition score (BCS) sui parametri riproduttivi, utilizzando questa scala come stima dello stato energetico della bovina durante il periodo peri-parto.

La durata del periodo di anaestro post-parto è stata associata alle variazioni del BCS. In particolare sembra che la variazione di BCS dal parto alle prime settimane di lattazione possa portare a (Chagas et al., 2007):

- 1) Ritardata ripresa dell'attività ovarica post-parto
- 2) Riduzione della frequenza di pulsazione della secrezione di LH ipofisario
- 3) Riduzione della risposta follicolare all'azione delle gonadotropine
- 4) Riduzione della competenza funzionale dei follicoli

Roche et al. (2007) hanno riportato un'associazione negativa tra la comparsa di sintomi clinici di estro prima del termine del periodo di attesa volontario (PAV) e le variazioni di body condition score dal parto al minimo livello raggiunto appena dopo il parto.

In accordo con questa associazione, Wathes et al. (2007) hanno osservato differenze statisticamente significative nel profilo metabolico plasmatico di bovine con ritardata ripresa dell'attività ovarica post-parto, dati connessi con la variazione di condizione corporea ad inizio lattazione.

Secondo Diskin et al. (2003) la variazione del bilancio energetico (espresso come BCS) non influenza il numero dei follicoli o lo sviluppo follicolare durante il periodo seguente il parto, ma può influenzare l'ovulazione del primo follicolo dominante come possibile conseguenza della riduzione della competenza funzionale dei follicoli durante il bilancio energetico negativo.

Bibliografia	Anno	N° Bovini	N° Parti	Indice Riproduttivo	Effetto del:		
					BCS parto	BCS latt.	BCS < pp.
Ruegg et al.	1995	429	Pluripare	Intervallo parto/1° ov.	ns		ns
				Intervallo parto/1° FA	ns		ns
				Intervallo parto/conc.	ns		ns
Domecq et al.	1997	720	Pluripare	PR e CR/1° FA			↓↓
Markusfeld et al.	1997	768	Pluripare	Calori Silenti	ns		
				Inattività ovarica	↑↑		
				PR e CR/1° FA	ns		
			Primipare	Calori Silenti	↑↑		
				Inattività ovarica	↑↑		
				PR e CR/1° FA	ns		
Loeffler et al.	1999	4382		PR/1° FA		↑↑	
Mosenfechtel et al.	2000	94	Pluripare	Intervallo parto/conc.			↓↓
Gillund et al.	2001	732	Pluripare	PR e CR/1° FA	ns		↓↓
				Intervallo parto/conc.	ns		↓↓
				n° FA/concepimento	ns		↓↓
Pryce et al.	2001	532	Pluripare	Intervallo parto/1° ov.	↓↓	↑↑	↓↓
				Intervallo parto/1° FA	ns	↑↑	↓↓
				PR e CR/1° FA	ns	↑↑	ns
Reksen et al.	2002	162	Pluripare	Intervallo parto/1° CL	ns	↑↑	
			Primipare	Intervallo parto/1° CL	ns	↑↑	
Buckley et al.	2003	6433	Pluripare	Submission rate 21	ns	↑↑	ns
				PR e CR/1° FA	ns	↑↑	ns
Kim and Sun	2003	67	Pluripare	Intervallo parto/1° FA			↓↓
Yamada et al.	2003	54	Pluripare	CR ovsynch	↑↑		↓↓
				Ripresa attività ovarica	↑↑		↓↓
Dechow et al.	2004			Intervallo parto/conc.	↑↑		↓↓
Adamiak et al.	2005			Caratteristiche follicolari			↓↓
Lake et al.	2005	96	Pluripare	CR/1° FA	ns		

				PR	↑↑		
Shrestha et al.	2005	150	Pluripare	Intervallo parto/1° ov.			↓↓
Gossen et al.	2006	211	Pluripare	Patologie ovariche			↓↓
Banos et al.	2007		Pluripare	Intervallo parto/1° FA n° FA/concepimento	↑↑ ↑↑		
Roche et al.	2007	3563	Pluripare	Submission rate 21 Ciclicità dei calori PR e CR/1° FA	ns ns ns	ns ↑↑ ↑↑	ns ↓↓ ↓↓
Jilek et al.	2008	1000	Pluripare	Intervallo parto/1° FA Intervallo parto/conc. n° FA/concepimento	ns ns ns	↑↑ ns ns	
Samurutel et al.	2008	93	Pluripare	Intervallo parto/1° FA CR/1° FA n° FA/concepimento Intervallo parto/conc.			ns ns ns ns
Hoedemaker et al.	2009	234	Pluripare	Patologie ovariche Patologie uterine Intervallo parto/1° FA Intervallo parto/conc. CR/1° FA	↑↑ ↑↑		↓↓ ↓↓ ↓↓ ↓↓ ↓↓
Sakaguchi	2009	24 26	Pluripare Primipare	Intervallo parto/1° ov. Intervallo parto/1° FA Intervallo parto/conc.	ns ns ns		ns ns ns
Van Straten et al.	2009	7 stalle		Intervallo parto/1° FA Intervallo parto/conc. CR/1° FA			↓↓ ↓↓ ↓↓
Allbrahim et al.	2010	40	Pluripare Primipare	Intervallo parto/1° ov. Intervallo parto/1° ov.	ns ns		

Tabella 5: Effetto del BCS al parto, del BCS ad inizio lattazione e della diminuzione di BCS durante il periodo post-parto (BCS < pp) sulle performance riproduttive delle bovine (↑↑ effetto favorevole; ↓↓ effetto sfavorevole; ns effetto non significativo).

CAPITOLO 3

SUPPLEMENTAZIONE DI ACIDI GRASSI NELLA DIETA: RAPPORTO CON LA FERTILITA'

3.1) Effetto dei lipidi sulla secrezione degli ormoni riproduttivi, sulla dinamica follicolare e la qualità dell'embrione

La somministrazione di acidi grassi rumino-protetti alle bovine da latte ha due obiettivi:

- Migliorare il bilancio energetico della bovina in particolare durante i periodi di scarsa assunzione di alimento (es. stagione estiva).
- Sfruttare la particolare attività metabolica che alcuni di questi acidi grassi possiedono.

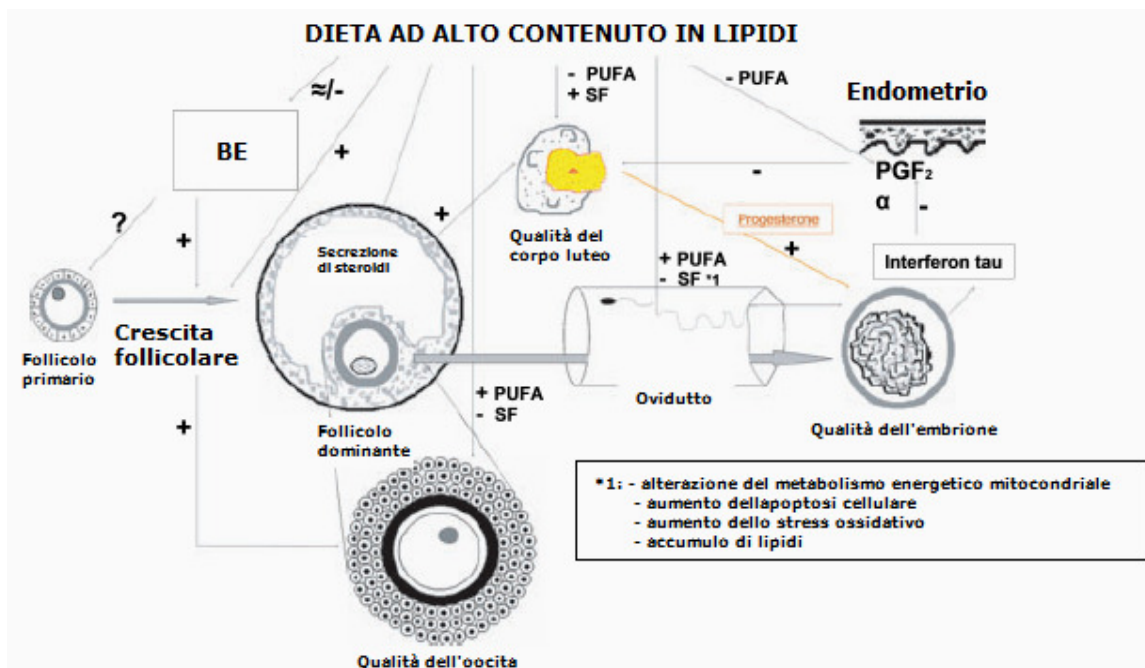


Figura 16 : Rappresentazione schematica dei maggiori meccanismi attraverso i quali gli acidi grassi possono influenzare la funzionalità delle strutture ovariche e la qualità degli oociti e degli embrioni.

Gli acidi grassi promuovono la crescita follicolare e la steroidogenesi, con effetto positivo sulla qualità dell'oocita e la sopravvivenza dell'embrione, mediata in particolar modo dalla minor secrezione di prostaglandine da parte delle cellule della mucosa uterina.

PUFA: acidi grassi poli-insaturi; SF: acidi grassi mono-insaturi; BE: bilancio energetico; PGF₂α: prostaglandine F₂α (Leroy et al., 2008b, modificata).

3.1.1 Bilancio Energetico

L'aggiunta di acidi grassi in razione durante il periodo post-parto, o comunque ogni volta si osserva un calo di ingestione di alimento nella mandria, incrementa il livello energetico della dieta.

L'effetto sul bilancio energetico della bovina da latte dipende esclusivamente dall'aumentata densità energetica della razione, infatti l'ingestione di alimento rimane pressoché invariata. In particolare, sembra che a seguito dell'aggiunta di grassi in razione si possa verificare un ulteriore lieve calo dell'ingestione, a causa della maggior produzione di colecistochinina endogena e della riduzione delle fermentazioni ruminali (Choi et al., 1996).

Non tutti i gruppi di ricerca concordano sull'effetto benefico degli acidi grassi sul bilancio energetico della bovina (Moallem et al., 2010; Lake et al., 2005).

3.1.2 Insulina

L'effetto benefico degli acidi grassi sulla funzionalità riproduttiva dipende anche dalla riduzione della concentrazione ematica di insulina conseguente alla loro introduzione nella dieta delle bovine (Garnsworthy et al., 2008).

La diminuzione della concentrazione di insulina a seguito dell'aggiunta di lipidi in razione è stata osservata da molti studi (Choi and Palmquist, 1996; Khorosani et al., 1992; Becu-Villalobonus et al., 2007).

In questo caso però si può osservare una certa contraddizione sugli effetti dell'insulina sull'attività riproduttiva. Infatti, le diete che stimolano la produzione di insulina possono avere un effetto benefico sulla ripresa dell'attività ciclica dell'ovaio nel periodo post-parto, mentre le diete che deprimono la produzione di insulina possono migliorare la qualità dell'oocita e lo sviluppo embrionale.

In uno studio recente (Garnsworthy et al., 2009) due diete sono state formulate per indurre un cambio nella concentrazione plasmatica di insulina. La dieta stimolante la produzione di insulina è ricca in amidi, mentre la dieta ad effetto opposto è ricca in lipidi.

I livelli ematici di insulina durante le prime 5 settimane di lattazione si sono alzati in tutte le bovine oggetto di studio, ma con livelli molto alti nel gruppo che ha ricevuto la dieta ad alto contenuto di amidi.

Se la produzione di insulina è ridotta dalle diete ricche in acidi grassi, ci si dovrebbe aspettare un effetto negativo sulla funzionalità riproduttiva. In realtà la ridotta concentrazione plasmatica di insulina è dovuta soprattutto ad una maggiore clearance tissutale dell'insulina presente in circolo, inclusi i tessuti degli organi riproduttivi, con conseguente stimolo alla crescita follicolare.

3.1.3 Steroidogenesi

A seguito della somministrazione di lipidi con la dieta è stato osservato un aumento dei livelli plasmatici e follicolari di colesterolo.

Il colesterolo è un precursore del progesterone prodotto dalle cellule del corpo luteo. La funzione principale del progesterone consiste nel preparare l'utero per l'impianto embrionale e mantenere in seguito la gravidanza.

L'aumento della funzionalità del corpo luteo e della concentrazione ematica di progesterone è stata associata ad un miglior tasso di concepimento (Staples et al., 1997).

Secondo Hopkins et al. (1995) la maggior concentrazione plasmatica di progesterone che si può osservare a seguito della somministrazione di acidi grassi, non è tanto legata alla maggior sintesi da parte delle cellule luteiniche ma al minor tasso di clearance del P4 dal circolo ematico.

Bibliografia	Anno	Rilevamento	Effetto
Carroll et al.	1990	P4 plasmatico 1-12 giorno del ciclo estrale	↑↑↑
Sklan et al.	1991	P4 plasmatico 8-20 giorno del ciclo estrale	↑↑↑
Carroll et al.	1992	P4 plasmatico	↑↑↑
Lucy et al.	1993	P4 plasmatico 1-12 giorno del ciclo estrale	↑↑↑
Spicer et al.	1993	P4 plasmatico 5-12 settimane post-parto	↑↑↑
Hawkins et al.	1995	P4 sierico dopo ovario-isterectomia	↑↑↑
Son et al.	1996	P4 plasmatico 2-12 settimane post-parto	↑↑↑
Beam and Butler	1997	P4 plasmatico	↑↑↑
Lammoglia et al.	1997	P4 follicoli dominanti e follicoli medi	ns
Oldinck et al.	1997	P4 plasmatico	↑↑↑
Garcia-Bojalil et al.	1998	P4 plasmatico 1-7 settimane post-parto	↑↑↑
Moallem et al.	1999	P4 plasmatico	↑↑↑
Fahey et al.	2002	P4 plasmatico	ns
Grant et al.	2003	P4 plasmatico	ns
Ambrose et al.	2006	P4 plasmatico	ns
Ponter et al.	2006	P4 plasmatico	ns
Petit and Twagiramungu	2006	P4 plasmatico	↑↑↑
Castaneda-Gutierrez et al.	2007	P4 plasmatico	↑↑↑
Heravi Moussavi et al.	2007	P4 plasmatico	ns
Van Knegsel et al.	2007	P4 plasmatico	ns
Zachut et al. (1)	2008	P4 plasmatico	↑↑↑

Tabella 6: Effetto della aggiunta di lipidi nella dieta sulle concentrazioni di progesterone (P4) nel plasma e nel liquido follicolare.

3.1.4 Sintesi di prostaglandina F2 α

L'acido arachidonico precursore della prostaglandina F2 α (PGF2 α) può essere assunto tramite la dieta oppure essere sintetizzato de novo partendo dall'acido linoleico, attraverso una conversione che comprende due desaturazioni catalizzate dall'enzima elongasi.

La sintesi degli eicosanoidi della serie 2 inizia in seguito alla liberazione di acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana, azione catalizzata dalla fosfolipasi A2 (PLA2).

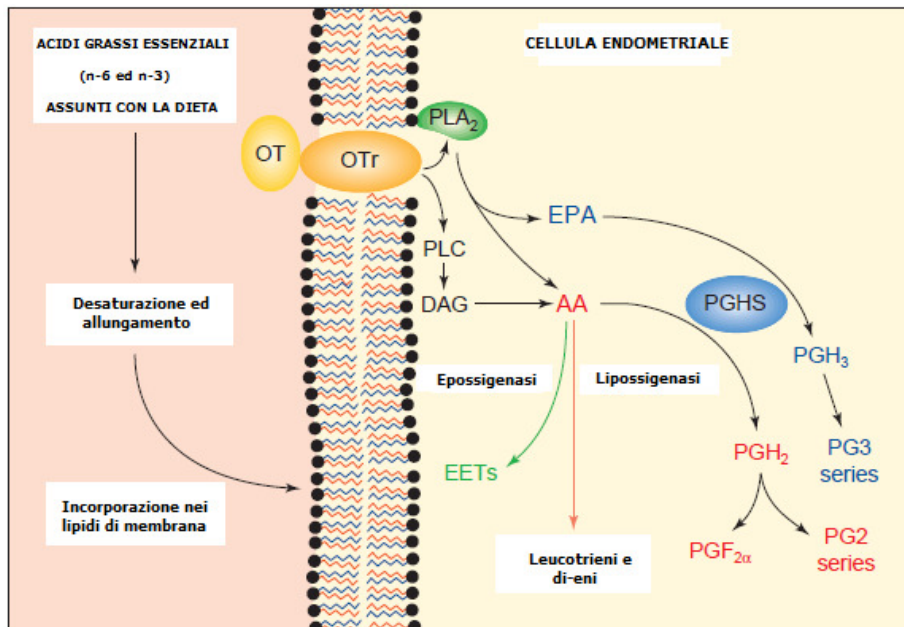


Figura 17: Rappresentazione schematica del metabolismo degli acidi grassi della famiglia degli Ω -6 e Ω -3 (PUFAs) e del potenziale meccanismo con il quale viene regolata la secrezione di PGF2 α . Gli acidi grassi poli-insaturi assunti con la dieta, in seguito alla loro desaturazione e allungamento in situ, vengono incorporati nei fosfolipidi di membrana. Il legame dell'ossitocina (OT) con i recettori specifici di membrana (OTr) stimola l'attività della fosfolipasi A2 (PLA2) e della fosfolipasi C (PLC). L'attività di questi enzimi aumenta la disponibilità di acidi grassi per l'enzima PGH-sintetasi (PGHS). L'acido eicosapentaenoico (EPA) porterà alla produzione di prostaglandine della serie 3, mentre l'acido arachidonico (AA) alle prostaglandine della serie 2 (Mattos et al., 2000).

Alcuni studi hanno dimostrato come la somministrazione di acidi grassi della famiglia degli Ω -3 e Ω -6 riduca la sintesi di eicosanoidi.

L'aggiunta di farina di pesce (5,4% della sostanza secca in razione) contenente acido eicosapentaenoico e docosaesaenoico influenza la secrezione uterine di prostaglandine F2 α nella bovina da latte (Thatcher et al., 1997).

Alcuni autori (Oldick et al., 1997), a seguito dell'infusione di alimento ad alta concentrazione di acido linoleico (17%) nell'abomaso, hanno osservato l'attenuazione nel rilascio di PGFM in risposta all'iniezione di ossitocina al 15 giorno del ciclo estrale sincronizzato.

Cheng et al. (2000) hanno valutato l'effetto della somministrazione di acidi grassi poli-insaturi del gruppo Ω -3 e Ω -6, sulla secrezione endometriale di prostaglandine misurando la concentrazione di PGs nel medium di coltura delle cellule endometri ali a seguito di espianto.

Le bovine alimentate con dieta ricca in PUFA Ω -3 e PUFA Ω -6 hanno manifestato significative riduzioni nella secrezione di prostaglandine nell'utero (anche riduzione > 50%) e nella sensibilità delle cellule all'azione dell'ossitocina.

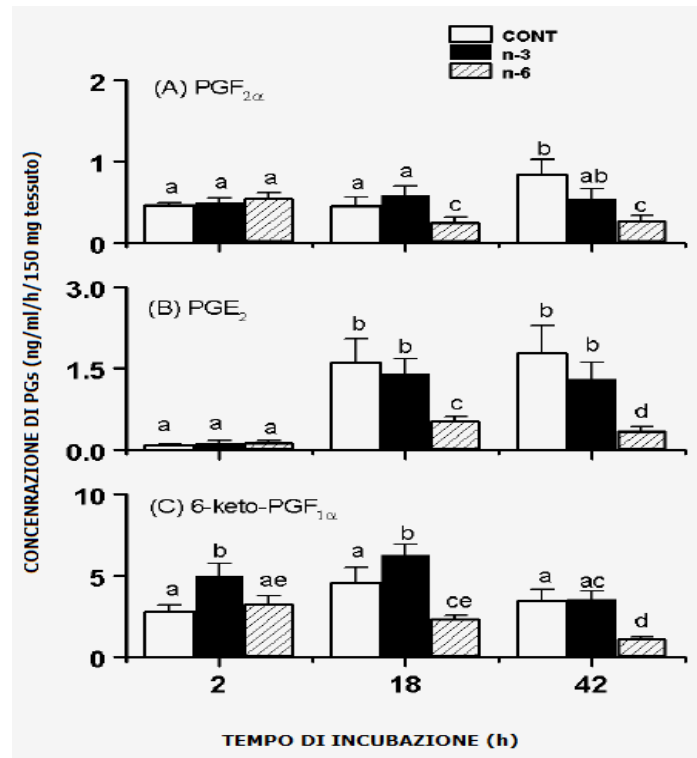


Figura 18: Produzione basale di prostaglandine (A: PGF_{2α}, B: PGE₂, C: 6-keto-PGF_{1α}) misurata su cellule endometriali ottenute da bovine alimentate con razione a differente livello di PUFA (gruppo controllo CONT, gruppo PUFA Ω -3, gruppo PUFA Ω -6). Il livello di PGs è stato misurato a 2, 18 e 42 ore dall'inizio della coltura in vitro. I medie evidenziate con differenti lettere sono statisticamente significativi ($p < 0,05$) (Cheng et al., 2000).

Mattos et al. (2002) hanno osservato che la somministrazione di acidi grassi del gruppo Ω -3 (sottoforma di farina di pesce) con la dieta, porta ad una

riduzione della secrezione di prostaglandine F2a in seguito a sincronizzazione e trattamento con ossitocina 15 giorni dopo l'ovulazione.

Secondo Mattos et al. (2004) la somministrazione di farina di pesce contenete acidi grassi del gruppo Ω -3 riduce significativamente la sintesi di prostaglandine F2a da parte delle cellule uterine e altera il profilo acidico del grasso del latte.

Obiettivo di quest'ultimo studio era stimare l'effetto dell'aggiunta di olio di pesce sulla secrezione uterina di prostaglandine, sulla produzione di latte, sulle caratteristiche del latte e sullo stato metabolico delle bovine durante il periodo peri-parto, confrontandoli con un gruppo di bovine alimentate con olio di oliva. Le bovine che hanno ricevuto olio di pesce presentavano livelli significativamente ridotti di metaboliti delle prostaglandine rispetto alle bovine alimentate con olio vegetale.

In uno studio recente (Caldari-Torres et al., 2006) è stato valutato come, in seguito alla somministrazione di diete ricche di PUFA Ω -3, la produzione di prostaglandine F2a da parte delle cellule endometriali dipenda dalla concentrazione uterina di PUFA Ω -3 e PUFA Ω -6. Anche in questo caso il livello di prostaglandine prodotto è stato misurato nel medium di coltura delle cellule endometri ali dopo espianto.

L'aumento del tasso di gravidanza che spesso si osserva in seguito alla somministrazione di acidi grassi alle bovine da latte, può essere mediato dalla ridotta secrezione di prostaglandine F2a da parte delle cellule endometri ali, dalla minor sensibilità all'ossitocina delle stesse cellule e dalla minor sensibilità alle PGF2a delle cellule luteiniche.

Infatti la soppressione della secrezione di prostaglandine F2a e il mantenimento dell'attività del corpo luteo sono steps fondamentali per l'impianto embrionale e il mantenimento della gravidanza.

La riduzione della secrezione uterina di prostaglandine indotta dalla somministrazione di acidi grassi poli-insaturi della famiglia Ω -3 e Ω -6, potrebbe essere uno dei maggiori fattori che legano la nutrizione alla sopravvivenza embrionale nella bovina da latte.

I meccanismi attraverso i quali gli acidi grassi possono inibire la sintesi di prostaglandine da parte delle cellule uterine sono differenti (Mattos et al., 2000):

a) **RIDUZIONE DELLA SINTESI DI ACIDO ARACHIDONICO**

Gli acidi grassi poli-insaturi possono ridurre la sintesi di acido arachidonico dalle cellule di tessuti extra-uterini e ridurre l'incorporazione dell'acido arachidonico nei fosfolipidi di membrana; sull'attività delle

cellule epatiche sono particolarmente attivi gli acidi grassi eicosapentaenoico e docosaheptaenoico.

b) **COMPETIZIONE DEGLI ACIDI GRASSI Ω -3 SULL'ATTIVITA' DELLE Ω -6-DESATURASI**

La processazione degli acidi grassi Ω -3 da parte della Ω -6-desaturasi crea un meccanismo di competizione che riduce la conversione dell'acido linoleico ad acido arachidonico, operata normalmente dalla stessa Ω -6-desaturasi.

c) **ALTERAZIONE DEL PROFILO LIPIDICO NELLA MEMBRANA PLASMATICA**

La riduzione della disponibilità di acido arachidonico per l'incorporazione nei fosfolipidi della membrane plasmatica si traduce in una maggiore incorporazione di altri acidi grassi anche non precursori degli eicosanoidi. È stato osservato come il pool di acidi grassi che viene incorporato nei fosfolipidi di membrana cambia composizione circa tre settimane dopo la somministrazione di diete ricche in acidi grassi Ω -3 (Mattos et al., 2000).

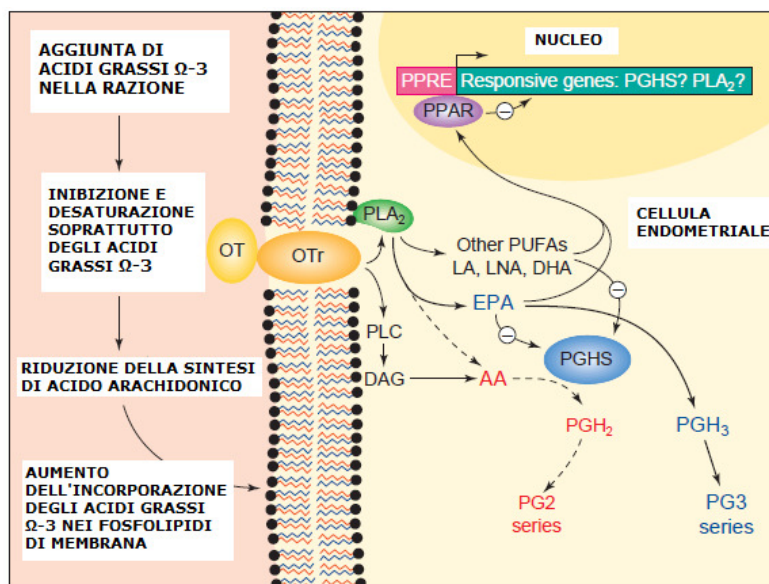


Figura 19: Incorporazione degli acidi grassi omega 3 nei fosfolipidi di membrane a discapito dell'acido arachidonico in seguito alla somministrazione di razione ricche in acidi grassi poli-insaturi. Gli acidi grassi Ω -3 inibiscono l'attività della desaturasi a spese della incorporazione degli acidi grassi omega 6 nei fosfolipidi di membrana. La minor disponibilità di acido arachidonico nella membrana plasmatica risulta in una minor sintesi di prostaglandine. PGHS prostagline-H sintetasi, LNA acido linolenico, LA acido linoleico, DHA acido docosaheptaenoico, PPAR recettori attivanti la proliferazione dei perossisomi, PLA₂ fosfolipasi A₂, PPREs elementi di risposta per la proliferazione dei perossisomi, DAG diacilglicerolo (Mattos et al., 2000, modificata).

d) COMPETIZIONE DEI PUFA PER LA PROSTAGLANDINE H SINTETASI (PGHS)

Un altro possibile meccanismo attraverso cui la somministrazione di acidi grassi può ridurre la sintesi di prostaglandine consiste nella competizione che gli acidi grassi poli-insaturi possono avere sulla prostaglandine H sintetasi (PGHS) nei confronti dell'acido arachidonico, in particolare promuovendo la sintesi di prostaglandine della serie 3 a discapito delle prostaglandine della serie 2 (compresa la PGF_{2a}).

L'attività riproduttiva dipendente dalle prostaglandine della serie 2 può risultare quindi compromessa.

e) EFFETTO SULL'ESPRESSIONE GENICA PER LA PGHS

La somministrazione di acidi grassi poli-insaturi inibisce l'espressione dei geni coinvolti nella sintesi delle prostaglandine, in particolare codificanti per la PLA₂ e la PGHS. Il meccanismo proposto comprende l'attivazione dei fattori di trascrizione del nucleo cellulare, come i recettori attivanti la proliferazione dei perossisomi (PPRAs). Ancora non è stato chiarito il legame che regola i PPRAs ai geni che codificano per la PLA₂ e la PGHS.

3.2) Influenza dei lipidi inclusi nella razione sulle performance riproduttive

Bibliografia	Anno	Tipo di Acido Grasso	INDICI RIPRODUTTIVI					
			Qualità Strutture Ovariche	Sviluppo Embrionale	CR alla 1°FA	PR	DO	Intervallo Parto/1° Ovulazione
Beam and Butler	1997		↑↑↑					
Burke et al.	1997	Farina pesce	ns			ns		
Oldinck et al.	1997	CLA						
Moallem et al.	1999	CSFA	↑↑↑					
Fahey et al.	2002	Megalac Plus			↑↑↑		↑↑↑	
Mattos et al.	2002	Farina pesce	↑↑↑					
Perfield et al.	2002	CLA		ns				
Petit et al.	2002	Megalac	ns	ns				
Robinson et al.	2002	PUFA	↑↑↑					
Grant et al.	2003	CLA						
Petit et al.	2004	Megalac	ns					
Boken et al.	2005	Olio soia						↑↑↑
Castaneda-Gutierrez et al.	2005	CLA					ns	
Ambrose et al.	2006	CLA	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑			
Bilby et al.	2006	PUFA	↑↑↑					
Ponter et al.	2006	Semi lino	↑↑↑					
Petit and Twagiramungu	2006	CLA	↑↑↑	↑↑↑	ns			
Castaneda-Gutierrez et al.	2007	CLA	ns					
Fouladi-Nashta et al.	2007		↑↑↑					
Heravi Moussavi et al.	2007		ns					
Moallem et al.	2007		↑↑↑					
Thangavelu et al.	2007	CLA	↑↑↑					
Van Kneysel et al.	2007							↑↑↑
Childs et al.	2008	n3 PUFA	ns	ns				
Zachut et al. (1)	2008	PUFA						
Aguilar-Perez et al.	2009	LCFA				ns	ns	
Carriquiry et al.	2009	n3 PUFA	↑↑↑					
Cerri et al.	2009	CLA	ns	↑↑↑				
Colazo et al.	2009						↑↑↑	↑↑↑
Lopes et al.	2009	PUFA				↑↑↑		
Zachut et al. (2)	2010	n:6/n:3	↑↑↑					

Tabella 7: Effetto dell'aggiunta di acidi grassi in razione sui principali indici riproduttivi (↑↑↑ effetto statisticamente significativo; "ns" effetto non significativo; "CR" conception rate; "PR" pregnancy rate; "DO" days open)

La maggior parte degli studi effettuati negli ultimi 15 anni ha evidenziato un effetto significativo degli acidi grassi aggiunti alla dieta sulla qualità e lo sviluppo delle strutture ovariche. Per queste si intende il diametro dei follicoli dominanti e il diametro del corpo luteo in seguito alla sincronizzazione dell'estro.

In tutti gli studi le bovine sono state sottoposte ad induzione dell'estro in seguito al parto e le misure sulle ovaie sono state effettuate tramite ispezione degli organi riproduttivi in sede di macellazione oppure con visita ecografica. Questi risultati sono correlati all'effetto dell'azione metabolica dei lipidi in particolare su steroidogenesi e sintesi di prostaglandine dall'endometrio.

L'effetto dei lipidi sui principali indici riproduttivi spesso non è stato preso in considerazione oppure, in certi studi (Burke et al., 1997; Castaneda-Gutierrez et al., 2005; Petit et Twagiramungu, 2006; Aguilar-Perez et al., 2008), non è stato osservato un effetto statisticamente significativo.

Alcuni ricercatori hanno comunque evidenziato un effetto positivo dell'aggiunta di acidi grassi al razione delle bovine, in particolare per quanto riguarda l'intervallo parto/prima ovulazione, il pregnancy rate, il conception rate e i days open (Fahey et al., 2002; Boken et al., 2005; Ambrose et al., 2006; Van Knegsel et al., 2007; Colazo et al., 2009).

CAPITOLO 4

LIVELLO PROTEICO DELLA DIETA, DEGRADABILITA' RUMINALE DELLE PROTEINE E LIVELLO DI UREA EMATICA: EFFETTO SULLA CAPACITA' RIPRODUTTIVA DELLA BOVINA

L'aumento nelle razioni delle bovine da latte della concentrazione di proteine degradabili e indegradabili può contribuire alla riduzione della fertilità della bovina.

A questo eccesso fanno seguito variazioni fisiologiche della funzionalità ovarica e delle caratteristiche dell'ambiente uterino, spesso mediate dalle alterazioni della produzione di progesterone e dall'aumento degli effetti del bilancio energetico negativo.

4.1) Variazione delle caratteristiche del fluido follicolare

Hammon et al. (2004) hanno condotto due prove sperimentali per studiare la relazione tra livello di urea plasmatica (PUN) con la concentrazione di urea e ammoniaca nel fluido follicolare di follicoli preovulatori (prova 1) e la relazione tra PUN e stadio del ciclo estrale con la concentrazione di urea nel liquido uterino di bovine ad inizio lattazione (prova 2).

Le bovine sono state suddivise a seconda del livello plasmatico di urea in due gruppi prendendo come riferimento la concentrazione ematica di 20 mg/dl. Nell'esperimento 1 il sangue e il fluido follicolare sono stati prelevati al 38 giorno di lattazione (momento del primo calore a seguito di sincronizzazione degli estri), mentre nell'esperimento 2 il fluido uterino e il sangue sono stati campionati al giorno del primo calore e 7 giorni dopo.

Il fluido follicolare e il fluido uterino presentavano livelli di urea ed ammoniaca molto alti nel gruppo di bovine con livello plasmatico di urea > 20 mg/dl, rispetto alle bovine con PUN < 20 mg/dl.

Questo studio ha confermato il lavoro svolto da un altro gruppo di ricerca (Sinclair et al., 2000), in cui gli oociti raccolti (durante il periodo di sviluppo del follicolo antrale) da manze alimentate con diete stimolanti la produzione di ammoniaca nel ruminale presentavano un basso tasso di clivaggio, rispetto alle bovine alimentate con diete molto energetiche.

4.2) Modificazioni a carico dell'ambiente uterino

Il successo dello sviluppo embrionale dipende in particolar modo dalle condizioni dell'ambiente uterino, soprattutto nelle primissime fasi della gestazione. Le variazioni cicliche fisiologiche dell'ambiente uterino sono conseguenza delle secrezioni endometri ali direttamente regolate dalla produzione ovarica di ormoni steroidei.

Jordan et al. (1983) hanno valutato l'effetto di due diverse diete sull'ambiente uterino a diverse fasi del ciclo estrale. Le bovine che hanno ricevuto una dieta al 23% di proteine presentavano alti livelli di urea e ammoniaca ematiche, urea nel fluido uterino e variazioni significative della composizione minerale dello stesso fluido (potassio, fosforo e magnesio) rispetto alle bovine alimentate con dieta al 12% di proteina.

Differenze significative sono state osservate anche nelle variazioni di pH del fluido follicolare (Elrod and Butler, 1993; Elrod et al., 1993; Ocon and Hansen, 2003). Il Ph uterino normalmente varia da 6,80 al momento dell'estro a circa 7,00 una settimana dopo. Questa diminuzione dell'acidità è ridotta dall'eccessiva somministrazione di proteine con la razione.

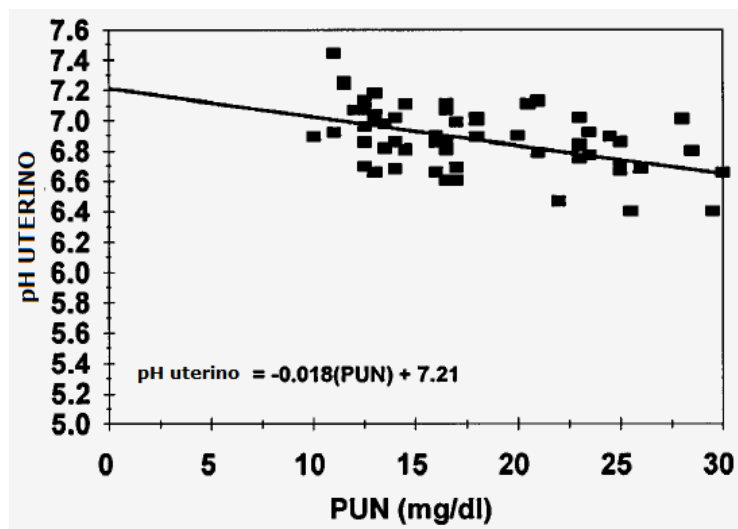


Figura 20: Correlazione tra concentrazione plasmatica di urea (PUN) e pH del fluido uterino in bovine in lattazione, plasma prelevato durante 36 ore. Per l'equazione di regressione $R^2 = 0.22$ (Butler, 1998).

Da questi due studi risulta che alte percentuali di proteine nella dieta possono ridurre la fertilità della bovina, interferendo con l'effetto del progesterone sull'endometrio.

Secondo Elrod et al. (1993) l'effetto dell'eccesso di proteine nel razionamento sull'ambiente uterino, è esclusivamente legato alla concentrazione elevata di urea e ammoniaca nel plasma e alle variazioni di pH nell'utero.

L'acidità del fluido uterino aumenta, a seguito dell'eccesso di proteine nella dieta, di circa 0,1 unità pH per ogni 5 mg/100ml di urea plasmatica.

Secondo Butler et al. (1998) le cellule endometriali rispondono ad un eccesso di urea ed ammoniaca nel fluido uterino e al conseguente aumento dell'acidità, con una maggiore produzione di prostaglandine F2a. Infine, l'ambiente uterino conseguente all'aumento dell'ammoniaca risulta ostile alla motilità degli spermatozoi (Westwood et al., 1998).

Fahey et al. (2001) hanno valutato la riduzione della qualità degli embrioni di una pecora donatrice alimentata con dieta ad elevata concentrazione proteica, ma non hanno evidenziato effetti negativi sulla sopravvivenza embrionale una volta impiantati in una pecora alimentata con la stessa dieta.

Questi ricercatori suggeriscono che l'effetto negativo dell'urea sulla qualità degli embrioni è soprattutto legata alla funzionalità di follicoli e ovidutto, piuttosto che alle alterazioni delle caratteristiche dell'ambiente uterino. Risultati simili sono stati osservati anche da altri ricercatori (Papadopoulos et al., 2001; Rhoads et al., 2006).

Embrioni prelevati da bovine con concentrazioni ematiche elevate di urea (> 24 mg/dl) per alcune settimane, hanno presentato bassi tassi di gravidanza (Rhoads et al., 2006).

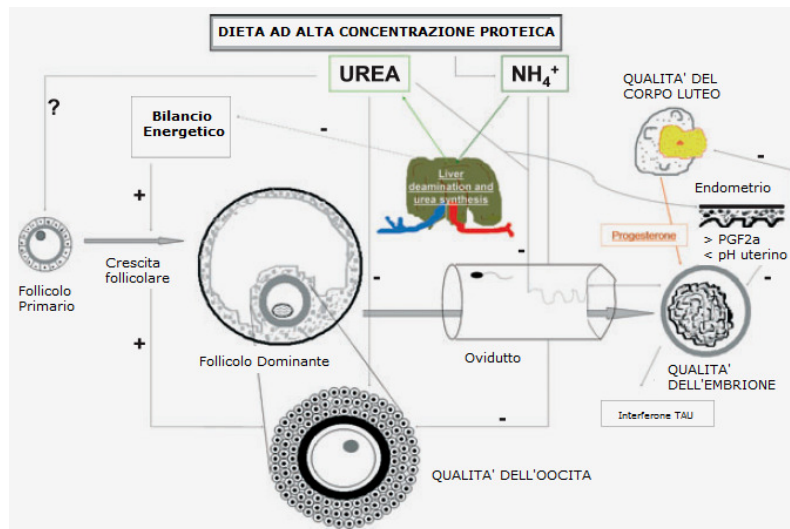


Figura 21: Rappresentazione schematica dei maggiori meccanismi attraverso i quali l'alta concentrazione proteica nella dieta può influire sulla qualità di oocita ed embrione (Leroy et al., 2008b)

4.3) Variazione della concentrazione plasmatica di progesterone

L'eccesso di azoto nella dieta delle bovine è in grado di influenzare anche la concentrazione plasmatica del progesterone.

Jordan and Swanson (1979b) hanno riportato come le bovine alimentate con dieta al 12.7% di proteine durante il periodo prossimo all'inseminazione hanno poi manifestato una concentrazione ematica di progesterone maggiore rispetto alle bovine alimentate con diete al 16.3 e al 19.3% di proteina. Risultati simili sono stati osservati anche in altri studi (Sonderman et al., 1999; Staples et al., 1993; Son et al., 1996; Larson et al., 1997; Garcia-Bojalil et al., 1998; Dawuda et al., 2004; Law et al., 2009).

In altri studi l'effetto dell'aumento della concentrazione di urea nel sangue non ha avuto effetti significativi sul livello plasmatico di progesterone (Garcia-Bojalil et al., 1994; Barton et al., 1996).

Queste differenze nei risultati delle ricerche dipendono soprattutto dal differente stato di lattazione delle bovine utilizzate nelle varie prove. Infatti l'elevata percentuale di proteine in razione risulta in una riduzione della concentrazione plasmatica di progesterone soprattutto nelle bovine in lattazione, mentre l'effetto non risulta significativo nelle bovine in asciutta e nelle manze (Blauwiekel et al., 1986; Elrod and Butler, 1993).

L'effetto negativo dell'eccesso proteico sulla concentrazione di progesterone è stato associato soprattutto all'aumento del bilancio energetico negativo causato dal dispendio energetico per detossificare l'ammoniaca in eccesso.

4.4) Effetto della concentrazione di urea nel latte sui parametri riproduttivi

Dato che all'aumentare del livello proteico della razione si associa un aumento della concentrazione di urea nei fluidi e nei tessuti corporei, la valutazione del livello di urea nel latte (MUN) è stata proposta come metodo predittivo per stabilire la funzionalità riproduttiva della bovina da latte.

Butler et al. (1996) hanno osservato che le bovine con MUN >19 mg/dl presentavano un tasso di gravidanza inferiore alle bovine con MUN minore di 19 mg/dl (38.5 vs 52.7). Le bovine risultate gravide avevano una livello di urea nel latte molto basso nei primi 10 giorni dopo la fecondazione artificiale, rispetto alle bovine non gravide. Risultati simili sono stati analizzati da Larsson et al. (1997), che hanno inoltre associato livelli alti di urea nel latte a bassi livelli di progesterone.

In alcuni studi è stato evidenziato come bassi livelli di urea nel latte si associano a scarsa efficienza riproduttiva (Gustaffson and Carlsson, 1993;

Hojman et al., 2004). Questo effetto negativo è probabilmente dovuto alla scarsa presenza di proteine degradabili a disposizione della microflora ruminale.

4.5) Interazione tra l'eccesso di proteine nella dieta e il bilancio energetico negativo

È stato osservato come l'eccesso di proteina degradabile a livello ruminale (RDP) nella dieta, può esacerbare il bilancio energetico negativo della bovina e quindi, i suoi effetti negativi sulla funzionalità riproduttiva (Butler, 1998).

Secondo Staples and Thatcher (2001) questo effetto è legato in particolar modo alla maggior richiesta di energia per detossificare l'ammoniaca prodotta a livello ruminale.

Queste osservazioni vengono confermate anche da uno studio (Garcia-Bojalil et al., 1998) in cui l'effetto negativo dell'eccesso di RDP sulla fertilità viene ridotto dall'aggiunta in razione di sali di calcio di acidi grassi. Inoltre gli stessi ricercatori hanno valutato come l'inclusione nella dieta di acidi grassi è in grado di diminuire l'effetto negativo delle RDP in eccesso a carico della concentrazione plasmatica di progesterone.

In questo studio è stata misurata una perdita di peso vivo di circa 50 kg durante i primi 28 giorni di lattazione in bovine alimentate con dieta al 15,7% di proteine degradabili (DIP) rispetto a bovine a cui è stata somministrata una razione all'11,1%.

Ricerche meno recenti hanno misurato una perdita di peso statisticamente significativa in bovine con razione al 20% di proteine rispetto agli animali alimentati con diete al 14% (Holtz et al., 1986; Sonderman and Larson, 1989). Bruckental et al. (1989) hanno osservato che il livello minimo di calo di peso corporeo a 24 giorni dopo il parto è di circa 60 grammi al giorno più basso nelle bovine alimentate con dieta al 21,6% di proteine rispetto a quelle alimentate al 17%.

Nell'interazione tra eccesso proteico e metabolismo energetico, rientra inoltre l'attività metabolica del fegato.

Le funzioni epatiche sono parzialmente compromesse in caso di eccesso di ammoniaca nel circolo ematico. È stato osservato come l'efficienza metabolica del fegato di sintetizzare glucosio partendo dall'acido propionico è notevolmente ridotta in caso di eccesso di ammoniaca (Overton et al., 1998). A questo fa seguito una ulteriore diminuzione del bilancio energetico con incremento dell'utilizzazione dei lipidi di riserva e successivo danno agli epatociti.

Bibliografia	Anno	BUN (mg/dl)	RDP (%SS)	RUP (%SS)	Intervallo Parto/1° OV	CR 1°FA %	Days Open	PR %	PPC	pH Uterino	Qualità Embrione
Carroll et al.	1988										
Ferguson et al.	1988	↑↑↑				↓↓↓					
Sonderman et al.	1989	↑↑↑	↑↑↑						↓↓↓		
Blanchard et al.	1990	↑↑↑	↑↑↑								↓↓↓
Canfield et al.	1990	↑↑↑			ns	↓↓↓	ns				
Elrod and Butler	1993	↑↑↑	↑↑↑			↓↓↓				↓↓↓	
Elrod et al.	1993	ns								↓↓↓	
Sklan and Tinsky	1993	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑		↑↑↑					
Staples et al.	1993		↑↑↑		↑↑↑					↓↓↓	
Carroll et al.	1994				ns	ns	ns	ns	ns		
Garcia-Bojalil et al.	1994	↑↑↑							ns		↓↓↓
Barton et al.	1996				↑↑↑	ns	ns	ns	ns		
Butler et al.	1996	↑↑↑						↓↓↓			
Son et al.	1996	↓↓↓			ns	↑↑↑			↑↑↑		
Burke et al.	1997	↑↑↑				↓↓↓					
Larson et al.	1997	↑↑↑							↓↓↓		
Garcia-Bojalil et al.	1998		↑↑↑					↓↓↓	↓↓↓		↓↓↓
McCormick et al.	1999	↑↑↑					↑↑↑	↓↓↓			
Wittwer et al.	1999	↑↑↑				↓↓↓					
Bruckental et al.	2000				ns	ns		ns			
Melendez et al.	2000	↑↑↑				↓↓↓					
Sinclair et al.	2000	↑↑↑									↓↓↓
Westwood et al.	2000				ns	↓↓↓	ns	ns			
Chapa et al.	2001	↑↑↑		↓↓↓		↓↓↓		↓↓↓			
Kenny et al.	2001	↑↑↑	↑↑↑						ns		ns
Rajala-Schultz et al.	2001	↑↑↑						↓↓↓			
Smith et al.	2001	↑↑↑				ns		ns			
Cottrill et al.	2002	↑↑↑						ns			
Laven et al.	2002	↑↑↑							ns		ns
Arunvipas et al.	2004	↑↑↑				↓↓↓					
Dawuda et al.	2004		↑↑↑						↓↓↓		
Guo et al.	2004	↑↑↑				↓↓↓					
Laven et al.	2004	↑↑↑	↑↑↑		ns	ns			ns		ns
Hojman et al.	2004	↑↑↑						↓↓↓			
Mikkola et al.	2005	↑↑↑									ns
Rhoads et al.	2006	↑↑↑						↓↓↓			↓↓↓
Ordenez et al.	2007	↑↑↑			ns				ns		
Konig et al.	2008	↑↑↑			↑↑↑			↓↓↓			
Law et al.	2009							↓↓↓	↓↓↓		
Rehak et al.	2009	↑↑↑				ns					
Jankowska et al.	2010	ns				ns		ns			
Nourozi et al.	2010	↑↑↑					↑↑↑				

Tabella 8: Effetto dell'eccesso proteico nella dieta e della degradabilità delle proteine sulla concentrazione plasmatica di urea (BUN mg/dl) e sui parametri riproduttivi: intervallo parto/prima ovulazione (intervallo parto/1° OV); tasso di concepimento alla prima fecondazione (CR 1° FA); days open; tasso di gravidanza (PR); concentrazione plasmatica di progesterone (PPC); pH del lume uterino; qualità e capacità di sopravvivenza dell'embrione (↑↑↑ effetto positivo significativo; ↓↓↓ effetto negativo significativo; ns assenza di significatività statistica).

CAPITOLO 5

EFFETTO DELL'INTEGRAZIONE VITAMINO-MINERALE SULLA FERTILITA' DELLA BOVINA DA LATTE

5.1) Vitamina E e selenio (Se)

Durante la transizione lo stato di immunosoppressione rende la bovina particolarmente suscettibile alle patologie tipiche di questo periodo (Mallard et al., 1998; Kimura et al., 2002; Kehrl et al., 2006). Questa riduzione della funzionalità immunitaria è legata al rilascio di ormoni dello stress durante il momento del parto (Sordillo et al., 2005) e lo stress ossidativo è considerato un fattore che può contribuire ad aumentare la sensibilità alle patologie post-parto e quindi a diminuire l'efficienza riproduttiva della bovina.

Bibliografia	Anno	Vit. E	Selenio (Se)	Indici Riproduttivi					
				Int. parto/1° OV	Int. parto/1° FA	Days Open	FA/conc.	CR 1° FA	PR 1° FA
Ishak et al.	1983	x	x	↓↓↓		↓↓↓			
Harrison et al.	1984		x	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓		
Hidiroglou et al.	1987	x	x	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓		
Stowe et al.	1988	x	x			↓↓↓	↓↓↓		
Ealy et al.	1994	x							ns
Arechiga et al.	1994	x	x		↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑	
Kim et al.	1997	x	x		↓↓↓		↓↓↓	↑↑↑	
Arechiga et al.	1998	x	x		ns	↓↓↓	↓↓↓		ns
Campbell and Miller	1998	x		↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓			
Baldi et al.	2000	x				↓↓↓	↓↓↓		
Sattar et al.	2007	x	x		↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓		
Brozos et al.	2009	x	x	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓			
Moeini et al.	2009	x	x			↓↓↓	↓↓↓		

Tabella 9: Effetto della somministrazione di sostanze antiossidanti (vitamina E e/o selenio) sugli indici riproduttivi della bovina da latte: intervallo parto/prima ovulazione (Int. parto/1°OV); intervallo parto/prima fecondazione (Int. parto/1°FA); days open; numero di fecondazioni per concepimento (FA/conc.); tasso di concepimento alla prima fecondazione (CR 1°FA); tasso di gravidanza alla prima fecondazione (PR 1°FA). ↓↓↓: Riduzione statisticamente significativa; ↑↑↑: miglioramento statisticamente significativo; ns: nessun effetto significativo.

Lo stress ossidativo si verifica quando l'effetto dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS) supera i meccanismi difensivi antiossidanti.

Le cellule del sistema immunitario sono particolarmente sensibili al danno ossidativo, in quanto la loro membrana cellulare è ricca di acidi grassi polinsaturi molto sensibili alla per ossidazione lipidica.

Alcune sostanze, come vitamina E, β -carotene e selenio, possiedono forti proprietà antiossidanti e sono in grado di migliorare la risposta immunitaria delle bovine (Weiss and Spears, 2006).

Il selenio (Se) esplica la sua funzione antiossidante come componente essenziale degli enzimi glutatione perossidasi. Questi enzimi disattivano il perossido di idrogeno e gli idroperossidi lipidici. Un altro enzima la cui attività dipende dal selenio è la tioredossina reduttasi, che come funzione principale difende le cellule dal danno ossidativo (Mustacich and Powis, 2000).

L'attività dei neutrofili è migliorata dall'assunzione di vitamina E e selenio (Hogan et al., 1990; Weiss et al., 1990; Smith et al., 1997).

La somministrazione di 3000 UI di vitamina E al giorno durante il periodo di transizione aumenta la produzione di anione superossido e interleuchina 1 (IL-1) dai neutrofili, rispetto al gruppo di bovine che non hanno ricevuto l'integrazione (Politis et al., 1995).

La vitamina E e il selenio inoltre hanno un ruolo migliorativo nella chemiotassi dei neutrofili, che durante il periodo post-parto risulta fortemente ridotta (Aziz et al., 1984; Ndiveni and Finch, 1996; Politis et al., 1996; Politis et al., 2001).

Alcuni ricercatori (Cao et al., 1992; Hemingway, 1999) hanno evidenziato come la deficienza di selenio porta conseguenze negative anche nell'immunità cellulo-mediata. Infatti la carenza di questo elemento nella bovina porta ad una ridotta risposta dei linfociti allo stimolo antigenico. Questo fenomeno sembra legato all'alterazione dell'ossidazione dell'acido arachidonico da parte dei linfociti attraverso la via 5-lipossigenasi. In particolare sotto stimolo antigenico e carenza di selenio viene prodotto in minor quantità il leucotriene B₄ (Cao et al., 1992). A causa del coinvolgimento della vitamina E e del selenio nella regolazione del sistema immunitario della bovina, la carenza di queste due sostanze viene spesso associata all'aumento di alcune patologie post-parto della bovina, in particolare ritenzione di placenta e metrite.

Durante le prime ore post-parto, l'utero è soggetto ad una contaminazione massiccia di microorganismi che trovano negli invogli e nei liquidi fetali un substrato di crescita ottimale (questo fenomeno è del tutto normale e spesso inevitabile). La riduzione dell'incidenza delle patologie uterine post-partum, quali ritenzione di placenta e metrite, dipende da due fattori principali:

- 1) La repentina rimozione fisiologica degli invogli fetali (si considera ritenzione di placenta se dopo 12-15 ore dal parto gli invogli non sono ancora stati eliminati).

- 2) La funzionalità immunitaria dell'endometrio per resistere all'azione dei microrganismi patogeni; la comparsa di ritenzione di placenta è stata associata ad una diminuzione dell'efficacia dell'azione immunitaria di linfociti e neutrofili (McEvoy and Pollack, 1994; Sato et al., 1995).

Bibliografia	Anno	Vitamina Selenio		Patologie riproduttive		
		E	(Se)	Ritenzione placenta	Metrite	Cisti ovariche
Morrow et al.	1980	x	x	ns		
Shigemoto et al.	1980	x	x	↑↑↑		
Schingoethe et al.	1982	x	x	ns		
Ishak et al.	1983	x	x	ns	ns	
Tahira et al.	1983	x	x	ns		
Kappel et al.	1984	x	x	ns		
Harrison et al.	1984		x	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
Eger et al.	1985	x	x	↑↑↑		
Harrison et al.	1986		x		↑↑↑	
Hidiroglou et al.	1987	x	x	ns		
Shin and Jo	1987	x	x	↑↑↑		
Stowe et al.	1988	x	x	↑↑↑	ns	
Mueller et al.	1989	x		↑↑↑		
Mohammed et al.	1991		x			ns
Brzezinska et al.	1994	x	x	↑↑↑		
Arechiga et al.	1994	x	x	↑↑↑		
Olson	1995	x	x	↑↑↑		
Lacetera et al.	1996	x	x	↑↑↑		
Jukola et al.	1996		x			ns
Witchell et al.	1996	x	x	↑↑↑		
Erskine et al.	1997	x	x	↑↑↑	ns	
Kim et al.	1997	x	x	ns		
Campbell and Miller	1998	x		↑↑↑		
Kumar et al.	2001	x		ns	ns	
Le Blanc et al.	2002	x		↑↑↑	ns	
Le Blanc et al.	2004	x		↑↑↑		
Gupta et al.	2005	x	x	ns		
Kommisrud et al.	2005		x	↑↑↑		
Sattar et al.	2007	x	x	↑↑↑	↑↑↑	
Rutigliano et al.	2008		x	ns	ns	
Brozos et al.	2009	x	x	↑↑↑		
Cerri et al.	2009		x	ns	ns	
Moeini et al.	2009	x	x	ns		

Tabella 10: Effetto della somministrazione di vitamina E e/o selenio (Se) sull'incidenza delle patologie riproduttive post-parto. ↑↑↑: Miglioramento statisticamente significativo dell'incidenza delle patologie riproduttive; ns: nessun effetto significativo.

Segerson et al. (1980) riportano come la vitamina E e il selenio intervengono nella contrattilità delle cellule miometriali, con effetto positivo sulla velocità di eliminazione degli involti fetali dopo il parto.

Inoltre sembra che lo stress ossidativo, derivante da un'eccessiva produzione e da una ridotta clearance dei ROS, sia coinvolto nel meccanismo patogenetico della ritenzione di placenta, fattore che spiega l'effetto positivo dell'integrazione della vitamina E e del selenio sull'incidenza di questa patologia (Segerson et al., 1981; Campbell and Miller, 1998).

Harrison e colleghi (1984) hanno osservato come la somministrazione per via parenterale di selenio negli ultimi 20 giorni di gestazione, riduca del 25% l'incidenza di metrite e del 50% circa l'incidenza di cisti ovariche. Lo stesso gruppo di ricerca (Harrison et al., 1986) ha evidenziato come la somministrazione di selenio migliora i meccanismi responsabili dell'involuzione uterina dopo il parto.

Altri ricercatori (Erskine et al., 1997) hanno osservato come anche la vitamina E, somministrata per via parenterale 20 giorni prima del parto, migliora l'incidenza delle metriti post-parto.

Sotto il profilo ormonale, il progesterone è coinvolto attivamente nel processo di involuzione uterina e ripresa dell'attività ovarica post-parto. La concentrazione ematica di progesterone nei primi giorni dopo il parto risulta normalmente piuttosto bassa, per poi riprendersi durante il primo ciclo estrale. Secondo Kamada and Hodate (1998) l'integrazione con vitamina E e soprattutto selenio, influenza la rapidità della ripresa della concentrazione plasmatica normale di progesterone.

5.2) Vitamina A e beta-carotene

La vitamina A è una vitamina liposolubile che ha un ruolo di regolazione dello sviluppo, della differenziazione e della crescita cellulare.

Secondo Schweigert and Zucker (1988) i metaboliti della vitamina A influenzano lo sviluppo follicolare, le variazioni dell'ambiente uterino e la maturazione dell'oocita.

La vitamina A risulta necessaria per la normale funzionalità riproduttiva (Hurley and Doane, 1989). Lo studio dell'effetto della carenza di vitamina A è però complicato a causa dello scarso sviluppo corporeo che gli animali manifestano in caso di grave deficienza di questa vitamina.

Nella bovina da latte la carenza di vitamina A oppure del suo precursore, il β -carotene, è stata associata ad una diminuzione del tasso di concepimento (Lotthammer et al., 1976).

In uno studio (Tharnish and Larson, 1992) non sono state osservate differenze statisticamente significative nell'intervallo parto/prima fecondazione e nel tasso di concepimento alla prima fecondazione, tra il gruppo di bovine alimentate con dieta contenente 100000 U.I. di vitamina A e il gruppo alimentato con 1000000 U.I.. Nella stessa ricerca è stato osservato come il tasso di rilevazione dei calori è circa il doppio nelle bovine con diete molto ricche in vitamina A rispetto al gruppo controllo.

In una serie di esperimenti Arechiga et al. (1998) hanno evidenziato l'effetto positivo del β -carotene sul pregnancy-rate (PR) delle bovine testate.

Akar and Gazioglu (2006) hanno osservato come le bovine con un'alta incidenza di ritenzione di placenta presentavano anche basse concentrazioni di beta-carotene nel sangue durante il periodo post-parto e che gli indici riproduttivi di queste bovine risultavano molto inferiori rispetto al gruppo controllo.

Graves-Hoagland et al. (1988) hanno valutato l'effetto del β -carotene e della vitamina A sulla produzione di progesterone da parte delle cellule luteiniche della bovina. La concentrazione di β -carotene nel plasma può avere un effetto significativo sulla funzionalità delle cellule luteiniche, soprattutto quando la concentrazione base nel circolo ematico è bassa e funge da fattore limitante per la funzionalità riproduttiva.

Risultati simili sono stati osservati anche in vivo dallo stesso gruppo di ricerca (Graves-Hoagland et al., 1989). In 39 bovine è stato misurato il livello di progesterone plasmatico a seguito della somministrazione di dieta ricca in β -carotene, inoltre alle bovine sono stati iniettati 100 μ g di GnRH al dodicesimo giorno del ciclo estrale durante il periodo post-parto (30-49 giorni di lattazione).

L'eccesso di vitamina A e beta-carotene nella dieta delle bovine da latte può avere anche effetti negativi sulla capacità riproduttiva. Folman et al. (1987) hanno suddiviso 155 bovine ad alta produzione in tre gruppi sperimentali a differente concentrazione di carotene nella dieta (A: 69 mg di retinolo-acetato pre-parto e 96 mg di R-A post-parto; B: 500 mg di carotene pre-parto e 96 mg di R-A post-parto; C: 500 mg di carotene pre-parto e 700 mg di carotene post-parto). Le bovine che hanno ricevuto la razione del gruppo "C" hanno presentato basse percentuali di tasso di concepimento rispetto alle bovine del gruppo "A" (circa il 50% in meno).

In altri studi (Akordor et al., 1986; Wang et al., 1987; Jukola et al., 1996) l'effetto del β -carotene sulla funzionalità riproduttiva non è risultato significativo.

5.3) Minerali

Il livello ematico di calcio (Ca) e il fosforo (P) non agiscono in modo diretto sull'efficienza riproduttiva della bovina da latte, ma predispongono l'animale a meccanismi patogenetici tipici del periodo post-parto, quali diminuzione dell'assunzione di sostanza secca (DMI) e bilancio energetico negativo (NEB).

Una delle principali funzioni del calcio è permettere la contrazione delle fibre muscolari. Si considera che ad un livello di calcemia di circa 5 mg/dl la motilità dell'abomaso si riduca anche del 70% (Daniel, 1983). Inoltre sembra che la carenza di calcio riduca la produzione di insulina, andando a peggiorare la condizione di bilancio energetico negativo post-parto.

Il corretto tono muscolare del miometrio, durante e nelle prime ore dopo il parto, è fondamentale per permettere l'espulsione degli invogli fetali e iniziare l'involuzione uterina fisiologica.

In alcuni studi è stata valutata l'integrazione di fosforo nella dieta, come metodo per migliorare la fertilità della bovina.

Wu and Satter (2000) hanno sottoposto 42 (primo anno) e 53 (secondo anno) bovine a due razioni differenti in livello di fosforo. Non sono state osservate differenze statisticamente significative negli indici riproduttivi tra i due gruppi di bovini. In un altro studio (Wu et al., 2000) non sono state osservate differenze negli indici riproduttivi di bovine alimentate con tre diete a differenti livelli di fosforo.

Tallam et al. (2005) hanno utilizzato 54 bovine multipare di razza frisona per valutare l'efficacia della concentrazione di fosforo sulla fertilità. Le bovine suddivise in due gruppi (dieta allo 0.35% e dieta allo 0.47% di fosforo), non hanno manifestato differenze evidenti nell'intervallo parto/prima ovulazione, nelle concentrazioni sieriche di progesterone e nelle caratteristiche dei follicoli dominanti. Simili risultati sono stati osservati anche da Seifi et al. (2005).

Ballantine et al. (2002) hanno studiato l'effetto di alcuni micro-minerali (zinco, manganese, rame e cobalto) sull'efficienza riproduttiva bovina.

Trecento bovine sono state suddivise in due gruppi sperimentali e alimentate con due diete rispettivamente arricchite di solfati oppure di un complesso di quattro minerali. Il trattamento ha avuto effetto significativo nella riduzione dei days open e effetto non significativo sull'aumento del tasso di concepimento delle bovine alla prima inseminazione e sulla percentuale di vacche gravide durante la prova. Risultati simili sono stati osservati anche in uno studio precedente (Campbell et al., 1999) dove 60 bovine sono state suddivise in due gruppi sperimentali e alimentate con dieta arricchita in zinco, manganese, rame e cobalto. In questo caso sono state osservate differenze significative nella durata dell'intervallo parto/prima ovulazione.

CAPITOLO 6

PARTE SPERIMENTALE

PROVA 1

Utilizzo di molecole/nutrienti con attività migliorativa sul metabolismo di bovine da latte in fase di transizione: Estratto di "*Sylibum marianum*"

Introduzione

Il cardo mariano (*Sylibum marianum*) è una pianta spinosa della famiglia delle *Compositae*, spontanea delle zone sassose dell'Europa Meridionale e coltivata in Europa Centrale.

Estratto di semi di cardo mariano (silimarina) è utilizzato in molti Paesi e le sue proprietà terapeutiche sono conosciute da più di 2000 anni.

Le proprietà di questi estratti derivano dall'attività di un miscela di principi attivi (Polyak et al., 2010):

- a) Flavonolignani (70-80%), comprendenti silicristina, silidianina, silibina e isosilibina.
- b) Flavonoidi (20-30%), comprendenti quercetina e taxifolina.

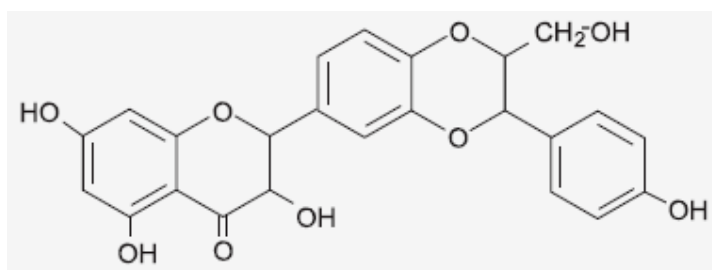


Figura 22: Struttura chimica della silibina (Radko and Cybulsky, 2007).

La silimarina è un composto insolubile in acqua e a seguito di somministrazione orale il tasso di assorbimento è piuttosto basso.

Da studi effettuati nell'uomo e nei cani (Fraschini et al., 2002; Filburn et al., 2007) è stato osservato che il picco di concentrazione plasmatica di silibina dopo somministrazione orale si attesta intorno alle due ore e il tasso di eliminazione dal circolo del 50% della concentrazione raggiunta avviene in circa 6-8 ore.

Il 30-40% della silibina viene escreta attraverso le urine, mentre il 20-40% si ritrova nella bile in forma coniugata. Nella bile il picco di concentrazione di silibina si osserva a circa 2-9 ore dalla somministrazione orale e l'eliminazione può continuare anche 24 ore dopo una singola dose.

In uno studio recente (Krizova et al., 2011) si è voluto determinare il tasso di degradabilità ruminale e di digeribilità della silimarina somministrata per via orale ai bovini.

La digeribilità totale della silibina è stata del 45,5%, i restanti componenti della silimarina hanno avuto un tasso di digeribilità del 100%. La taxifolina ha presentato un tasso di degradabilità ruminale del 59,11%, mentre i rimanenti principi attivi hanno presentato degradabilità compresa tra 23,28% e 35,19%.

In medicina la silimarina è indicata come composto con importanti proprietà epato-protettive. Queste dipendono fondamentalmente da quattro attività metaboliche principali (Radko and Cybulski, 2007):

- 1) Rientra nel processo di perossidazione lipidica limitando i danni da radicali liberi (azione antiossidante).
- 2) Aumenta la permeabilità delle membrane cellulari e ne aumenta la stabilità in caso di intossicazione epatica.
- 3) Regola la funzionalità del nucleo cellulare, promuovendo la sintesi di proteine.
- 4) Inibisce la trasformazione degli epatociti stellati in mio fibroblasti, responsabili del deposito di fibre collagene nel tessuto epatico in caso di cirrosi (azione antifibrotica).

Sulla base della conoscenza delle proprietà epato-protettive dimostrate su altre specie animali, alcuni ricercatori hanno studiato l'effetto della silimarina sulle performance e sul metabolismo delle bovine in fase di transizione.

Tedesco et al. (2004a) hanno valutato l'effetto della silimarina sulla funzionalità epatica. In questo studio sono state utilizzate 20 bovine, suddivise in due gruppi sperimentali. Alle bovine del gruppo trattato sono stati somministrati giornalmente per via orale, 10 g di estratti di cardo mariano da dieci giorni prima del parto fino a 15 giorni di lattazione. Attraverso esame microscopico a seguito di biopsia epatica non sono state osservate differenze significative nella modificazione cellulare del tessuto epatico durante il periodo di transizione.

Vojtisek et al. (1991) hanno osservato come la somministrazione di silimarina migliori la concentrazione plasmatica di beta-idrossibutirrato e acido acetico nelle bovine nel periodo del peri-parto.

Secondo Tedesco et al. (2004c) la somministrazione di 10 grammi di silimarina al giorno da 10 giorni prima del parto e 15 giorni dopo, non ha effetto significativo sui parametri metabolici plasmatici.

Nello stesso studio è stata valutata anche la produttività delle bovine dei due gruppi. Le bovine trattate hanno manifestato una migliore curva di lattazione con un picco maggiore di 2,5 kg al giorno rispetto alle bovine del gruppo controllo (rispettivamente 41,6 kg/gg e 39,1 kg/gg, $p < 0.05$). In questo caso sono stati confermati i risultati di Vojatisek et al. (1991) che hanno osservato un miglioramento della produzione di latte nel post parto nelle bovine trattate rispetto alle bovine controllo.

Le proprietà della silimarina sono state studiate anche in altre specie di ruminanti. In particolare, Tedesco et al. (2004b) hanno studiato l'effetto della somministrazione della silimarina in 24 capre da latte, valutando un miglioramento significativo della produzione, ma nessun effetto sulla composizione del latte.

Recentemente Dehghan et al. (2011) hanno studiato gli effetti degli estratti di cardo mariano su pecore da latte in situazioni metaboliche di bilancio energetico negativo post-parto.

Non sono stati evidenziati differenze significative sulla variazione di peso e condizione corporea delle pecore. I parametri metabolici ematici non hanno mostrato alcuna differenza significativa.

Obiettivi

Obiettivo di questo studio è valutare l'effetto della somministrazione orale di silimarina sulla produzione e sulla composizione del latte, la fertilità e il metabolismo delle bovine da latte.

Materiali e metodi

Per questo studio sono state utilizzate 28 bovine di razza frisona italiana, allevate in una stalla a stabulazione libera (circa 200 bovine in lattazione) per la produzione di latte destinato alla trasformazione in formaggio Parmigiano Reggiano.

Le bovine sono state selezionate all'interno della mandria a seconda del numero di parti (sono state tralasciate le primipare e le bovine oltre i 5 parti), stima della capacità produttiva annuale (dati relativi alla produzione dell'anno precedente, Associazione Provinciale Allevatori), stagionalità di parto, presenza di patologie nella lattazione precedente.

Le bovine sono state suddivise in gruppi omogenei individuati come gruppo controllo e gruppo trattato.

Da 20 giorni prima del parto previsto a 7 giorni post-parto alle bovine del gruppo trattato è stato somministrato estratto di cardo mariano in polvere (Bitrade snc, Mirandola, Italia) per via orale alla dose di 3 grammi/capo/giorno. A causa di errori nella stima del giorno esatto del parto, 5 bovine hanno ottenuto 2 giorni in più di integrazione con silimarina.

Le bovine sono state alimentate durante il periodo di asciutta con fieno di graminaceae (ab libitum) e 3 kg/capo/giorno di mangime complementare per bovine in fase di asciutta. Negli ultimi 10 giorni di asciutta è stato effettuato un adattamento tramite aggiunta di circa 5 kg/capo/giorno di unifeed da lattazione, mentre dal giorno del parto la razione era costituita da unifeed a base di 5,5 kg di fieno di graminaceae, 6 kg di fieno di medica e 10 kg di mangime complementare per bovine in lattazione.

Parametro	Fieno Graminacee		Fieno Medica	
	(tq)	(%)	(tq)	(%)
Umidità	13,27	/	14,10	/
Ceneri	7,50	8,64	10,30	11,99
Proteine	9,96	11,48	16,15	18,80
Grassi	1,48	1,71	1,90	2,21
NDF	56,39	65,02	29,86	34,76
NSC	11,40	13,15	27,69	32,23
NDFd 24h	/	29,95	/	33,45
NDFd 48h	/	32,35	/	42,72
Ca	9,58		20,51	
P	2,84		2,21	
K	16,69		20,55	
Mg	2,61		2,68	
Na	2,20		0,61	

Parametro	Razione Unifeed da Lattazione	
	(tq)	(%)
SS		86,27
Proteine	13,04	15,11
Grassi	2,17	2,51
Amido	16,70	19,36
NSC	32,77	37,99
NDF	35,72	41,4
ADF	22,26	25,8
ADL	3,86	4,48
NDFd 24h		48,81

Tabella 11 e 12: Composizione dei fieni e della razione per bovine in lattazione.

Parametro	Mangime Asciutta	
	(tq)	(%)
SS		89,7
Proteine Grezze	14,48	16,14
Grassi	2,79	3,11
Amido	6,22	6,93
Ceneri	9,95	11,09
Fibra Grezza	13,96	15,56
NDF	42,10	46,93
ADF	14,02	15,63

Tabella 13: Analisi del mangime complementare per bovine in asciutta.

È stato valutato l'andamento della condizione corporea delle bovine (BCS, scala 1-5) durante il periodo post-parto.

Sono stati inoltre raccolti tutti i dati riguardanti la funzionalità riproduttiva (intervallo parto/prima fecondazione, intervallo parto/concepimento, numero di fecondazioni per concepimento), la produzione giornaliera e la composizione del latte (grasso, proteine, conta cellule somatiche SCC, linear score LS).

Le analisi del latte sono state effettuate dall'Associazione Provinciale Allevatori durante i normali controlli funzionali a cadenza mensile.

Sono stati eseguiti prelievi di sangue per valutare il profilo metabolico epatico, renale e minerale delle bovine oggetto di studio. I prelievi sono stati effettuati alla messa in asciutta, a 7 giorni prima del parto, 7 giorni dopo il parto e a circa 30 giorni di lattazione.

Il campione ematico è stato effettuato tramite l'utilizzo di provette contenenti litio-eparina, attraverso la vena coccigea. Il plasma è stato ottenuto mediante centrifugazione a 3500 rpm per 10 minuti, in seguito è stato refrigerato a -20°C.

I parametri plasmatici valutati sono: GOT (glutammato ossalacetato transaminasi), GGT (gamma-glutamyl trans peptidasi), urea, calcio, fosforo, magnesio, proteine totali, albumine, globuline, bilirubina totale e glucosio.

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati mediante l'utilizzo del software SPSS 18.0 attraverso la modalità misure ripetute del modello GLM.

Il modello statistico utilizzato per questa analisi, comprende il trattamento con estratto di cardo mariano (gruppo), le tempistiche di raccolta dei dati (tempo) e l'interazione durata dell'asciutta – campionamento (tempo x gruppo).

Sono state riportate le medie e l'errore standard delle medie. La significatività statistica è stata fissata a $P < 0.05$.

Risultati e discussione

Le performance produttive delle bovine sono state valutate durante i primi 120 giorni di lattazione (tabella 14 e 15).

Dai dati raccolti non sono state osservate differenze statisticamente significative nella produzione giornaliera di latte ($P > 0.05$).

PARAMETRI PRODUTTIVI	GRUPPO CONTROLLO					GRUPPO TRATTATO					p-value	
	30 DIM	60 DIM	90 DIM	120 DIM	SE	30 DIM	60 DIM	90 DIM	120 DIM	SE	Tempo	Gruppo x Tempo
Prod. (kg/gg)	29.30	28.25	28.74	26.75	2.48	29.50	31.57	30.75	29.82	2.62	ns	ns
Grasso (%)	3.14	3.09	3.89	3.70	0.21	3.16	3.21	3.13	3.20	0.18	0.014	0.006
Proteine (%)	3.24	3.14	3.52	3.66	0.27	3.03	3.15	3.22	3.31	0.09	0.000	ns
SCC (x1000)	469.20	371.70	388.70	264.40	184.45	73.62	81.00	176.31	75.38	115.32	ns	ns
LS	4.33	3.73	3.64	3.51	0.70	2.21	2.33	2.84	2.39	0.65	ns	ns
BCS (1-5)	2.80	2.87	2.72	2.65	0.06	2.71	2.79	2.81	2.67	0.05	0.000	0.041

Tabella 14: effetto della somministrazione di silimarina alle bovine in transizione sulla produzione giornaliera, la composizione del latte e la variazione della condizione corporea post-parto (interazione tempo e gruppo x tempo).

Non sono inoltre state rilevate differenze significative nella conta delle cellule somatiche ($P > 0.05$).

La composizione del latte ha mostrato un differenza statisticamente significativa nel linear score (LS). Nei dati produttivi raccolti durante i primi due campionamenti si osserva un linear score migliore nelle bovine trattate rispetto alle bovine del gruppo controllo, rispettivamente 2.21 vs 4.33 ($P < 0.012$) e 2.33 vs 3.73 ($P < 0.037$).

PARAMETRI	Test dei contrasti entro-soggetti (p-value)					
	Tempo			Tempo x Gruppo		
	A vs B	B vs C	C vs D	A vs B	B vs C	C vs D
Latte (kg/gg)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Grasso (%)	ns	0.025	ns	ns	0.007	ns
Proteine (%)	ns	0.008	0.004	ns	0.048	ns
SCC	ns	ns	ns	ns	ns	ns
LS	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BCS	0.037	0.022	0.003	ns	0.004	ns

Tabella 15: Test dei contrasti entro-soggetti delle differenze della produzione, composizione del latte e condizione corporea. A: 30 DIM; B: 60 DIM; C: 90 DIM; D: 120 DIM.

Sono inoltre state osservate due differenze significative nella composizione del latte a 90 e 120 DIM. In particolare le bovine trattate hanno presentato percentuali di grasso inferiori rispetto alle bovine controllo a 90 DIM ($P < 0.033$) e percentuali di proteine del latte inferiori a 120 DIM ($P < 0.036$).

PARAMETRI PRODUTTIVI	Gruppo	Tempo							
		30 DIM	p-value	60 DIM	p-value	90 DIM	p-value	120 DIM	p-value
Latte (kg/gg)	Controllo	29.30		28.25		28.74		26.75	
	Trattato	29.50	ns	31.57	ns	30.75	ns	29.81	ns
Grasso (%)	Controllo	3.14		3.08		3.89		3.70	
	Trattato	3.15	ns	3.21	ns	3.12	0.033	3.29	ns
Proteine (%)	Controllo	3.25		3.14		3.52		3.66	
	Trattato	3.03	ns	3.15	ns	3.21	ns	3.30	0.036
SCC	Controllo	469.20		371.70		388.70		264.40	
	Trattato	73.61	ns	81.00	ns	176.31	ns	75.38	ns
LS	Controllo	4.33		3.73		3.64		3.51	
	Trattato	2.21	0.012	2.33	0.037	2.84	ns	2.39	ns
BCS	Controllo	2.80		2.87		2.72		2.65	
	Trattato	2.71	ns	2.79	ns	2.81	ns	2.67	ns

Tabella 17: Effetto della somministrazione di silimarina sulla produzione giornaliera, sulla composizione del latte e sull'andamento della condizione corporea (interazione per gruppi).

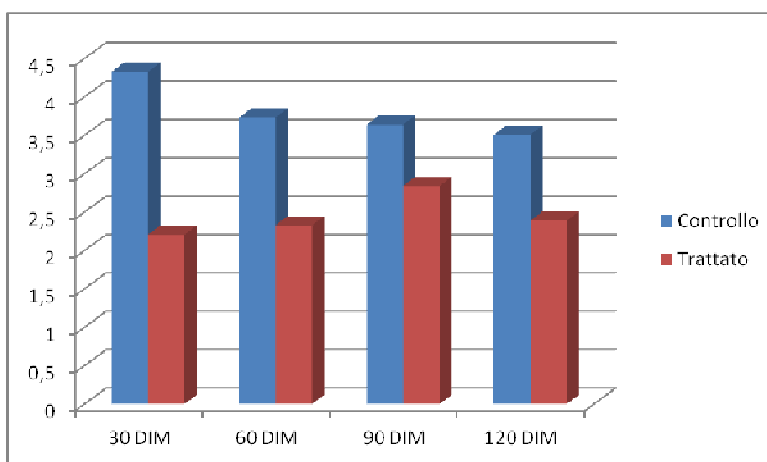


Figura 23: Andamento del linear score (LS) a seguito della somministrazione di silimarina. Le differenze tra bovine del gruppo trattato e bovine del gruppo controllo a 30 DIM e a 60 DIM risultano statisticamente significative (rispettivamente $p < 0.012$ e $p < 0.037$).

Non è stata osservata alcuna differenza significativa nell'andamento della condizione corporea delle bovine ($P > 0.05$).

Dalle analisi del plasma (tabella 18 e 19) non sono risultate differenze significative nella concentrazione di GOT, GGT, urea, proteine totali, albumine, globuline e glucosio ($P > 0.05$).

PARAMETRI EMATICI	GRUPPO CONTROLLO					GRUPPO TRATTATO					p-value	
	Drying off	-7 DIM	7 DIM	30 DIM	SE	Drying off	-7 DIM	7 DIM	30 DIM	SE	Tempo	Gruppo x Tempo
GOT	41.40	44.00	46.50	43.30	3.79	43.54	43.46	47.08	40.15	5.54	ns	ns
GGT	12.63	11.25	10.93	11.70	0.90	13.01	8.01	9.94	10.18	0.85	0.002	ns
Urea	23.55	15.89	22.08	25.53	2.02	22.01	18.13	22.55	26.48	1.61	0.000	ns
Ca	9.69	9.25	9.19	9.36	0.48	9.39	9.26	9.39	9.30	0.30	ns	ns
P	5.60	5.62	5.81	5.56	0.46	5.35	5.68	5.93	5.85	0.23	ns	ns
Mg	2.12	1.97	2.08	2.27	0.12	2.10	2.03	2.00	2.28	0.13	0.001	ns
Proteine Tot.	8.49	7.36	7.57	8.26	0.37	8.71	7.64	8.04	8.48	0.29	0.000	ns
Albumine	3.66	3.25	3.02	3.20	0.19	3.55	3.40	3.19	3.32	0.15	0.000	ns
Globuline	4.82	4.11	4.57	5.06	0.35	5.16	4.25	4.85	5.16	0.40	0.000	ns
Bilirubina	0.08	0.08	0.11	0.09	0.06	0.08	0.12	0.17	0.10	0.05	0.002	ns
Glucosio	60.40	56.10	55.30	57.20	3.94	59.61	56.46	54.54	56.76	1.73	0.017	ns

Tabella 18: Effetto della somministrazione di silimarina alle bovine in transizione, sui parametri metabolici nel plasma (interazione tempo e gruppo x tempo).

Anche per quanto riguarda i parametri indicativi del metabolismo minerale (calcio, fosforo e magnesio) non sono state osservate differenze significative ($P > 0.05$) tra le bovine del gruppo trattato e le bovine del gruppo controllo. Comunque l'andamento dei parametri ematici appare tendenzialmente migliore nelle bovine trattate rispetto alle bovine del gruppo controllo, in particolare i parametri enzimatici che esprimono il metabolismo epatico (GOT e GGT).

PARAMETRI	Test dei contrasti entro-soggetti (p-value)					
	Tempo			Tempo x Gruppo		
	A vs B	B vs C	C vs D	A vs B	B vs C	C vs D
GOT	ns	ns	ns	ns	ns	ns
GGT	0.002	ns	ns	ns	ns	ns
Urea	0.005	0.004	0.041	ns	ns	ns
Ca	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Mg	ns	ns	0.000	ns	ns	ns
Proteine Tot.	0.000	ns	0.000	ns	ns	ns
Albumine	0.008	0.001	0.028	ns	ns	ns
Globuline	0.000	0.010	0.002	ns	ns	ns
Bilirubina	ns	0.027	0.002	ns	ns	ns
Glucosio	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tabella 19: Test dei contrasti entro-soggetti delle differenze dei parametri metabolici plasmatici. A: 30 DIM; B: 60 DIM; C: 90 DIM; D: 120 DIM.

È stata individuata una differenza statisticamente significativa nella concentrazione plasmatica di bilirubina totale (tabella 20). Questo parametro risulta minore nelle bovine trattate rispetto alle bovine controllo nel campionamento effettuato a 7 giorni prima della data prevista di parto, rispettivamente 0.01 vs 0.08 ($P < 0.030$). In questo caso l'andamento dei valori di bilirubina arriva ad invertirsi nelle prime settimane dopo il parto ($P > 0.05$).

PARAMETRI EMATICI	Gruppo	Tempo							
		Drying off	p-value	-7 DIM	p-value	7 DIM	p-value	30 DIM	p-value
GOT	Controllo	41.40		44.00		46.50		43.30	
	Trattato	43.54	ns	43.46	ns	47.08	ns	40.15	ns
GGT	Controllo	12.63		11.25		10.93		11.70	
	Trattato	13.01	ns	8.01	ns	9.94	ns	10.18	ns
Urea	Controllo	23.55		15.89		22.08		25.53	
	Trattato	22.01	ns	18.13	ns	22.55	ns	26.48	ns
Ca	Controllo	9.69		9.25		9.19		9.36	
	Trattato	9.39	ns	9.26	ns	9.39	ns	9.30	ns
P	Controllo	5.60		5.62		5.81		5.56	
	Trattato	5.35	ns	5.68	ns	5.93	ns	5.85	ns
Mg	Controllo	2.12		1.97		2.08		2.27	
	Trattato	2.10	ns	2.03	ns	2.00	ns	2.28	ns
Proteine Tot.	Controllo	8.49		7.36		7.57		8.26	
	Trattato	8.71	ns	7.64	ns	8.04	ns	8.48	ns
Albumine	Controllo	3.66		3.25		3.02		3.20	
	Trattato	3.55	ns	3.40	ns	3.19	ns	3.32	ns
Globuline	Controllo	4.82		4.11		4.57		5.06	
	Trattato	5.16	ns	4.25	ns	4.85	ns	5.16	ns
Bilirubina	Controllo	0.08		0.08		0.11		0.09	
	Trattato	0.08	ns	0.01	0.030	0.17	ns	0.10	ns
Glucosio	Controllo	60.40		56.10		55.30		57.20	
	Trattato	59.61	ns	56.46	ns	54.54	ns	56.77	ns

Tabella 20: Effetto della somministrazione di silimarina sui parametri metabolici del plasma (interazione per gruppi).

Come noto la bilirubina totale è un parametro plasmatico che identifica un danno al parenchima epatico, durante il quale parte della bilirubina coniugata all'acido glicuronico passa dai capillari biliari ai capillari sanguigni.

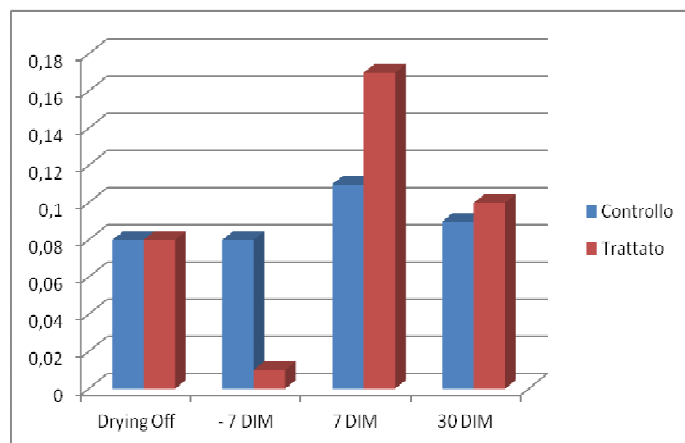


Figura 24: Concentrazione plasmatica di bilirubina totale a seguito di somministrazione orale di silimarina in bovine durante il periodo di transizione. La differenza al campionamento a - 7 giorni dal parto previsto è risultata statisticamente significativa ($P < 0.030$).

Dal calcolo degli indici riproduttivi sembra che la somministrazione di silimarina alle bovine durante il periodo peri-parto non abbia influito significativamente sulla fertilità (tabella 21).

Parametri Riproduttivi	Gruppi				p-value
	Controllo	d.s.	Trattate	d.s.	
Intervallo parto/1° FA	78,75	51,67	82,29	38,68	0,319
Intervallo parto/conc.	124,75	47,07	130,85	36,53	0,132
N° FA/conc.	2,17	0,83	2,31	1,38	0,108

Tabella 21: effetto della somministrazione di estratti di cardo mariano sui parametri riproduttivi delle bovine.

Conclusioni

In questo studio si è cercato di valutare l'effetto dell'utilizzo dell'estratto di cardo mariano sulle performance e gli aspetti metabolici durante il periodo di transizione della bovina da latte.

I risultati ottenuti hanno mostrato un miglioramento del linear score (LS) delle bovine durante i primi 60 giorni di lattazione, senza evidenziare effetti significativi sulla condizione corporea, sulla produttività e sulle caratteristiche qualitative del latte.

Dalle analisi dei parametri ematici è stato osservato un miglioramento temporaneo della concentrazione di bilirubina totale dopo circa due settimane dall'inizio del trattamento. Non sono state evidenziate differenze significative che mostrino un miglioramento degli altri parametri metabolici o effetti negativi a seguito della somministrazione di silimarina.

PROVA 2

Utilizzo di molecole/nutrienti con attività migliorativa sul metabolismo di bovine da latte in fase di transizione: Estratto di "Salix alba"

Introduzione

Il salice bianco (*Salix alba*) è una pianta spontanea delle zone umide di tutta l'Europa, appartenente alla famiglia delle *Salicaceae*.

Della pianta si utilizza soprattutto la corteccia e le sue proprietà terapeutiche sono conosciute ormai da secoli.

I principi attivi compresi nell'estratto di corteccia di salice sono diversi:

- a) Glicosidi fenolici (tra cui la salicina)
- b) Flavonoidi (isoquercetina)
- c) Tannini

L'utilizzo della salicina nella medicina umana ed animale si è diffuso grazie alle note proprietà anti-infiammatorie, antipiretiche ed antalgiche, derivanti dall'inibizione delle ciclo-ossigenasi.

L'utilizzo degli estratti di salice nella bovine nel periodo peri-parto è legato alla possibile azione di alcune sostanze anti-infiammatorie sull'involutione dell'utero e sull'azione protettiva contro le endotossine prodotte da alcuni batteri che hanno inquinato il lume uterino al momento del parto (Koningsson et al., 2001).

L'utilizzo dell'acido acetilsalicilico (ASA) è molto diffuso nei bovini in caso di stati febbrili negli USA (Gingerich et al., 1975).

In uno studio (Sanchez-Rodriguez et al., 2011) è stato osservato come l'assunzione orale di acido acetilsalicilico da parte di bovine da carne, può migliorare le performance riproduttive aumentando il flusso ematico agli organi riproduttori.

L'azione farmacologica dei principi attivi contenuti negli estratti di salice nei ruminanti, è stata studiata in particolar modo in Nuova Zelanda.

Moore et al. (2003) hanno valutato l'effetto della somministrazione orale di foglie fresche di salice in bovine da carne allevate al pascolo durante i mesi estivi, suddividendo 45 animali in tre gruppi (controllo, 4 kg/gg di salice, 8 kg/gg di salice fresco). Le bovine a cui sono stati somministrati 8 kg di foglie di salice hanno manifestato un minor calo di peso vivo rispetto alle bovine

comprese nell'altro gruppo sperimentale e nel gruppo controllo (rispettivamente -0.36, -0.45 e -0.64 kg/gg; $P < 0.0001$).

In un altro studio (McWilliam et al., 2005) è stata valutata l'efficacia della supplemetazione con foglie di salice rispetto alle foglie di pioppo (*Populus spp.*) nelle pecore allevate al pascolo in Nuova Zelanda. In questo studio sono state utilizzate 285 pecore di razza Romney suddivise in tre gruppi (controllo, somministrazione di salice fresco e somministrazione di pioppo fresco).

L'assunzione di salice anche in questo caso ha ridotto la perdita di peso estiva e migliorato l'efficienza riproduttiva.

Recentemente Pitta et al. (2009) hanno evidenziato come la somministrazione di foglie di salice a pecore allevate al pascolo, riduca significativamente il catabolismo delle proteine muscolari.

Materiali e metodi

Per questo studio sono state selezionate 16 bovine da latte di razza frisona italiana in un allevamento di 60 bovine in lattazione a stabulazione fissa per la produzione di latte destinato alla trasformazione in formaggio Parmigiano Reggiano.

Le bovine sono state suddivise in due gruppi omogenei (trattato con salicina e controllo).

Le bovine sono state selezionate all'interno della mandria a seconda del numero di parti (sono state tralasciate le primipare e le bovine oltre i 5 parti), stima della capacità produttiva annuale (dati relativi alla produzione dell'anno precedente, Associazione Provinciale Allevatori), stagionalità di parto, presenza di patologie nella lattazione precedente.

Il gruppo di bovine trattate ha ricevuto una supplemetazione per via orale di 4 grammi/capo/giorno di estratto di salice in polvere, per i primi 30 giorni di lattazione.

Le bovine sono state alimentate in fase di asciutta con fieno di graminacee (ad libitum) e 3 kg di mangime complementare da asciutta in pellet. In lattazione le bovine sono state alimentate con 5,5 kg di fieno di graminacee, 7 kg di fieno di erba medica e 10 kg di mangime complementare da lattazione, il tutto attraverso tecnica unifeed.

Parametro	Fieno Graminacee		Fieno Medica	
	(tq)	(%)	(tq)	(%)
Umidità	11.89	/	8.72	/
Ceneri	8.96	10.16	8.12	8.90
Proteine	10.33	11.72	11.4	12.49
Grassi	1.46	1.66	1.40	1.54
NSC	13.61	15.45	19.86	21.75
NDF	53.76	61.01	50.51	55.33
ADF	36.12	40.99	32.65	35.77
ADL	5.24	5.95	6.94	7.60
NDFd 24h	/	28.84	/	24.68

Parametro	Mangime Asciutta	
	(tq)	(%)
SS	/	88,95
Proteine Grezze	15,20	17,09
Grassi	3,88	4,36
Amido	11,24	12,64
Ceneri	9,19	10,33
Fibra Grezza	10,50	11,8
NDF	37,46	42,11
ADF	17,42	19,58

Tabella 22 e 23: Composizione dei fieni e del mangime da asciutta.

Parametro	Razione Unifeed da Lattazione	
	(tq)	(%)
SS	/	85,27
Proteine	12,88	15,11
Grassi	2,14	2,51
Amido	16,51	19,36
NSC	32,39	37,99
NDF	35,30	41,4
ADF	22,00	25,8
ADL	3,82	4,48
NDFd 24h	/	48,81

Tabella 24: Composizione della razione per bovine in lattazione.

Durante la prova sono state raccolte tutte le informazioni relative alle performance produttive delle bovine nei primi 120 giorni di lattazione e dell'efficienza riproduttiva.

Tramite i controlli funzionali dell'Associazione Provinciale Allevatori (APA) è stato possibile ottenere produzione giornaliera, percentuale di grasso, percentuale di proteine, conta delle cellule somatiche (SCC) e linear score (LS). Gli indici riproduttivi analizzati comprendono intervallo parto/prima fecondazione, intervallo parto/concepimento e numero di fecondazioni per concepimento.

Inoltre tutte le bovine sono state esaminate con cadenza bisettimanale per valutare la variazione della condizione corporea (BCS) durante i primi mesi di

lattazione. Sono stati eseguiti prelievi di sangue per valutare il profilo metabolico epatico, renale e minerale delle bovine. I prelievi sono stati effettuati alla messa in asciutta, a 7 giorni prima del parto, 5 giorni dopo il parto e a circa 30 giorni di lattazione. Il campione ematico è stato effettuato tramite l'utilizzo di provette contenenti litio-eparina, attraverso la vena coccigea. Il plasma è stato ottenuto mediante centrifugazione a 3500 rpm per 10 minuti, in seguito è stato refrigerato a -20°C. I parametri plasmatici valutati sono stati: GOT (glutammato ossalacetato transaminasi), GGT (gamma-glutamyl trans peptidasi), urea, calcio, fosforo, magnesio, proteine totali, albumine, globuline, bilirubina totale e glucosio.

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati mediante l'utilizzo del software SPSS 18.0 attraverso la modalità "misure ripetute" del modello GLM".

Il modello statistico utilizzato per questa analisi, comprende il trattamento con estratto di salice (gruppo), le tempistiche di raccolta dei dati (tempo) e l'interazione durata dell'asciutta – campionamento (tempo x gruppo).

Sono state riportate le medie e l'errore standard delle medie. La significatività statistica è stata fissata a $P < 0.05$.

Risultati e discussione

Le performance produttive delle bovine sono state valutate durante i primi 120 giorni di lattazione (tabella 25 e 26). Dai dati raccolti non sono state osservate differenze statisticamente significative fra i due gruppi nella produzione giornaliera di latte ($P > 0.05$).

Inoltre non sono state trovate differenze significative nella composizione percentuale di grasso e di proteine nel latte prodotto dai due gruppi di animali ($P > 0.05$).

PARAMETRI PRODUTTIVI	Gruppo Controllo					Gruppo Trattato					p-value	
	30 DIM	60 DIM	90 DIM	120 DIM	SE	30 DIM	60 DIM	90 DIM	120 DIM	SE	Tempo	Gruppo x Tempo
Produzione (kg/gg)	32,80	35,83	32,77	32,08	2,48	34,09	36,94	35,07	31,51	2,62	0,118	0,012
Grasso (%)	2,98	2,76	3,13	3,08	0,21	3,33	3,04	3,16	3,24	0,18	0,360	0,031
Proteine (%)	3,33	3,25	3,45	3,43	0,09	3,32	3,26	3,39	3,56	0,08	0,056	0,043
SCC (x1000)	453,67	600,17	763,33	577,83	184,46	174,57	92,71	110,86	172,29	115,32	0,024	0,054
LS	4,56	5,01	4,54	4,73	0,70	2,65	2,13	2,35	3,20	0,62	0,025	0,041
BCS (1-5)	3,00	3,00	2,92	2,79	0,06	2,93	3,04	2,93	2,79	0,05	0,407	0,036

Tabella 25: Effetto della somministrazione orale di salicina sulla produzione, le caratteristiche del latte e la condizione corporea delle bovine (interazione tempo e gruppo x tempo).

La composizione del latte ha mostrato alcune differenze nell'andamento della conta delle cellule somatiche (SCC) fra i due gruppi di bovine. In particolare queste differenze sono state evidenziate campionamenti effettuati a 60 e 90 giorni in lattazione, rispettivamente 600.17 vs 92.71 ($P < 0.016$) e 763.33 vs 110.86 ($P < 0.048$).

PARAMETRI PRODUTTIVI	GRUPPO	Tempo							
		30 DIM	p-value	60 DIM	p-value	90 DIM	p-value	120 DIM	p-value
Latte (kg/gg)	Controllo	32,80		35,83		32,77		32,08	
	Trattato	34,09	ns	36,94	ns	35,07	ns	31,51	ns
Grasso (%)	Controllo	2,98		2,76		3,13		3,08	
	Trattato	3,33	ns	3,04	ns	3,16	ns	3,24	ns
Proteine (%)	Controllo	3,33		3,25		3,45		3,43	
	Trattato	3,32	ns	3,26	ns	3,39	ns	3,56	ns
SCC	Controllo	453,67		600,17		763,33		577,83	
	Trattato	174,57	ns	92,71	0,016	110,86	0,048	172,29	ns
LS	Controllo	4,56		5,01		4,54		4,73	
	Trattato	2,65	ns	2,13	0,015	2,35	ns	3,20	0,049
BCS	Controllo	3,00		3,00		2,92		2,79	
	Trattato	2,93	ns	3,04	ns	2,93	ns	2,79	ns

Tabella 26: Effetto della somministrazione di estratto di salice sulla produttività, la qualità del latte e della condizione corporea (interazione gruppo).

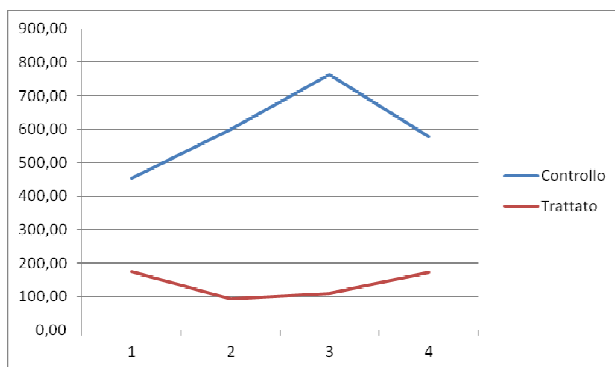


Figura 25: Effetto grafico dell'andamento della conta delle cellule somatiche da 30 giorni post-parto, fino a 120 gironi di lattazione.

In tutti i campionamenti sono state evidenziate alcune differenze nell'andamento dei valori del linear score (LS) dei due gruppi, in particolare nei campionamenti effettuati a 60 e 120 DIM, rispettivamente 5.01 vs 2.13 ($P < 0.015$) e 4.73 vs 3.20 ($P < 0.049$).

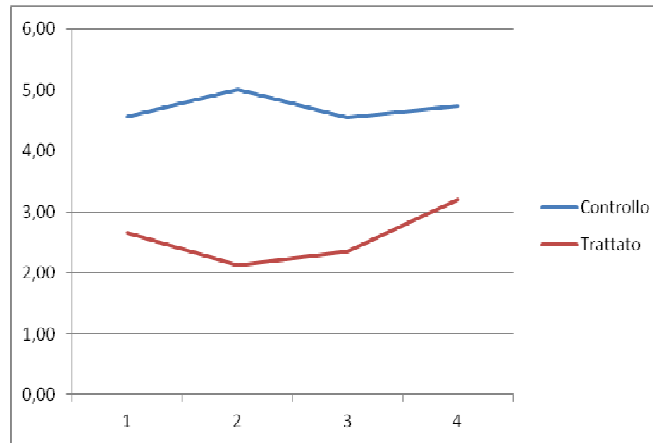


Figura 26: Effetto grafico dell'andamento del linear score nelle bovine trattate è significativamente migliore delle altre bovine controllo.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa nell'andamento della condizione corporea delle bovine ($P > 0.05$).

PARAMETRI METABOLICI	Gruppo Controllo					Gruppo Trattato					p-value	
	Driing Off	-7 DIM	5 DIM	30 DIM	SE	Driing Off	-7 DIM	5 DIM	30 DIM	SE	Tempo	Gruppo x Tempo
GOT	35,17	28,00	44,17	32,33	3,80	34,29	34,86	48,57	50,57	5,54	0,205	0,085
GGT	12,50	9,82	11,87	11,17	0,90	11,49	9,29	10,00	10,11	1,10	0,241	0,012
Urea	14,95	14,62	18,37	16,14	2,03	17,70	14,31	14,69	14,64	1,61	0,058	0,112
Ca	9,49	9,57	7,98	8,78	0,48	9,57	9,32	8,80	8,71	0,31	0,207	0,045
P	5,38	5,09	3,42	4,75	0,46	5,26	5,55	5,22	5,17	0,23	0,249	0,199
Mg	1,98	2,05	2,43	2,04	0,12	2,13	1,98	2,10	2,06	0,13	0,227	0,191
Proteine Tot.	7,74	7,28	7,25	8,04	0,37	8,58	7,58	7,51	8,16	0,29	0,326	0,065
Albumine	3,42	3,42	3,36	3,17	0,28	3,71	3,19	2,96	3,23	0,15	0,263	0,198
Globuline	4,07	4,07	3,90	4,88	0,35	4,87	4,39	4,54	4,93	0,40	0,237	0,080
Bilirubina	0,12	0,12	0,39	0,15	0,07	0,10	0,21	0,19	0,17	0,05	0,151	0,103
Glucosio	61,50	61,50	69,50	59,83	3,95	62,85	58,71	62,57	59,57	1,74	0,079	0,032

Tabella 27: Effetto della somministrazione di estratto di salice sulla produttività, la qualità del latte e della condizione corporea (interazione gruppo).

PARAMETRI METABOLICI	GRUPPO	Tempo							
		Driing Off	p-value	-7 DIM	p-value	5 DIM	p-value	30 DIM	p-value
GOT	Controllo	35,17		28,00		44,17		32,33	0,027
	Trattato	34,29	ns	34,86	ns	48,57	ns	50,57	
GGT	Controllo	12,50		9,82		11,87		11,17	ns
	Trattato	11,49	ns	9,29	ns	10,00	ns	10,11	
Urea	Controllo	14,95		14,62		18,37		16,14	ns
	Trattato	17,70	ns	14,31	ns	14,69	ns	14,64	
Ca	Controllo	9,49		9,57		7,98		8,78	ns
	Trattato	9,57	ns	9,32	ns	8,80	ns	8,71	
P	Controllo	5,38		5,09		3,42		4,75	ns
	Trattato	5,26	ns	5,55	ns	5,22	ns	5,17	
Mg	Controllo	1,98		2,05		2,43		2,04	ns
	Trattato	2,13	ns	1,98	ns	2,10	ns	2,06	
Proteine Tot.	Controllo	7,74		7,28		7,25		8,04	ns
	Trattato	8,58	ns	7,58	ns	7,51	ns	8,16	
Albumine	Controllo	3,42		3,42		3,36		3,17	ns
	Trattato	3,71	ns	3,19	ns	2,96	ns	3,23	
Globuline	Controllo	4,07		4,07		3,90		4,88	ns
	Trattato	4,87	ns	4,39	ns	4,54	ns	4,93	
Bilirubina	Controllo	0,12		0,12		0,39		0,15	ns
	Trattato	0,10	ns	0,21	ns	0,19	ns	0,17	
Glucosio	Controllo	61,50		61,50		69,50		59,83	ns
	Trattato	62,85	ns	58,71	ns	62,57	ns	59,57	

Tabella 28: Effetto della somministrazione di estratto di salice sulla produttività, la qualità del latte e della condizione corporea (interazione gruppo).

Dalle analisi del plasma non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i due gruppi. In particolare non vi era nessuna differenza in GOT, GGT, urea, calcio, fosforo, magnesio, proteine totale, albumine, lobuline e glucosio. L'unica differenza si può osservare nella concentrazione di GOT al campione effettuato a 30 giorni in lattazione ($P < 0.027$).

Sembra che non esista effetto significativo sul metabolismo generale della mandria.

Dal calcolo degli indici riproduttivi (tabella 29) sembra che la somministrazione di silimarina alle bovine durante il periodo peri-parto non abbia influito significativamente sulla fertilità, anche se i risultati appaiono tendenzialmente più favorevoli per gli animali trattati.

PARAMETRI RIPRODUTTIVI	Gruppi				
	Controllo	d.s.	Trattate	d.s.	p-value
Intervallo parto/1° FA	64,63	8,63	49,00	12,83	0,350
Intervallo parto/conc.	104,13	41,92	84,00	26,08	0,468
N° FA/conc.	2,13	1,25	2,25	1,26	0,880

Tabella 29: Effetto della somministrazione di salicina sull'efficienza riproduttiva.

Conclusioni

Durante questa ricerca si è cercato di valutare l'effetto dell'estratto di salice sulle performance produttive e riproduttive delle bovine.

Sono stati evidenziate lievi differenze nella composizione del latte prodotto da i due gruppi di bovine.

Non sono state evidenziate differenze significative che mostrino un miglioramento degli altri parametri metabolici o effetti negativi a seguito della somministrazione di salicina.

PROVA 3

Monitoraggio della situazione produttiva, dell'efficienza riproduttiva e della gestione del periodo di asciutta in un allevamento di bovine di razza Bruna Italiana sito nel comprensorio del formaggio Parmigiano-Reggiano

Introduzione

L'efficienza riproduttiva della bovina da latte nel periodo post-parto è strettamente legata alla capacità di assunzione di alimento (DMI) e all'andamento del bilancio energetico (EB).

Le modalità per incrementare il bilancio energetico, dal punto di vista nutrizionale, sono molteplici ma sfortunatamente nessuna è in grado di risolvere pienamente il problema ed è ormai noto come queste difficoltà nella riproduzione siano legate alla gestione della fase di asciutta e di transizione.

Tradizionalmente il periodo di asciutta ha un decorso ottimale di circa 55-65 giorni e la durata del periodo di asciutta normalmente viene stabilita a seconda di alcuni parametri di seguito elencati:

- 1) Produzione di latte a fine lattazione
- 2) Presenza di patologie e rialzo delle cellule somatiche nel latte (in previsione anche di una possibile terapia da effettuarsi all'inizio del periodo di asciutta)
- 3) Condizione corporea dell'animale (BCS)
- 4) Stato di avanzamento della gravidanza (in particolare per animali con un intervallo parto-concepimento piuttosto lungo)

La durata del periodo di asciutta influenza in modo particolare l'assunzione di sostanza secca, la perdita di condizione corporea (BCS) e peso corporeo (BW), quindi la variazione di bilancio energetico della bovina in transizione (tabella 30).

In alcuni studi (Gumen et al., 2003; Rastani et al., 2005) la riduzione del bilancio energetico durante le prime settimane post-parto è risultato inferiore nelle bovine che hanno avuto una durata dell'asciutta media (28 giorni) o nulla (0 giorni). Secondo i ricercatori questi risultati sono da attribuire alla minore variazione nell'ingestione di sostanza secca dopo il parto, a causa della mancanza di alternanza di vari tipi di razione in asciutta.

Bibliografia	Anno	N°	Durata Asciutta (gg)	DMI (kg/gg)		BCS (1-5)		BCS loss (1-5)	BW loss (kg) post-parto	EB (Mcal/gg)	
				Pre parto	Post parto	Pre parto	Post parto			pre parto	post parto
Ramond et al.	1997	45	60,00 0,00						28,00* 24,00*		
Gualy et al.	2003	84	60,00 30,00 30,00***	16,80 16,60 16,30	24,70 25,70 27,00	3,34* 3,44* 3,43*	2,96* 3,16* 3,19*		69,10 49,50 61,40		
Gumen et al.	2005	58	56,00 28,00 0,00					1,31* 0,76* 0,53*	65,70* 39,70* 15,00*		-9,60 -6,30 1,70
Rastani et al.	2005	75	56,00 28,00 0,00	2,90* 1,40*	19,10 19,60 20,70			1,37* 0,81* 0,56*	16,00* 45,00* 68,00*	5,00* 6,50* 4,80*	-7,00 -4,10 0,70
Pezeshki et al.	2007	122	56,00 42,00 35,00			2,98 3,11 3,22	2,69 2,84 2,96	0,44 0,29 0,29			
Watters et al.	2008	781	55,00 34,00			3,75* 3,65*	3,01* 3,07*				
Soleimani et al.	2010	29	60,00 35,00			2,86 2,90	2,49 2,53		82,66 99,88		

Tabella 30: Effetto della differente durata del periodo di asciutta sull'assunzione di sostanza secca (DMI), sulla condizione corporea (BCS), sul calo di peso corporeo ad inizio lattazione (BW) e sul bilancio energetico della bovina in fase di transizione. * significatività statistica ($P < 0,05$); *** durata dell'asciutta di 30 giorni e somministrazione parenterale di estrogeni.

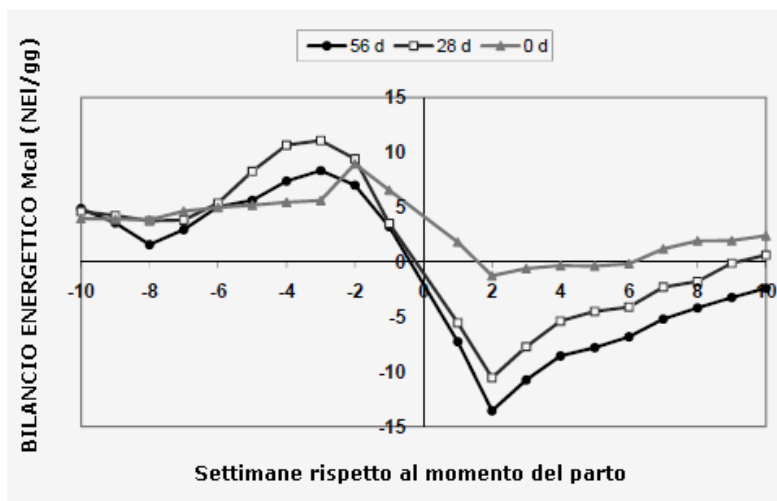


Figura 27: Effetto della durata del periodo di asciutta sull'andamento del bilancio energetico della bovina. In questo studio gli animali con asciutta di 28 giorni o senza periodo di asciutta hanno ricevuto una dieta ad alta concentrazione energetica, mentre alle bovine con durata tradizionale dell'asciutta è stata somministrata una dieta a bassa energia per le prime 4 settimane di asciutta ed è stata alzata la concentrazione energetica della razione durante il secondo mese di asciutta (Rastani et al., 2005).

Il bilancio energetico negativo (NEB) è la base patologica della lipomobilizzazione dal tessuto adiposo di deposito e dell'aumento di trigliceridi nelle cellule del fegato. Il danno epatico sub-clinico si manifesta come un aumento della concentrazione plasmatica di alcuni metaboliti quali acidi grassi non esterificati (NEFA) e beta-idrossibutirrato (Bell, 1995; McNamara, 1997).

Il bilancio energetico negativo delle bovine con durata del periodo di asciutta medio-basso (circa 30 giorni) sembra essere meno grave rispetto alle bovine con durata dell'asciutta tradizionale.

In alcuni studi (Rastani et al., 2005; Klusmeyer et al., 2009) questi parametri plasmatici sembrano seguire l'andamento del bilancio energetico, quindi risultano concentrazioni migliori nelle bovine che hanno passato un periodo di asciutta ridotto (tabella 31).

Bibliografia	Anno	N°	Durata Asciutta (gg)	Metaboliti pre-parto			Metaboliti post-parto		
				BHBA (mg/dl)	Gluc. (mg/dl)	NEFA (uEq/L)	BHBA (mg/dl)	Gluc. (mg/dl)	NEFA (uEq/L)
Rastani et al.	2005	75	56,00	6,20	61,00	131,00	8,30	53,00*	403,00*
			28,00	6,40	60,00	132,00	7,80	55,00*	394,00*
			0,00	6,40	61,00	125,00	6,60	59,00*	235,00*
Madsen et al.	2008	28	49,00	1,45		171,00	2,00		413,00
			0,00	1,63		171,00	1,43		300,00
Watters et al.	2008	781	55,00			155,00			428,80
			34,00			185,00			337,40
Klusmeyer et al.	2009	341	60,00			550,00	7,64		
			32,00			373,00*	6,43*		
			0,00			367,00*	5,37*		
			0,00**			357,00*	6,13*		
Soleimani et al.	2010	29	60,00				7,26	45,91	793,00
			35,00				7,40	47,34	743,00

Tabella 31: Effetto della durata dell'asciutta sulla concentrazione plasmatica di metaboliti (beta-idrossibutirrato BHBA; glucosio GLUC; acidi grassi non esterificati NEFA). * significatività statistica (P <0.05); ** somministrazione parenterale di bST.

Alcuni ricercatori hanno svolto studi osservazionali allo scopo di determinare l'effetto della durata dell'asciutta sulla produttività della bovina da latte e identificare la durata ottimale per i moderni allevamenti (tabella 32).

Funk et al. (1987) hanno raccolto dati da 2300 aziende per un totale di circa 84300 bovine. Le bovine che presentavano produzioni maggiori nella lattazione successiva avevano sostenuto un'asciutta di 60-69 giorni, mentre gli animali con asciutta inferiore ai 40 giorni risultavano molto penalizzati nella produzione di latte.

Risultati simili sono stati osservati in studi precedenti (Diaz and Allaire, 1982; Keown and Everett, 1984), dove la durata ottimale dell'asciutta è stata fissata a circa 51-60 giorni.

In seguito Makuza and McDaniel (1996) hanno analizzato le produzioni di circa 13300 bovini in Zimbabwe e circa 11400 in North Carolina (USA), ottenendo risultati molto simili.

Kuhn et al. (2005) hanno analizzato i dati di circa 340000 bovine partorienti da circa 3600 allevamenti negli Stati Uniti. Le bovine con periodo di asciutta di 60-65 giorni hanno mostrato le performance migliori, mentre l'asciutta inferiore a 30 giorni ha causato uno scarso rendimento produttivo nella lattazione successiva. Dati simili sono stati raccolti per le bovine con asciutta inferiore ai 20 giorni.

Questi dati confermano che l'obiettivo principale della gestione corretta del periodo di asciutta è la proliferazione e la differenziazione delle cellule epiteliali della mammella, per preparare il tessuto mammario alla lattazione successiva (Collier et al., 2011).

A seguito della cessazione della mungitura e durante i primi 10 giorni di asciutta, le cellule del tessuto mammario vanno incontro a fenomeni di apoptosi e proliferazione (Capuco et al., 2006). Il picco di questi fenomeni si osserva a circa 72 ore dalla fine della mungitura (Annen and Collier, 2005; Annen et al., 2008), mentre la fase di proliferazione cellulare continua anche durante la prima settimana di lattazione (Annen et al., 2007).

Questi meccanismi sono regolati dal sistema ormonale sistemico e mammario, in particolare intervengono gli ormoni sessuali. A seguito dell'asciugatura si osserva una forte riduzione della circolazione di prolattina e somatotropina (Lamote et al., 2004), due sostanze che presentano un forte effetto stimolante la secrezione di latte dalle cellule mammarie (Accorsi et al., 2001).

Bibliografia	Anno	N°	Durata Asciutta (gg)	Prod. Latte (kg/gg)	Prod. Latte Totale	Grasso (%)	Prod. Grasso (kg/gg)	Prot. (%)	Prod. Prot. (kg/gg)	Prod. Lattosio (kg/gg)	SCC LS
Sorensen and Enevoldsen	1991		70.00	25,10*			1,07*		0,83*		
			49.00	24,50*		1,06*		0,83*			
			28.00	22,00*		0,93*		0,77*			
Ramond et al.	1997	45	60.00	25,10*		3,94*	0,99*	3,10*	0,78*		
			0.00	19,50*		4,34*	0,82*	3,47*	0,66*		
Bachman	2002	66	60.00	22,00*							
			60.00***	21,90*							
			30.00	26,10*							
			30.00***	24,50*							
Gualy et al.	2003	84	60.00	39,40	9836,00	3,90*		2,78			
			30.00	37,40	9580,00	3,84*		2,89*			
			30.00***	37,50	9960,00	4,09		2,93*			
Annen et al.	2004	95	60.00	47,70		3,56		2,78			1,18
			30.00	46,60		3,28		2,90			2,01
			0.00	43,40		3,54		2,94			2,16
			0.00**	46,50		3,63		2,91			3,44
Rastani et al.	2005	75	56,00	42,44*		3,86	1,57*	2,83*	1,17	2,07*	3,37
			28,00	37,90*		4,08	1,53*	2,97*	1,12	1,86*	2,56
			0,00	33,90*		3,92	1,32*	3,14*	1,05	1,67*	2,97
Pezeshki et al.	2007	122	56,00	35,42		3,79	1,43	3,19	1,19*		
			42,00	34,00		3,53	1,18	3,04	1,00*		
			35,00	35,18		3,96	1,45	3,04	1,10*		
Madsen et al.	2008	28	49,00	18,90*		3,88		3,02*		4,82	
			0,00	15,60*		4,01		3,42*		4,90	
Pezeshki et al.	2008	61	49,00	34,60*	10831,00	3,37	1,16	3,10	1,07		
			28,00	32,70*	10314,00	3,30	1,05	3,17	1,04		
Watters et al.	2008	781	55,00	43,60*		3,45	1,46	2,68*	1,15		3,27
			34,00	41,50*		3,52	1,42	2,83*	1,14		3,12
Klusmeyer et al.	2009	341	60,00		11974,00	3,59		3,00			2,68
			32,00		12112,00	3,57		3,02			2,02*
			0,00		11310,00	3,70		3,15*			2,90
			0,00**		11230,00	3,59		3,11*			3,37*
Watters et al.	2009	781	55,00	43,60*							
			34,00	41,50*							
Soleimani et al.	2010	29	60,00	36,48		3,89	1,39	3,05*	1,11	1,66	
			35,00	34,90		3,84	1,17	3,16*	0,94	1,40	

Tabella 32: Effetto della durata del periodo di asciutta sulla produttività e le caratteristiche qualitative del latte. SCC LS (Somatic Cell Count-Linear Score); * significatività statistica ($P < 0,05$); ** somministrazione parenterale di bST; *** somministrazione parenterale di estrogeni.

Gli indici riproduttivi sono anch'essi influenzati dal bilancio energetico negativo post-parto (tabella 33). In particolare viene influenzata la ripresa dell'attività ciclica delle ovaie e la capacità dell'utero di involversi e poter accogliere una nuova gravidanza.

In due recenti studi (Gumen et al., 2005; Pezeshki et al., 2007) è stato messo in evidenza come la minor durata dell'asciutta possa portare a migliori risultati negli indici riproduttivi.

Altri ricercatori (Anne net al., 2004; Pezeshki et al., 2008; Watters et al., 2009; Mohammad et al., 2009) al contrario, non hanno osservato differenze significative negli indici riproduttivi delle bovine dei gruppi sperimentali.

Bibliografia	Anno	N°	Durata Asciutta (gg)	Prod. Latte (kg/gg)	Indici Riproduttivi						
					Parto/ 1° OV (gg)	Parto/ 1° FA (gg)	Parto/ 2° FA	n° FA/ Conc.	CR 1° FA	CR 2° FA	Days Open
Annen et al.	2004	95	60,00	47,70	47,00		3,40			74,00	
			30,00	46,60	39,00		2,20		71,00		
			0,00	43,40	42,00		3,10		83,00		
			0,00**	46,50	53,00		1,90		76,00		
Gumen et al.	2005	58	56,00	35,42		75,00	3,00*	20,00*		145,00*	
			28,00	34,00		68,00	2,44*	26,00*		121,00*	
			0,00	35,18		69,40	1,75*	55,00*		94,00*	
Pezeshki et al.	2007	122	56,00	34,60*		55,60	2,39*	39,00*		85,20*	
			42,00	32,70*		46,10	3,00*	25,00*		109,50*	
			35,00			56,90	2,00*	53,00*		91,90*	
Pezeshki et al.	2008	61	49,00				2,07	37,00		91,40	
			28,00				1,82	41,10		81,20	
Watters et al.	2009	781	55,00	43,60*	43,00	69,00	105,00		35,10	24,60	109,00
			34,00	41,50*	34,00	66,00	102,00		31,90	32,60	121,00

Tabella 33: Effetto della durata del periodo di asciutta sulla funzionalità riproduttiva della bovina. Parto/prima ovulazione (parto/1° OV), parto/prima e seconda FA (parto/1° - 2° FA), numero di FA per concepimento (FA/conc), tasso di concepimento alla prima e alla seconda FA (CR 1° - 2° FA), days open. * significatività statistica (P <0.05); ** somministrazione parenterale di bST.

Obiettivi

Obiettivo di questo studio è investigare sull'effetto della durata del periodo di asciutta sulla produzione e la composizione del latte e sull'efficienza riproduttiva, facendo riferimento alle variazioni della condizione corporea e del bilancio energetico durante il periodo di transizione.

Materiali e metodi

Per questo studio osservazionale sono presi in considerazione i dati produttivi e riproduttivi tramite l'Associazione Provinciale Allevatori.

Sono stati raccolti i dati di 112 bovine da latte di razza Bruna Italiana che hanno partorito tra il 01 gennaio 2010 e 01 giugno 2011, allevate in un allevamento a stabulazione libera sito nel comprensorio di produzione del formaggio Parmigiano-Reggiano, zona collinare.

Per ogni bovina sono stati raccolti vari parametri:

a) DURATA DEL PERIODO DI ASCIUTTA

Il razionamento durante il periodo di asciutta è stato costante e le bovine al momento della messa in asciutta sono state sistematicamente trattate con una singola somministrazione intra-mammaria di pomata a base di Cefquinone solfato.

b) VARIAZIONE DEL BCS

La variazione della condizione corporea della bovina (BCS) è stata valutata singolarmente durante quattro controlli (al momento della messa in asciutta, al momento del parto, a 30 giorni di lattazione e a 100 giorni di lattazione).

c) DATI PRODUTTIVI DELLA LATTAZIONE PRECEDENTE

Comprendono produzione totale di latte (kg), la durata della lattazione (gg), la percentuale media di grasso e proteine del latte (%), la conta delle cellule somatiche.

d) DATI PRODUTTIVI DELLA LATTAZIONE ATTUALE

Comprendono produzione giornaliera di latte (kg), la percentuale di grasso e proteine del latte (%), la produzione giornaliera di latte aggiustata al 4% di grasso (kg), la produzione giornaliera di grasso e proteine (kg), la conta delle cellule somatiche e il Linear Score.

Ognuno di questi parametri è stato raccolto dai primi quattro controlli funzionali effettuato dall'Associazione Provinciale Allevatori con cadenza mensile.

e) DATI RIPRODUTTIVI

Intervallo parto/prima fecondazione, intervallo parto/concepimento e numero di fecondazioni per concepimento.

Il bilancio energetico (EB) delle bovine post-parto è stato stimato attraverso un'equazione che prende in considerazione i dati quanti/qualitativi del latte prodotto (Friggens et al., 2007; Lovendhal et al., 2007).

Le bovine sono state divise in 5 gruppi a seconda della durata dell'asciutta: gruppo A (da 0 a 20 giorni), gruppo B (da 20 a 30 giorni), gruppo C (da 30 a 45 giorni), gruppo D (da 45 a 65 giorni) e gruppo E (maggiore di 65 giorni).

Le bovine sono state alimentate durante il periodo di asciutta con fieno di graminacea e mangime complementare per bovine da asciutta il pellet. Alle bovine in lattazione durante i primi 100 giorni, è stata somministrata razione ad unifeed a base di fieno di graminacea (5 kg/gg), fieno di medica (5 kg), mangime complementare di linea (12 kg/gg) e mangime complementare da aggiunta (2 kg/gg).

Parametro	Fieno Graminacea		Fieno Medica	
	(tq)	(%)	(tq)	(%)
Umidità	12,7	/	13,93	/
Ceneri	7,42	8,50	7,40	8,60
Proteine	5,80	6,64	13,55	15,75
Grassi	1,06	1,21	1,06	1,23
NSC	15,07	17,26	16,69	19,39
NDF	57,96	66,39	47,36	55,03
ADF	35,18	40,30	30,98	35,99
ADL	5,68	6,50	7,40	8,60
NDFD 24h	/	30,27	/	27,45
NDFD 48h	/	44,61	/	39,86

Parametro	Mangime Asciutta	
	(tq)	(%)
SS		89,19
Proteine Grezze	14,80	16,59
Grassi	3,13	3,51
Amido	8,38	9,4
Ceneri	9,45	10,59
Fibra Grezza	12,74	14,28
NDF	39,45	44,23
ADF	12,25	13,73

Tabella 34 e 35: Analisi dei foraggi e del mangime complementare da asciutta.

Parametro	Razione Unifeed Lattazione	
	(tq)	(%)
SS		87,30
PG	3,79	16,06
UIP/PG	1,27	33,46
SIP/PG	0,93	24,64
NDF	8,71	36,96
ADF	5,15	21,86
ADL	1,31	5,54
AMIDO	5,39	22,87
NSC	8,91	37,78
Ca	0,18	0,75
P	0,11	0,48
Mg	0,08	0,33
Na	0,90	0,38
K	0,39	1,65

Tabella 36: Analisi della razione per bovine in lattazione.

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati mediante l'utilizzo del software SPSS 18.0 attraverso la modalità "misure ripetute" del modello GLM".

Il modello statistico utilizzato per questa analisi, comprende la durata dell'asciutta (gruppo), le tempistiche di raccolta dei dati (tempo) e l'interazione durata dell'asciutta – campionamento (tempo x gruppo).

Tutti i dati sono stati corretti per i valori degli indici produttivi relativi alla lattazione precedente l'asciutta (covariate), ad eccezione degli indici Linear Score (LS), rapporto grasso/proteine del latte (FPR) e della produzione corretta al 4% di grasso (FCM).

Sono state riportate la media dei valori e l'errore standard (SE) delle medie. La significatività statistica è stata fissata a $P < 0.05$.

Risultati e discussione

La durata media del periodo di asciutta nei cinque gruppi è stata 12.92 giorni, 26.54 giorni, 35.87 giorni, 55.56 giorni e 75.10 rispettivamente ($P < 0.0001$).

La durata della lattazione precedente, la produzione annuale e le caratteristiche qualitative del latte sono risultati simili tra i gruppi (tabella 37).

PARAMETRI PRODUTTIVI	Gruppo 1		Gruppo 2		Gruppo 3		Gruppo 4		Gruppo 5		p-value
		SE		SE		SE		SE		SE	
Durata Asciutta (gg)	12,92	1,70	26,54	0,55	35,87	0,69	55,56	1,26	75,10	2,27	0,000
Durata Lattazione Prec. (gg)	388,67	21,05	416,67	21,34	376,00	13,77	412,64	17,89	390,35	14,88	0,370
Produzione Totale (kg)	7687,33	279,11	7611,96	183,67	7519,74	163,33	7697,52	174,52	7791,50	175,27	0,857
Grasso (%)	3,61	0,08	3,65	0,05	3,68	0,03	3,74	0,03	3,76	0,04	0,121
Proteine (%)	3,37	0,07	3,35	0,04	3,39	0,03	3,35	0,02	3,29	0,03	0,292
SCC (x1000)	113,08	29,83	75,33	15,16	88,90	17,68	102,00	22,87	99,05	30,16	0,844

Tabella 37: Dati relativi alla lattazione precedente.

Le bovine con durata del periodo di asciutta breve hanno mostrato lievi differenze nell'andamento della condizione corporea durante il periodo peri-parto ($P < 0.053$).

Simili risultati sono stati osservati anche in altre ricerche (Gualy et al., 2003; Gumen et al., 2005; Rastani et al., 2005; Watters et al., 2008), in cui le bovine che hanno effettuato un'asciutta breve hanno presentato una minor perdita di condizione corporea (BCS) nelle prime settimane dopo il parto.

Nessuna differenza significativa è stata osservata nel bilancio energetico delle bovine ($P > 0.05$), come si può osservare in tabella 39.

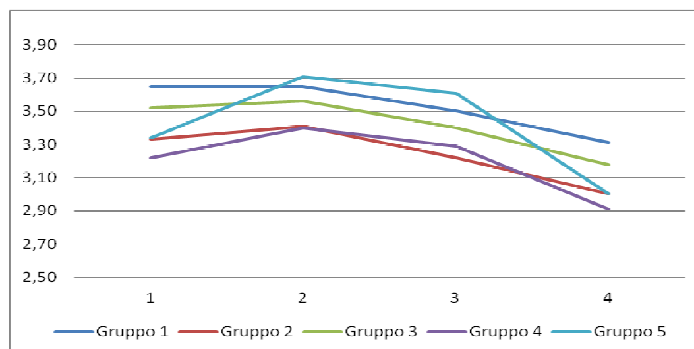


Figura 28: Andamento della condizione corporea delle bovine oggetto di studio ($P < 0.007$).

Non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa nella produzione di latte dei diversi gruppi ($P > 0.05$), anche a seguito di correzione al livello di grasso del 4% (tabella 38).

Non sono state evidenziate differenze significative nella percentuale di grasso nel latte tra i cinque gruppi ($P > 0.05$).

Al contrario, i risultati ottenuti sulla percentuale di proteine del latte rispecchiano quelli evidenziati in altri studi precedenti (Ramond et al., 1997; Gualy et al., 2003; Rastani et al., 2005; Madsen et al., 2008; Watters et al., 2008; Soleimani et al., 2010).

Parametri	Gruppo 1					Gruppo 2					Gruppo 3					Gruppo 4					Gruppo 5					p-value							
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	Tempo	Gruppo	Gruppo x Tempo					
	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE								
Produzione latte (kg/gg)	14,66	25,12	26,03	24,33	18,52	0,44	15,23	26,46	26,20	21,40	17,93	0,51	14,92	27,39	27,03	22,14	19,19	0,57	14,63	27,68	30,22	24,94	18,16	0,59	12,31	29,40	30,38	25,31	20,32	0,48	0,425	0,342	0,007
FCM 4 % (kg/gg)	15,40	25,25	25,82	22,92	18,08	0,42	15,55	26,41	25,18	20,02	17,08	0,51	15,61	26,17	26,66	21,98	18,56	0,58	14,80	26,50	28,39	23,85	18,64	0,58	12,51	27,64	28,58	23,53	19,91	0,50	0,059	0,573	0,802
Grasso (%)	4,52	4,10	3,94	3,63	3,86	0,59	4,27	4,02	3,74	3,54	3,68	0,73	4,34	3,73	4,01	3,94	3,85	0,59	4,09	3,72	3,59	3,75	4,14	0,66	4,05	3,63	3,59	3,51	3,85	0,66	0,181	0,125	0,347
Proteine (%)	4,77	3,63	3,58	3,73	3,89	0,05	4,19	3,54	3,67	3,75	3,96	0,03	4,03	3,56	3,67	3,78	3,91	0,03	4,12	3,37	3,41	3,71	3,89	0,03	4,12	3,35	3,33	3,55	3,76	0,03	0,002	0,007	0,0001
FPR	0,96	1,13	1,11	0,98	1,00	0,01	1,02	1,13	1,02	0,95	0,93	0,02	1,07	1,05	1,09	1,04	0,99	0,02	1,00	1,11	1,07	1,01	1,06	0,01	0,99	1,09	1,08	0,99	1,02	0,01	0,223	0,638	0,033
SCC (x 1000)	484,92	445,67	335,17	263,08	494,08	44,29	329,90	230,48	230,67	294,76	358,86	73,61	375,33	229,75	227,83	335,83	349,50	49,27	598,22	474,78	506,96	417,39	559,35	29,46	787,33	689,89	317,39	320,22	647,17	49,24	0,10	0,011	0,568
LS	4,49	4,23	3,76	3,85	4,85	0,15	4,09	3,27	3,62	3,92	4,01	0,17	4,31	3,74	3,57	3,74	3,99	0,16	5,08	4,24	4,15	4,34	4,89	0,16	5,50	4,27	4,29	4,10	5,15	5,37	0,415	0,577	0,563

Tabella 38: Effetto della gestione e della durata del periodo di asciutta sulla produttività delle bovine da latte. A (< 20) B (20-30) C (30-45) D (45-65) ed E (> 65).

Parametri	Gruppo 1					Gruppo 2					Gruppo 3					Gruppo 4					Gruppo 5					p-value		
	messa in asciutta	parto	post parto	30 DIM	SE	messa in asciutta	parto	post parto	30 DIM	SE	messa in asciutta	parto	post parto	30 DIM	SE	messa in asciutta	parto	post parto	30 DIM	SE	messa in asciutta	parto	post parto	30 DIM	SE	Tempo	Gruppo	Gruppo x Tempo
BCS	3,65	3,65	3,50	3,31	0,14	3,33	3,41	3,22	3,00	0,09	3,52	3,56	3,40	3,18	0,08	3,22	3,40	3,29	2,91	0,10	3,34	3,71	3,61	3,00	0,09	0,793	0,053	0,0001
Bilancio Energetico		-128	3,68	9,45	184		120	7,40	8,28	1,82		1,35	7,89	5,26	1,55		-3,22	9,73	10,70	1,55		-122	9,23	8,33	1,36	0,602	0,577	0,154

Tabella 39: Effetto della gestione e della durata del periodo di asciutta sulla variazione della condizione corporea e del bilancio energetico dell'organismo durante il periodo di transizione.

Infatti le bovine che hanno avuto un asciutta più breve hanno mostrato una maggior percentuale di proteine del latte, in particolare durante i primi due mesi post-parto ($P < 0.007$).

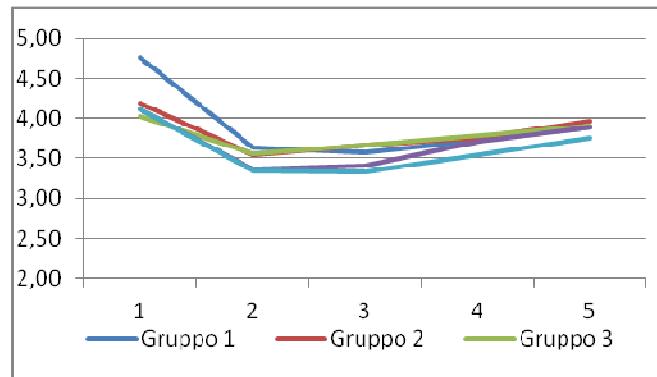


Figura 29: Effetto della durata del periodo di asciutta sulla percentuale di proteine del latte ($p < 0.007$).

Le cellule somatiche del latte (SCC) delle bovine che hanno avuto un asciutta breve hanno presentato un andamento differente rispetto agli animali che hanno fatto più giorni di asciutta ($P < 0.011$). Lo stesso andamento però non è confermato nei dati relativi al linear score (LS), che al contrario non sono risultati differenti ($P > 0.05$).

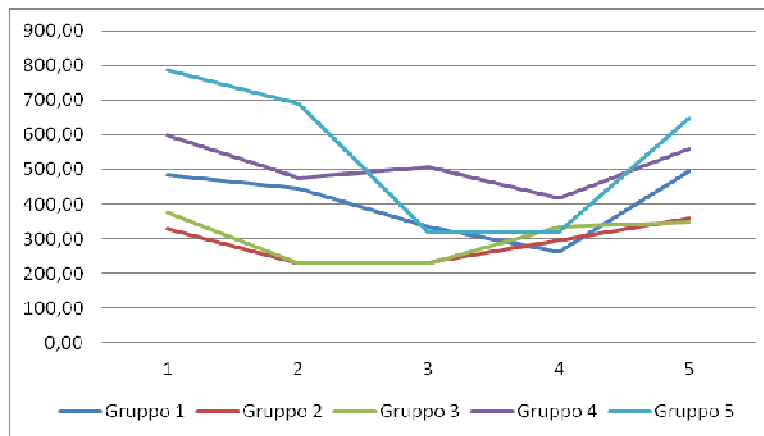


Figura 30: Effetto della durata dell'asciutta sull'andamento delle cellule somatiche del latte ($p < 0.007$).

Dall'analisi dei dati riproduttivi (tabella 40) non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa ($P > 0.05$) in nessuna dei tre indici riproduttivi considerati (intervallo parto/prima fecondazione, intervallo parto/concepimento, numero di fecondazioni per concepimento).

PARAMETRI RIPRODUTTIVI	Gruppo 1	Gruppo 2	Gruppo 3	Gruppo 4	Gruppo 5	SE	p-value
Intervallo parto/1° FA	65,92	67,00	78,58	66,36	65,60	3,22	0,576
Intervallo parto/concepimento	197,08	184,67	166,58	153,16	205,05	9,02	0,366
N° di FA/concepimento	4,33	4,33	3,64	3,52	4,75	0,26	0,536

Figura 40: Effetto della durata del periodo di asciutta sugli indici riproduttivi.

Conclusioni

Secondo alcuni autori l'accorciamento della durata del periodo di asciutta ha effetti favorevoli sulla produttività e la fertilità della bovina da latte.

Secondo il nostro studio, una durata inferiore ai tradizionali 55-65 giorni porta effetti positivi sulla percentuale di proteine nel latte e sull'andamento delle cellule somatiche.

Le scarse differenze presenti nelle produzioni e nell'efficienza riproduttiva sono probabilmente da imputare alla ridotta differenza che esiste nel bilancio energetico post-parto dei diversi gruppi.

BIBLIOGRAFIA

Adamiak S.J., Mackie K., Watt R.G., Webb R., Sinclair K.D. (2005) "Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle" *Biology of Reproduction*, vol. 73, pp. 918-926

Adashi E.Y. (1998) "The IGF family and folliculogenesis" *Journal of Reproduction Immunology*, vol. 39, pp. 13-19

Aguilar-Perez C., Ku-Vera J., Garnworthy P.C. (2009) "Effects of bypass fat on energy balance, milk production and reproduction in grazing crossbred cows in the tropics" *Livestock Science*, vol. 121, pp. 64-71

Ahima R.S., Kelly J., Elmquist J.K., Flier J.S. (1999) "Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia" *Endocrinology*, vol. 140, pp. 4923-4931

Akar y., Gazioglu A. (2006) "Relationship between vitamin A and β -carotene levels during the post-partum period and fertility parameters in cows with and with out retained placenta" *Bull Veterinary Institute Pulawy*, vol. 50, pp. 93-96

Akordor F.Y., Stone J.B., Walton J.S., Leslie K.E., Buchanan-Smith J.G. (1986) "Reproductive performance of lactating holstein cows fed supplemental β -carotene" *Journal fo Dairy Science*, vol. 69, pp. 2173-2178

Allbrahim R.M., Crowe M.A., Duffy P., O'Grady L., Beltman M.E., Mulligan F.J. (2010) "The effect of body condition at calving and supplementation with *Saccharomyces cerevisiae* on energy status and some reproductive parameters in early lactation dairy cows" *Animal Reproduction Science*, vol. 121, pp. 63-71

Ambrose D.J., Kastelic J.P., Corbett R., Pitney P.A., Petit H.V., Small J.A., Zalkovic P. (2006) "Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in α -linolenic acid" *Journal of Dairy Science*, vol. 89, pp. 3066-3074

Amstalden M., Garcia M.R., Stanko R.L., Nizielski S.E., Morrison C.D., Keisler D.H. (2002) "Central infusion of recombinant ovine leptin normalizes plasma insulin and stimulates a novel hysecretion of luteinizing hormone after short-term fasting in mature beef cows" *Biology of Reproduction*, vol. 66, pp. 1555-1561

Amstalden M., Zieba D.A., Edwards J.F., Harms P.G., Welsh J.T.H., Stanko R.L. (2003) "Leptin acts at the bovine adenohipophysis to enhance basal and gonadotropin-releasing hormone mediated release of luteinizing hormone: differential effects are dependent upon nutritional history" *Biology of Reproduction*, vol. 69, pp. 1539-1544

Annen E.L., Collier R.J. (2005) "Modified dry periods in dairy cattle: implication for milk yield and the transition period" *Proceeding of the 20th Annual Southwest Nutrition and Management Conference, Tempe, USA*, pp. 209-224

- Annen E.L., Collier R.J., McGuire M.A., Vicini J.L., Ballam J.M., Lormore M.J. (2004) "Effect of modified dry period lengths and bovine somatotropin on yield and composition of milk from dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 87, pp. 3746-3761
- Annen E.L., Fitzgerald A.C., Gentry P.C., McGuire M.A., Capuco A.V., Baumgard L.H., Collier R.J. (2007) "Effects of continuous milking and bST supplementation on mammary epithelial cell turnover" *Journal of Dairy Science*, vol. 90, pp. 165-183
- Annen E.L., Stiening C.M., Crooker B.A., Fitzgerald A.C., Collier R.J. (2008) "Effects of continuous milking and prostaglandin E2 on milk production and mammary epithelial cell turnover, ultrastructure and gene expression" *Journal of Animal Science*, vol. 86, pp. 1132-1144
- Arechiga C.F., Ortiz O., Hansen P.J. (1994) "Effect of prepartum injection of vitamin E and selenium on postpartum reproductive function of dairy cattle" *Theriogenology*, vol. 41, pp. 1251-1259
- Arechiga C.F., Staples C.R., McDowell L.R., Hansen P.J. (1998) "Effects of timed insemination and supplemental β -carotene on reproduction and milk yield of dairy cows under heat stress" *Journal of Dairy Science*, vol. 81, pp. 390-402
- Armstrong D.C., Baxter G., Hogg C.O., Woad K.J. (2002) "Insulin like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles" *Reproduction*, vol. 123, pp. 789-797
- Armstrong D.G., Benoit A.M. (1996) "Paracrine, autocrine and endocrine factors that mediate the influence of nutrition on reproduction in cattle and swine: an in vivo IGF-1 perspective" *Journal of Animal Science*, vol. 74, suppl. 3, pp. 18-35
- Armstrong D.G., Gong J.G., Gardner J.O., Baxter G., Hogg C.O., Webb R. (2002) "Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake" *Reproduction*, vol. 123, pp. 371-378
- Armstrong D.G., Gong J.G., Webb R. (2003) "Interaction between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms" *Reproduction Supplement*, vol. 61, pp. 403-414
- Armstrong D.G., McEvoy T.G., Baxter G., Robinson J.J., Hogg C.O., Woad K.J., Webb R. (2001) "Effects of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system" *Biology of Reproduction*, vol. 64, pp. 1624-1632
- Arunvipas P., VanLeeuwen J.A., Dohoo I.R., Keefe G.P. (2004) "Bulk tank milk urea nitrogen: seasonal patterns and relationship to individual cow milk urea nitrogen values" *Canadian Journal of Veterinary Research*, vol. 68, pp. 169-174
- Aziz F.S., Klesium P.H., Frandsen J.C. (1984) "Effects of selenium on polymorphonuclear leukocyte function in goat" *American Journal of Veterinary Research*, vol. 45, pp. 1715-1718

- Bachman K.C. (2002) "Milk production of dairy cows treated with estrogen at the onset of a short dry period" *Journal of Dairy Science*, vol. 85, pp. 797-803
- Bachman K.C., Schairer M.L. (2003) "Invited review: bovine studies on optimal lengths of dry periods" *Journal of Dairy Science*, vol. 86, pp. 3027-3037
- Baldi A., Savoini G., Pinotti L., Monfardini E., Cheli F., Dell'Orto V. (2000) "Effects of vitamin E and different energy sources on vitamin E status, milk quality and reproduction in transition cows" *Journal of Veterinary Medicine*, vol. 47, pp. 599-608
- Ballantine H.T., Socha M.T., Tomlinson D.J., Johnson A.B., Fielding A.S., Shearer J.K., Van Amstel S.R. (2002) "Effects of feeding complexed zinc, manganese, copper and cobalt to late gestation and lactating dairy cows on claw integrity, reproduction and lactation performance" *The Professional Animal Scientist*, vol. 18, pp. 211-218
- Banos G., Brotherstone S., Coffey M.P. (2007) "Prenatal maternal effects on body condition score, female fertility and milk yield of dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 90, pp. 3490-3499
- Barkan D., Jia H., Dantes A., Vardimon L., Amsterdam A., Rubinstein M. (1999) "Leptin modulates the glucocorticoid-induced ovarian steroidogenesis" *Endocrinology*, vol. 140, pp. 1731-1738
- Barton B.A., Rosario H.A., Anderson G.W., Grindle B.P., Carroll D.J. (1996) "Effects of dietary crude protein, breed, parity and health status on the fertility of dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 79, pp. 2225-2236
- Beam S.W., Butler W.R. (1997) "Energy balance and ovarian follicle development prior to first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat" *Biology Of Reproduction*, vol. 56, pp. 133-142
- Beam S.W., Butler W.R. (1998) "Energy balance, metabolic hormones and early postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid" *Journal of Dairy Science*, vol. 81, pp. 121-131
- Becu-Villalobos D., Garcia-Tornadu I., Shroeder G., Salado E.E., Gagliostro G., Delavaud C., Chilliard Y., Lacau-Mengido I.M. (2007) "Effect of fat supplementation on leptin, insulin like growth factor 1, growth hormone and insulin in cattle" *Canadian Journal of Veterinary Research*, vol. 71, pp. 218-225
- Beever D.E (2006) "The impact of controlled nutrition during the dry period on dairy cow health, fertility and performance" *Animal Reproduction Science*, vol. 96, pp. 212-226
- Bell A.W. (1995) "Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation" *Journal of Animal Science*, vol. 73, pp. 2804-2819
- Bell A.W., Bauman D.E. (1997) "Adaptation of glucose metabolism during pregnancy and lactation" *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, vol. 2, pp. 265-278

Bernard-Santos G., Perfield J.W., Barbano D.M., Bauman D.E., Overton T.R. (2003) "Production responses of dairy cows to dietary supplementation with conjugated linoleic acid (CLA) during the transition period and early lactation" *Journal of Dairy Science*, vol. 86, pp. 3218-3228

Bilby T.R., Block J., Do Amaral B.C., Sa Filho O., Silvestre F.T., Hansen P.J., Staples C.R., Thatcher W.W. (2006) "Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer" *Journal of Dairy Science*, vol. 89, pp. 3891-3903

Bilby T.R., Sozzi A., Lopez M.M., Silvestre F.T., Ealy A.D., Staples C.R., Thatcher W.W. (2006) "Pregnancy, bovine somatotropin and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: 1. Ovarian, conceptus and growth hormone-insuline like growth factor system responses" *Journal fo Dairy Science*, vol. 89, pp. 3360-3374

Bjornsson O.G., Duerden J.M., Barlett S.M., Sparks J.D., Sparks C.E., Gibbons G.F. (1992) "The role of pancreatic hormones in the regulation of lipid storage, oxidation and secretion in primary cultures of rat hepatocytes" *Biochemical Journal*, vol. 281, pp. 381-386

Blanchard t., Ferguson T.J.D., Love L., Takeda T., Henderson B., Hasler J., Chalupa W. (1990) "Effects of dietary crude protein type on fertilization and embryo quality in dairy cattle" *American Journal of Veterinary Research*, vol. 51, pp. 905-908

Blauwiel R., Kincaid R.L., Reeves J.J. (1986) "Effect of high crude protein on pituitary and ovarian function in holstein cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 69, pp. 439-446

Block S.S., Butler W.R., Ehrhardt R.A., Bell A.W., Van Amburgh M.E., Boisclair Y.R. (2001) "Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance" *Journal of Endocrinology*, vol. 171, pp. 339-348.

Block S.S., Rhoads R.P., Bauman D.E., Ehrhardt R.A., McGuire M.A., Crooker B.A., Griinari J.M., Mackle T.R., Weber W.J., Van Amburgh M.E., Boisclair Y.R. (2003) "Demonstration of a role for insulin in the regulation of leptin in lactating dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 86, pp. 3508-3515

Blun J.W., Wilson R.B., Kronfeld D.S. (1976) "Plasma insulin concentration in parturient cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 56, pp. 459-464

Boassaert P., Leroy J.L.M.R., De Vliegher S., Opsomer G. (2008) "Interrelations between glucose induced insulin response, metabolic indicators and time of first ovulation in high yielding dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 91, pp. 3363-3371

Boken S.L., Stasples C.R., Sollenberger L.E., Jenkins T.C. (2005) "Effect of grazing and fat supplementation on production and reproduction of holstein cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 88, pp. 4258-4272

Bradford B.J., Mamedova L.K., Minton J.E., Drouillard J.S., Johnson B.J. (2009) "Daily injection of tumor necrosis factor increases hepatic triglycerides and alters transcript abundance of metabolic of metabolic genes in lactating dairy cows" *Journal of Nutrition*, vol. 139, pp. 1451-1456

Brannian J., Zhao Y., McElroy M. (1999) "Leptin inhibits gonadotrophin-stimulated granulosa cell progesterone production by antagonizing insulin action" *Human Reproduction*, vol. 14, pp. 1445-1448

Brozos C.N., Kiossis E., Georgiadis M.P., Piperelis S., Boscós C. (2009) "The effect of chloride ammonium, vitamin E and Se supplementation throughout the dry period on the prevention of retained fetal membranes, reproductive performance and milk yield of dairy cows" *Livestock Science*, vol. 124, pp. 210-215

Bruckental I., Drori D., Kaim M., Lehrer H., Folman Y. (1989) "Effects of source and level of protein on milk yield and reproductive performance of high producing primiparous and multiparous cows" *Animal Production*, vol. 48, pp. 319-325

Brzezinska-Slebodzinska E., Miller J.K., Quigley J.D., Moore J.R., Madsen F.C. (1994) "Antioxidant status of dairy cows supplemented prepartum with vitamin E and selenium" *Journal of Dairy Science*, vol. 77, pp. 3087-3095

Burke J.M., Staples C.R., Risco C.A., De La Sota R.L., Thatcher W.W. (1997) "Effect of ruminant grade menhaden fish meal on reproductive and productive performance of lactating dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 80, pp. 3386-3398

Butler W.R. (1998) "Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle" *Journal of Dairy Science*, vol. 81, pp. 2533-2539

Butler W.R. (2000) "Nutritional interaction with reproductive performance in dairy cattle" *Animal Reproduction Science*, vol. 60-61, pp. 449-457

Butler W.R., Smith R.D. (1989) "Interrelationship between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle" *Journal of Dairy Science*, vol. 72, pp. 767-783

Caldari-Torres C., Rodriguez-Sallaberry C., Greene E.S., Badinga L. (2006) "Differential effects of n-3 and n-6 fatty acids on prostaglandin F2a production by bovine endometrial cells" *Journal of Dairy Science*, vol. 89, pp. 971-977

Campbell M.H., Miller J.K. (1998) "Effect of supplemental dietary vitamin E and zinc on reproductive performance of dairy cows and heifers fed excess iron" *Journal of Dairy Science*, vol. 81, pp. 2693-2699

Campbell M.H., Miller J.K. (1998) "Effect of supplemental dietary vitamin E and zinc on reproductive performance of dairy cows and heifers fed excess iron" *Journal of Dairy Science*, vol. 81, pp. 2693-2699

Campbell M.H., Miller J.K. (1998) "Effect of supplemental dietary vitamin E and zinc on reproductive performance of dairy cows and heifers fed excess iron" *Journal of Dairy Science*, vol. 81, pp. 2693-2701

Campbell M.H., Miller J.K., Schrick F.N. (1999) "Effect of additional cobalt, copper, manganese and zinc on reproduction and milk yield of lactating dairy cows receiving bovine somatotropin" *Journal of Dairy Science*, vol. 82, pp. 1019-1025

Canfield R.W., Sniffen C.J., Butler W.R. (1990) "Effects of excess degradable protein on postpartum reproduction and energy balance in dairy cattle" *Journal of Dairy Science*, vol. 73, pp. 2342-2349

Cao Y., Maddox J.F., Mastro A.M., Scholz R.W., Hildenbrandt G, Reddy C.C. (1992) "Selenium deficiency alters the lipoxygenase pathway and mitogenic response in bovine lymphocytes" *Journal of Nutrition*, vol. 122, pp. 2121-2127

Capuco A.V., Annen E.L., Fitzgerald A.C., Ellis S.E., Collier R.J. (2006) "Mammary cell turnover: relevance to lactation persistency and dry period management" *Ruminant Physiology, Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression*, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, pp. 363-388

Carlsson B., Nilsson A., Isaksson O.G.P., Billing H. (1993) "Growth hormone receptor messenger RNA in the rat ovary: regulation and localization" *Molecular Cell Endocrinology*, vol. 95, pp. 59-66

Carroll D.J., Barton B.A., Anderson G.W., Smith R.D. (1988) "Influence of protein intake and feeding strategy on reproductive performance of dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 71, pp. 3470-3481

Carroll D.J., Grummer R.R., Clayton M.K. (1992) "Stimulation of luteal cell progesterone production by lipoproteins from cows fed control or fat supplemented diets" *Journal of Dairy Science*, vol. 75, pp. 2205-2214

Carroll D.J., Hossain F.R., Keller M.R. (1994) "Effect of supplemental fish meal on the lactation and reproductive performance of dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 77, pp. 3058-3072

Carroll D.J., Jerred M.J., Grummer R.R., Combs D.K., Rierson R.A., Hauser E.R. (1990) "Effects of fat supplementation and immature alfa-alfa to concentrate ratio on plasma progesterone, energy balance and reproductive traits of dairy cattle" *Journal of Dairy Science*, vol. 73, pp. 2855-2863

Castaneda-Gutierrez E., Benefield B.C., DeVeth M.J., Santos N.R., Gilbert R.O., Butler W.R., Bauman D.E. (2007) "Evaluation of the mechanism of action of conjugated linoleic acid isomers on reproduction in dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 90, pp. 4253-4264

Castaneda-Gutierrez E., Overton T.R., Butler W.R., Bauman D.E. (2005) "Dietary supplements of two doses of calcium salts of conjugated linoleic acid during the transition period and early lactation" *Journal of Dairy Science*, vol. 88, pp. 1078-1089

Castaneda-Gutierrez E., Pelton S.H., Gilbert R.O., Butler W.R. (2009) "Effect of peripartum dietary energy supplementation of dairy cows on metabolites, liver function and reproductive variables" *Animal Reproduction Science*, vol. 112, pp. 301-315

Cerri R.L.A., Juchem S.O., Chebel R.C., Rutigliano H.M., Bruno R.G.S., Galvao K.N., Thatcher W.W., Santos J.E.P. (2009) "Effect of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in high-producing dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 92, pp. 1520-1531

Cerri R.L.A., Rutigliano H.M., Lima F.S., Araujo D.B., Santos J.E.P. (2009) "Effect of source of supplemental selenium on uterine health and embryo quality in high-producing dairy cows" *Theriogenology*, vol. 71, pp. 1127-1137

Chagas L.M., Bass J.J., Blache D., Burke C.R., Kay J.K., Lindsay D.R., Lucy M.C., Martin G.B., Meier S., Rhodes F.M., Roche J.R., Thatcher W.W., Webb R. (2007) "Invited review: new perspective on the role of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 90, pp. 4022-4032

Chapa A.M., McCormick M.E., Fernandez J.M., French D.D., Ward J.D., Beatty J.F. (2001) "Supplemental dietary protein for grazing dairy cows: reproduction, condition loss, plasma metabolites and insulin" *Journal of Dairy Science*, vol. 84, pp. 908-916

Chelikani P.K., Keisler D.H., Kennelly J.J. (2003) "Response of plasma leptin concentration to jugular infusion of glucose or lipid is dependent on the stage of lactation of Holstein cows" *Journal of Nutrition*, vol. 133, pp. 4163-4171

Cheng Z., Robinson R.S., Pushpakumara P.G.A., Mansbridge R.J., Wathes D.C. (2000) "Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on uterine prostaglandin synthesis in the cow" *Journal of Endocrinology*, vol. 171, pp. 463-473

Childs S., Carter F., Lynch C.O., Sreenan J.M., Lonergan P., Hennessy A.A., Kenny D.A. (2008) "Embryo yield and quality following dietary supplementation of beef heifers with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA)" *Theriogenology*, vol. 70, pp. 992-1003

Chilliard Y., Ferlay A., Delavaud C., Bocquier F. (1998) "Plasma leptin in underfed or overfed adult holstein and charolais cows and its relationship with adipose tissue cellularity" *International Journal of Obesity*, vol. 22, pp. 171-178

Chirieac D.V., Chirieac L.R., Corsetti J.P., Cianci J., Sparks C.E., Sparks J.D. (2000) "Glucose-stimulated insulin secretion suppresses hepatic triglyceride-rich lipoprotein and apoB production" *American Journal of Physiology*, vol. 279, pp. E1003-E1011

Choi B.R., Palmquist D.L. (1996) "Effects of dietary fat on ruminal propionate and plasma insulin concentrations in lactating cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 79, pp. 169-178

Choi B.R., Palmquist D.L., Allen M.S. (1996) "Effects of endogenous cholecystokinin (CCK) on feed intake, plasma insulin, pancreatic polypeptide (PP) and metabolite levels in heifers fed fat" *Journal of Dairy Science*, vol. 79, pp. 169-176

Clarke I.J., Henry B.A. (1999) "Leptin and reproduction" *Review of Reproduction*, vol. 4, pp. 48-55

Cohick W.S. (1998) "Role of insulin like growth factor and their binding proteins in lactation" *Journal of Dairy Science*, vol. 81, pp. 1769-1777

Colazo M.G., Hayirli A., Doepel L., Ambrose D.J. (2009) "Reproductive performance of dairy cows is influenced by prepartum feed restriction and dietary fatty acid source" *Journal of Dairy Science*, vol. 92, pp. 2562-2571

Collier R.J., Annen E.L., Pezeshki A. (2011) "Effects of continuous lactation and short dry periods on mammary function and animal health" *Animal*, pp. 1-12

Conner H.C., Houghton P.L., Lemenager R.P., Malven P.V., Parfet J.R., Moss G.E. (1990) "Effect of dietary energy, body condition and calf removal on pituitary gonadotropins, gonadotropins release hormone (GnRH) and hypothalamic opioids in beef cows" *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 7, pp. 403-411

Contreras L.L., Ryan C.M., Overton T.R. (2004) "Effects of dry cow grouping strategy and prepartum body condition score on performance and health of transition dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 87, pp. 517-523

Corriquiry M., Dahlen C.R., Weber W.J., Lamb G.C., Crooker B.A. (2009) "Postpartum ovarian activity in multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed n-3 fatty acids in early lactation" *Journal of Dairy Science*, vol. 92, pp. 4876-4888

Cottrill B., Biggadike H.J., Collins C., Laven R.A. (2002) "Relationship between milk urea concentration and the fertility of dairy cows" *Veterinary Records*, vol. 151, pp. 413-416

Daniel R.C.W. (1983) "Motility of the rumen and abomasum during hypocalcaemia" *Canadian Journal of Comparative Medicine*, vol. 47, pp. 276-280

Dawuda P.M., Scaramuzzi R.J., Leese H.J., Hall C.J., Peters A.R., Drews S.B., Wathes D.C. (2002) "Effects of timing or urea feeding on the yield and quality of embryos in lactating dairy cows" *Theriogenology*, vol. 58, pp. 1443-1455

De Veth M.J., Bauman D.E., Koch W., Mann G.E., Pfeiffer A.M., Butler W.R. (2009) "Efficacy of conjugated linoleic acid for improving reproduction: a multi-study analysis in early-lactation dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 92, pp. 2662-2669

Dechow C.D., Rogers G.W., Klei L., Lawlor T.J., VanRaden P.M. (2004) "Body condition score and dairy farm evaluations as indicators of days open in US holstein" *Journal of Dairy Science*, vol. 87, pp. 3534-3541

Dehghan A., Ghasrodashti A.R., Esfandiari A., Mohebbi-Fani M., Hoshyar M.B., Nayeri K. (2011) "Hepatoprotective effect of silymarin during negative energy balance in sheep" *Comparative Clinica Pathology*, vol. 20, pp. 233-238

Delavaud C., Faulconnier Y., Bocquier F., Chilliard Y. (1999) "Pre- and postprandial changes in plasma leptin and insulin concentration during underfeeding and refeeding in dry cows" *Proceeding of the Nutritional Society*, vol. 58, pp. 108-115

Delavaud C., Faulconnier Y., Bocquier F., Kahn G., Chilliard Y. (2000) "Short and long term nutritional regulation of plasma leptin concentration in dry non-pregnant cows" Book of Abstract 51st Annual Meeting of European Federation for Animal Science, The Netherlands, pp. 228

Dias F.M., Allaire F.R. (1982) "Dry period to maximize milk production over two consecutive lactations" *Journal of Dairy Science*, vol. 65, pp. 136-145

Diskin M.G., Mackey D.R., Roche J.F., Sreenan J.M. (2003) "Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle" *Animal Reproduction Science*, vol. 78, pp. 345-370

Doepel L., Lapierre H., Kennelly J.J. (2002) "Peripartum performance and metabolism of dairy cows in response to prepartum energy and protein intake" *Journal of Dairy Science*, vol. 85, pp. 2315-2334

Domecq J.J., Skidmore A.L., Lloyd J.W., Kaneene J.B. (1997) "Relationship between body condition scores and conception at first artificial insemination in a large dairy herd of high yielding holstein cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 80, pp. 113-120

Drackley J.K., Overton T.R., Douglas G.N. (2001) "Adaptation of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period" *Journal of Dairy Science*, vol. 84 (suppl.), pp. 100-112

Drackley, J.K., Richard, M.J., Beitz, D.C. and Young, J.W. (1992) "Metabolic changes in dairy cows with ketonemia in response to feed restriction and dietary 1,3-butanediol" *Journal of Dairy Science*, vol. 75, pp. 1622-1634

Dyer C.J., Simmons J.M., Matteri R.L., Keisler D.H. (1997) "Leptin receptor mRNA is expressed in ewe anterior pituitary and adipose tissue and is differentially expressed in hypothalamic regions of well-fed and feed-restricted ewes" *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 14, pp. 119-128

Ealy A.D., Arechiga C.F., Bray D.R., Risco C.A., Hansen P.J. (1994) "Effectiveness of short-term cooling and vitamin E for alleviation of infertility induced by heat stress in dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 77, pp. 3601-3607

Eger S., Drori D., Kadoori I., Miller N., Schindler H. (1985) "Effects of selenium and vitamin E on incidence of retained placenta" *Journal of Dairy Science*, vol. 68, pp. 2119-2125

Ehrhart R.A., Slepatis R.M., Siegal-Willott J., Van Amburgh M.E., Bell A.W., Boisclair Y.R. (2000) "Development of a specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep" *Journal of Endocrinology*, vol. 166, pp. 519-528

Elrod C.C., Butler W.R. (1993) "Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein" *Journal of Animal Science*, vol. 71, pp. 694-701

Elrod C.C., Van Amburgh M., Butler W.R. (1993) "Alterations of pH in response to increase dietary protein in cattle are unique to the uterus" *Journal of Animal Science*, vol. 71, pp. 702-706

Enevoldsen C., Sorensen J.T. (1992) "Effects of dry period length on clinical mastitis and other major clinical health disorders" *Journal of Dairy Science*, vol. 75, pp. 1007-1014

Erskine R.J., Bartlett R.C., Herdt T., Gaston P. (1997) "Effects of parenteral administration of vitamin E on health of periparturient dairy cows" *Journal of American Veterinary Medical Association*, vol. 211, pp. 466-471

Etherton T.D., Bauman D.E. (1998) "Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals" *Physiology Review*, vol. 78, pp. 745-761

Fahey J., Boland M.P., O'Callaghan D. (2001) "The effects of dietary urea on embryo development in superovulated donor ewes and on a early embryo survival and development in recipient ewes" *Animal Science*, vol. 72, pp. 395-400

Fahey J., Mee J.F., O'Callaghan D., Murphy J.J. (2002) "Effect of calcium salts of fatty acids and calcium salt of methionine hydroxy analogue on reproductive responses and milk production in holstein-friesian cows" *Animal Science*, vol. 74, pp. 145-154

Falkenberg U., Haertel J., Rotter K., Iwersen M., Arndt G., Heuwieser W. (2008) "Relationship between the concentration of insulin like growth factor 1 in serum in dairy cows in early lactation and reproductive performance and milk yield" *Journal of Dairy Science*, vol. 91, pp. 3862-3868

Fantuzzi G., Faggioni R. (2000) "Leptin in the regulation of immunity, inflammation and hematopoiesis" *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 68, pp. 437-446

Fenwick M.A., Fitzpatrick R., Kenny D.A., Diskin M.G., Patton J., Murphy J.J., Wathes D.C. (2008) "Interrelationship between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows" *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 34, pp. 31-44

Ferguson J.D., Blanchard T., Galligan D.T., Hoshall D.C., Chalupa W. (1988) "Infertility in dairy cattle fed a high percentage of protein degradable in the rumen" *Journal of American Veterinary Medical Association*, vol. 192, pp. 659-662

Fernandez-Fernandez R., Tena-Sempere M., Aguilar E., Pinilla L. (2004) "Ghrelin effects on gonadotropin secretion in male and female rats" *Neuroscience Letters*, vol. 362, pp. 103-107

Filburn C.R., Kettenacker R., Griffin D.W. (2007) "Bioavailability of a sylibin-phosphatidylcholine complex in dogs" *Journal of Veterinary Pharmacological Therapy*, vol. 30, pp. 132-138

Folman Y., Ascarelli I., Kraus D., Barash H. (1987) "Adverse effect of β -carotene in diet on fertility of dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 70, pp. 357-366

Fortune J.E., Rivera G.M., Yang M.Y. (2004) "Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle" *Animal Reproduction Science*, vol. 82, pp. 109-126

Fouladi-Nashta A.A., Gutierrez C.G., Gong J.G., Garnsworthy P.C., Webb R. (2007) "Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows" *Biology of Reproduction*, vol. 77, pp. 9-17

Fraschini F., Damartini G., Esposti D. (2002) "Pharmacology of silymarin" *Clinical Drugs Investigation*, vol. 22, pp. 51-65

Friggens N.C. (2003) "Body lipid reserves and the reproductive cycle: towards a better understanding" *Livestocks Production Science*, vol. 83, n° 2-3, pp. 219-236

Friggens N.C., Ridder C., Lovendahl P. (2007) "On the use of milk composition measures to predict the energy balance of dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 90, pp. 5453-5467

Funk D.A., Freeman A.E., Berger P.J. (1987) "Effects of previous days open, previous days dry, and present days open on lactation yield" *Journal of Dairy Science*, vol. 70, pp. 2366-2373

Funston R.N., Seidel G.E., Klindt J., Roberts A.J. (1996) "Insulin-like growth factor and insulin-like growth factor binding proteins in bovine serum and follicular fluid before and after the preovulatory surge of luteinizing hormone" *Biology of Reproduction*, vol. 55, pp. 1390-1396

Gainsford T., Alexander W.S. (1999) "A role for leptin in hemopoiesis" *Molecular Biotechnology*, vol. 11, pp. 149-158

Garcia-Bojalil C.M., Staples C.R., Risco C.A., Savio J.D., Thatcher W.W. (1998) "Protein degradability and calcium salts of long chain fatty acids in the diet of lactating dairy cows: reproductive responses" *Journal of Dairy Science*, vol. 81, pp. 1385-1394

Garcia-Bojalil C.M., Staples C.R., Thatcher W.W., Drost M. (1994) "Protein intake and development of ovarian follicles and embryos of superovulated nonlactating dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 77, pp. 2537-2548

Garnsworthy p.c., Lock A., Mann G.E., Sinclair K.D., Webb R. (2008) "Nutrition, metabolism and fertility in dairy cows: 2. Dietary fatty acids and ovarian function" *Journal of Dairy Science*, vol. 91, pp. 3824-3833

Garnsworthy P.C., Fouladi-Nashta A.A., Mann G.E., Sinclair K.D., Webb R. (2009) "Effects of dietary induced changes in plasma insulin concentration during the early post partum period on pregnancy rate in dairy cows" *Reproduction*, vol. 137, pp. 759-768

Garnsworthy P.C., Lock A., Mann G.E., Sinclair K.D., Webb R. (2008) "Nutrition, metabolism and fertility in dairy cows: 2. dietary fatty acids and ovarian function" *Journal of Dairy Science*, vol. 91, pp. 3824-3833

Gillund P., Reksen O., Grohn Y.T., Karlberg K. (2001) "Body condition related to ketosis and reproductive performance in norwegian dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 84, pp. 1390-1396

Gingerich D.A., Baggot J.D., Yeary R.A. (1975) "Pharmacokinetics and dosage of aspirin in cattle" *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 167, pp. 945-948

Goff J.P. (1999) "Mastitis and retained placenta - relationship to bovine immunology and nutrition" *Advance Dairy Technology*, vol. 11, pp. 185-192

Gong J.G., Lee W.J., Garnsworth P.C., Webb R. (2002) "Effects of dietary induced increases in circulating insulin concentration during the early post-partum period on reproductive function in dairy cows" *Reproduction*, vol. 123, pp. 419-427

Gossen N., Fietze S., Mosenfechtel S., Hoedemaker M. (2006) "Relationship between body condition (back fat thickness and body condition scoring) and fertility in dairy cows (German black pied/HF)" *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, vol. 113, pp. 174-177

Grant M.H.J., Hess B.W., Hixon D.L., Vab Kirk E.A., Alexander B.M., Nett T.M., Moss G.E. (2003) "Effect of feeding high-linoleate safflower seeds on reproductive endocrine dynamics in postpartum beef femeles" *Proceeding of the Western Section of American Society of Animal Science*, vol. 54

Graves-Hoagland R.L., Hoagland T.A., Woody C.O. (1988) "Effect of β -carotene and vitamin A on progesterone production by bovine luteal cells" *Journal of Dairy Science*, vol. 71, pp. 1058-1062

Graves-Hoagland R.L., Hoagland T.A., Woody C.O. (1989) "Relatioship of plasma β -carotene and vitamin A to luteal function in postpartum cattle" *Journal of Dairy Science*, vol. 72, pp. 1854-1858

Gruffat D., Durand D., Chillard Y., Williams P., Bauchart D. (1997) "Hepatic gene expression of apolipoprotein B100 during early lactation in underfed, high producing dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 80, pp. 657-666

Gruffat D., Durand D., Graulet B., Bauchart, D. (1996) "Regulation of VLDL synthesis and secretion in the liver" *Reproduction, Nutrition and Development*, vol. 36, pp. 375-389

Grummer R.R. (1993) "Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 76, pp. 3882-3896

Grummer R.R. (1995) "Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cows" *Journal of Animal Science*, vol. 73, pp.2820-2833

Grummer R.R. (2007) "Strategies to improve fertility of high yielding dairy farms: management of the dry period" *Theriogenology*, vol. 68, pp. 281-288

Gualy M.S., Hayen M.J., Bachman K.C., Belloso T., Liboni M., Head H.H. (2003) "Milk production and feed intake of holstein cows given short (30-d) or normal (60-d) dry periods" *Journal of Dairy Science*, vol. 86, pp. 2030-2038

Gümen A., Rastani R.R., Grummer R.R., Wiltbank M.C. (2005) "Reduced dry periods and varying prepartum diets alter postpartum ovulation and reproductive measures" *Journal of Dairy Science*, vol. 88, pp. 2401-2411

Guo K., Russek-Cohen E., Varner N.A., Kohn R.A. (2004) "Effect of milk urea nitrogen and other factors on probability of conception of dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 87, pp. 1878-1885

Gupta S., Gupta H.K., Soni J. (2005) "Effect of Vitamin E and selenium supplementation on concentrations of plasma cortisol and erythrocyte lipid peroxides and the incidence of retained fetal membranes in crossbred dairy cattle" *Theriogenology*, vol. 64, pp. 1273-1286

Hammon D.S., Evjen I.M., Dhiman T.R., Goff J.P., Walters J.L. (2006) "Neutrophil function and energy status in holstein cows with uterine health disorders" *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 113, pp. 21-29

Harrison H.H., Hancock D.D., Conrad H.R. (1984) "Vitamin E and selenium for reproduction of the dairy cow" *Journal of Dairy Science*, vol. 67, pp. 123-129

Harrison J.H., Hancock D.D., St-Pierre N., Conrad H.R., Harvey W.R. (1986) "Effect of prepartum selenium treatment on uterine involution in the dairy cow" *Journal of Dairy Science*, vol. 69, pp. 1421-1430

Harvettine K.J., Allen M.S. (2005) "The effect of production level on feed intake, milk yield and endocrine responses to two fatty acid supplements in lactating cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 88, pp. 4018-4027

Hawkins D.E., Niswender K.D., Oss G.M., Moeller C.L., Odde K.G., Sawyer H.R., Niswender G.D. (1995) "An increase in serum lipids increase luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows" *Journal of Animal Science*, vol. 73, pp. 541-545

Hayirli A. (2006) "The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in post-partum dairy cattle" *Veterinary Research Communication*, vol. 30, pp. 749-774

Hemingway R.G. (1999) "The influence of selenium and vitamin E intakes on milk somatic cell counts and mastitis in cows" *Veterinary Research Communications*, vol. 23, pp. 481-499

Heravi Moussavi A.R., Gilbert R.O., Overton T.R., Bauman D.E., Butler W.R. (2007) "Effects of feeding fish meal and n-3 fatty acids on ovarian and uterine responses in early lactating dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 90, pp. 145-154

Hidiroglou M., McAllister A.J., Williams C.J. (1987) "Prepartum supplementation of selenium and vitamin E to dairy cows: assessment of selenium status and reproductive performance" *Journal of Dairy Science*, vol. 70, pp. 1281-1289

Hoedemaker M., Prage D., Gundelach Y. (2009) "Body condition change ante- and postpartum, health and reproductive performance in german holstein cows" *Reproduction of Domestic Animal*, vol. 44, pp. 167-173

Hogan J.S., Smith K.L., Weiss W.P., Todhunter D.A., Schockey W.L. (1990) "Relationships among vitamin E, selenium and bovine blood neutrophils" *Journal of Dairy Science*, vol. 73, pp. 2372-2378

Hogan J.S., Weiss W.P., Todhunter D.A., Smith K.L., Schoenberger P.S. (1992) "Bovine neutrophil responses to parenteral vitamin E" *Journal of Dairy Science*, vol. 75, pp. 399-405

Hojman D., Kroll O., Adin G., Hanochi B., Ezra E. (2004) "Relationships between milk urea and production, nutrition and fertility in Israeli dairy herds" *Journal of Dairy Science*, vol. 87, pp. 1001-1011

Holtenius K., Agenas S., Delavaud C., Chilliard Y. (2003) "Effects of feeding intensity during the dry period. 2. Metabolic and hormonal responses" *Journal of Dairy Science*, vol. 86, pp. 883-891

Horst R.L., Goff J.P., Reinhardt T.A. (1994) "Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow" *Journal of Dairy Science*, vol. 77, pp. 1936-1951

Horvath T.L., Diano S., Sotonyi P., Heiman M., Tschop M. (2001) "Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance - a hypothalamic perspective" *Endocrinology*, vol. 142, pp. 4163-4169

Houseknecht K.L., Portocarrero C.P., Ji s., Lemenager R., Spurlock M.E. (2000) "Growth hormone regulates leptin gene expression in bovine adipose tissue: correlation with adipose IGF-1 expression" *Journal of Endocrinology*, vol. 164, pp. 51-57

Howard H.J., Aalseth E.P., Adams G.D., Bush L.J., McNew R.W. (1987) "Influence of dietary protein on reproductive performance of dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 70, pp. 1563-1570

Hurley W.L., Doane R.M. (1989) "Recent development in the roles of vitamins and minerals in reproduction" *Journal of Dairy Science*, vol. 72, pp. 784-804

Ingvartsen K.L., Andersen J.B. (2000) "Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals" *Journal of Dairy Science*, vol. 83, pp. 1573-1597

Ishak M.A., Larson L.L., Owen F.G., Lawry S.R., Erickson E.D. (1983) "Effects of selenium, vitamins, and ration fiber on placental retention and performance of dairy cattle" *Journal of Dairy Science*, vol. 66, pp. 99-108

Izadyar F., Zhao J., Van Tol H.T.A., Colenbrander B., Bevers M.M. (1999) "Messenger RNA expression and protein localization of growth hormone in bovine ovarian tissue and in cumulus oocyte complexes (COCs) during in vitro maturation" *Molecular Reproduction and Development*, vol. 53, pp. 398-407

Jang M., Mistry A., Swick A.G., Romsos D.R., (2000) "Leptin rapidly inhibits hypothalamic neuropeptide Y secretion and stimulates corticotropin-releasing hormone secretion in adrenalectomized mice" *Journal of Nutrition*, vol. 130, 2813-2820

Jankowska M., Sawa A., Neja W. (2010) "Effect of milk urea and protein levels on fertility indices in cows" *Journal of Central European Agriculture*, vol. 11, pp. 475-480

Jiang H., Lucy M.C., Crooker B.A., Bela W.E. (2005) "Expression of growth hormone receptors 1A mRNA is decreased in dairy cows but not in beef cows at parturition" *Journal of Dairy Science*, vol. 88, pp. 1370-1377

Jilek F., Pytloun P., Kubesova M., Stipkova M., Bouska J., Volek J., Frelich J., Rajmon R. (2008) "Relationship among body condition score, milk yield and reproduction in Czech fleckvieh cows" *Czech Journal of Animal Science*, vol. 53, pp. 357-367

Jordan E.R., Chapman T.E., Holtan D.W., Swanson L.W. (1983) "Relationship of dietary crude protein to composition of uterine secretion and blood in high producing dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 66., pp. 1854-1862

Jordan E.R., Swanson L.V. (1979a) "Effects of crude protein on reproductive efficiency, serum total protein and albumin in the high producing dairy cow" *Journal of Dairy Science*, vol. 62, pp. 58-63

Jordan E.R., Swanson L.V. (1979b) "Serum progesterone and luteinizing hormone in dairy cattle fed varying levels of crude protein" *Journal of Animal Science*, vol. 48, pp. 1154-1158

Jorritsma R., Wensing T., Kruip T.A., Vos P.L., Noordhuizen J.P. (2003) "Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows" *Veterinary Research*, vol. 34, pp. 11-26

Jukola E., Hakkarainen J., Saloniemi H., Sankari S. (1996) "Blood selenium, vitamin E, vitamin A, and β -carotene concentrations and udder health, fertility treatments and fertility" *Journal of Dairy Science*, vol. 79, pp. 838-845

Kadokawa H., Blache D., Martin G.B. (2006) "Plasma leptin concentration correlate with luteinizing hormone secretion in early postpartum holstein cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 89, pp. 3020-3027

Kadokawa H., Blache D., Yamada Y., Martin G.B. (2000) "Relationships between changes in plasma concentrations of leptin before and after parturition and the timing of first post-partum ovulation in high-producing Holstein dairy cows" *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 12, pp. 405-411

- Kaim M., Folman Y., Neumark H., Kaufmann W. (1983) "The effect of protein intake and lactation number on postpartum body weight loss and reproductive performance of dairy cows" *Animal Production*, vol. 37, pp. 229-235
- Kamada H., Hodate J. (1998) "Effect of dietary selenium supplementation on the plasma progesterone concentration in cows" *Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 60, pp. 133-139
- Kappel L.C., Ingraham R.H., Morgan E.G., Dixon J.M., Zeringue L., Wilson D., Babcock D.K. (1984) "Selenium concentrations in feeds and effects of treating pregnant Holstein cows with selenium and vitamin E on blood selenium values and reproductive performances" *American Journal of Veterinary Research*, vol. 45, pp. 691-700
- Kawamura K., Sato N., Fukuda J. (2003) "Ghrelin inhibits the development of mouse preimplantation embryos in vitro" *Endocrinology*, vol. 144, pp. 2623-2633
- Kehrli M.E., Neill J.D., Burvenich C., Goff J.P., Lippolis J.D., Reinhardt T.A. et al. (2006) "Energy and protein effects on the immune system" *Ruminant Physiology*, Wageningen Academic Publishers, pp. 455-471
- Keisler D.H., Lucy M.C. (1996) "Perception and interpretation of the effects of undernutrition on reproduction" *Journal of Animal Science*, vol. 74, suppl. 3, pp. 1-17
- Kendall N.R., Gutierrez C.G., Scaramuzzi R.J., Baird D.T., Webb R., Campbell B.K. (2004) "Direct in vivo effects of leptin on ovarian steroidogenesis in sheep" *Reproduction*, vol. 128, pp. 757-765
- Kenny D.A., Boland M.P., Diskin M.G., Sreenan J.M. (2001) "Effect of pasture crude protein and fermentable energy supplementation on blood metabolite and progesterone concentration and on embryo survival in heifers" *Animal Science*, vol. 73, pp. 501-511
- Kenny D.A., Boland M.P., Diskin M.G., Sreenan J.M. (2002) "Effect of rumen degradable protein with or without fermentable carbohydrate supplementation on blood metabolites and embryo survival" *Animal Science*, vol. 74, pp. 529-537
- Keown J.F., Everett R.W. (1986) "Effect of days carried calf, days dry, and weight of first calf heifers on yield" *Journal of Dairy Science*, vol. 69, pp. 1891-1896
- Kezele P.R., Nilsson E.E., Skinner M.K. (2002) "Insulin but not insulin like growth factor 1 promotes the primordial to primary follicles transition" *Molecular Cell Endocrinology*, vol. 192, pp. 37-43
- Khorasani G.R., De Boer G., Robinson P.H., Kennelly J.J. (1992) "Effect of canola fat on ruminal and total tract digestion, plasma hormones and metabolites" *Journal of Dairy Science*, vol. 75, pp. 492-501
- Kim H.S., Lee J.M., Park S.B., Jeong S.G., Jung J.K., Im K.S. (1997) "Effect of vitamin E and selenium administration on the reproductive performance in dairy cows" *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, vol. 10, pp. 308-315

Kim I.H., 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 disease, metabolic parameters and reproductive performance in holstein dairy cows" *Theriogenology*, vol. 60, pp. 1445-1456

Kimura K., Goff J.P., Kehrl M.E., Reinhardt T.A (2002) "Decreased neutrophils function as a cause of retained placenta in dairy cattle" *Journal of Dairy Cattle*, vol. 85, pp. 544-550

Klasmeyer T.H., Fitzgerald A.C., Fabellar A.C., Ballam J.M., Cady R.A., Vicini J.L. (2009) "Effect of recombinant bovine somatotropin and a shortened or no dry period on the performance of lactating dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 92, pp. 5503-5511

Kobayashi Y., Boyd C.K., McCormack B.L., Lucy M.C. (2002) "Reduced insulin-like growth factor 1 after acute feed restriction in lactating dairy cows is independent" *Journal of Dairy Science*, vol. 85, pp. 748-754

Kokkonen T., Taponen J., Alasuutari S., Nousiainen M., Anttila T., Syrjälä-Qvist L., et al. (2002) "Plasma leptin in transition dairy cows. Effects of body fatness, ambient temperature and dietary factors" *Proceedings of the British Society of Animal Science Annual Meeting*, pp. 92

Kommisrud E., Osteras O., Vatn T. (2005) "Blood selenium associated with health and fertility in norwegian dairy herds" *ACTA Veterinaria Scandinavica*, vol. 46, pp. 229-240

Konig S., Chang Y.M., Borstel U.U., Gianola D., Simianer H. (2008) "Genetic and phenotypic relationships among milk urea nitrogen, fertility and milk yield in holstein cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 91, pp. 4372-4382

Koningsson K., Gustafsson H., Gunnarsson A., Kindahl H. (2001) "Clinical and bacteriological aspects on the use of oxytetracycline and flunixin in primiparous cows with induced retained placenta and post partal endometritis" *Reproductive Domestic Animal*, vol. 36, pp. 247-256

Krizova L., Watzkova J., Trinacty J., Richter M., Buchta M. (2011) "Rumen degradability and whole tract digestibility of flavonolignans from milk thistle (*silybum marianum*) fruit expeller in dairy cows" *Czech Republic Journal of Animal Science*, vol. 56, pp. 269-278

Kuhn M.T., Hutchison J.L., Norman H.D. (2005) "Minimum days dry to maximize milk yield in subsequent lactation" *Animal Research*, vol. 54, pp. 351-367

Kuhn M.T., Hutchison J.L., Norman H.D. (2006) "Effects of length of dry period on yields of milk fat and protein, fertility and milk somatic cell score in the subsequent lactation of dairy cows" *Journal of Dairy Research*, vol. 73, pp. 154-162

Kumar H., Mahmood S. (2001) "The use of fast acting antioxidants for the reduction of cow placental retention and subsequent endometritis" *Indian Journal of Animal Science*, vol. 71, pp. 650-653

Lacetera N., Bernabucci V., Ranchi B., Nardone A. (1996) "Effects of selenium and vitamin E administration during a late stage of pregnancy on colostrum and milk production in dairy cows, and on passive immunity and growth of their offspring" *American Journal of Veterinary Research*, vol. 57, pp. 1776-1784

Lake S.L., Scholljegerdes E.J., Atkinson R.L., Nayigihugu V., Paisley S.I., Rule D.C., Moss G.E., Robinson T.J., Hess B.W. (2005) "Body condition score at parturition and postpartum supplemental fat effects on cow and calf performance" *Journal of Animal Science*, vol. 83, pp. 2908-2917

Lammoglia M.A., Willard S.T., Hallford D.M., Randel R.D. (1997) "Effects of dietary fat on follicular development and circulating concentrations of lipids, insulin, progesterone, estradiol 17 β , 13,14-dihydro-15-ketoprostaglandin F₂, and growth hormone in estrous cyclic Brahman cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 75, pp. 1591-1600

Lamote I., Meyer E., Massart-Leen A.M., Burvenich C. (2004) "Review: sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation and involution" *Steroids*, vol. 69, pp. 145-159

Lane M., Gardner D.K. (2003) "Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse" *Biology of Reproduction*, vol. 69, pp. 1109-1117

Larson S.F., Butler W.R., Currie W.B. (1997) "Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 80, pp. 1280-1295

Laven R.A., Biggadike H.J., Allison R.D. (2002) "The effects of pasture nitrate concentration and concentrate intake after turnout on embryo growth and viability in the lactating dairy cow" *Reproduction in Domestic Animal*, vol. 37, pp. 111-115

Laven R.A., Dowuda P.M., Scaramuzzi R.J., Wathes D.C., Biggadike H.J., Peters A.R. (2004) "The effects of feeding diets high in quickly degradable nitrogen on follicular development and embryo growth in lactating holstein dairy cows" *Animal Reproduction Science*, vol. 84, pp. 41-52

Law R.A., Young F.J., Patterson D.C., Kilpatrick D.J., Wylie A.R.G., Mayne C.S. (2009) "Effect of dietary protein content on the fertility of dairy cows during early and mid lactation" *Journal of Dairy Science*, vol. 92, pp. 2737-2746

Le Blanc S.J., Duffield T.F., Leslie K.E., Bateman K.G., Tenhag J., Walton J.S., Johnson W.H. (2002) "The effect of prepartum injection of vitamin E on health in transition dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 85, pp. 1416-1426

Le Blanc S.J., Herdt T.H., Seymour W.M., Duffield T.F., Leslie K.E. (2004) "Peripartum serum vitamin E, retinol and beta-carotene in dairy cattle and their associations with disease" *Journal of Dairy Science*, vol. 87, pp. 609-619

Le Roith D., Bondy C., Yakar S., Liu J.L., Butler A. (2001) "The somatomedin hypothesis: 2001" *Endocrinology Review*, vol. 22, pp. 53-74

Leroy J.L.M.P., Vanholder T., Delage J.R., Opsomer G., Van Soom A., Bols P.E.J., Dewulf J., De Kruif A. (2004) "Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high yielding dairy cows early post-partum" *Theriogenology*, vol. 64, pp. 1131-1143

Leroy J.L.M.R., Opsomer G., Van Soom A., Goovaerts I.G.F., Bols P.E.J. (2008a) "Reduced fertility in high yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? PART 1" *Reproduction of Domestic Animal.*, vol. 43, pp. 612-622

Leroy J.L.M.R., Opsomer G., Van Soom A., Goovaerts I.G.F., Bols P.E.J. (2008b) "Reduced fertility in high yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? PART 2" *Reproduction of Domestic Animal.*, vol. 43, pp. 623-632

Leroy J.L.M.R., Van Soom A., Opsomer G., Bols P.E.J. (2008c) "The consequences of metabolic changes in high-yielding dairy cows on oocyte and embryo quality" *Animal*, vol. 2, pp. 1120-1127

Leroy J.L.M.R., Vanholder T., Mateusen B., Christophe A., Opsomer G., De Kruif A., Genicot G., Van Soom A. (2005) "Non esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on development capacity of bovine oocytes in vitro" *Reproduction*, vol. 130, pp. 485-495

Leury B.J., Baumgard L.H., Block S.S., Segole N., Ehnardt R.A., Rhoads R.P. (2003) "Effect of insulin and growth-hormone on plasma leptin in the periparturient dairy cow" *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 285, pp. 1107-1115

Liefers S.C., Veerkamp R.F., Te Pas M.F.W., Delavaud C., Chilliard Y., Van Der Lende T. (2003) "Leptin concentration in relation to energy balance, milk yield, intake, live weight and estrus in dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 86, pp. 799-807

Liu G.W., Zhang Z.G., Wang J.G., Wang Z., Xu C., Zhu X.L. (2010) "Insulin receptor gene expression in normal and diseased bovine liver" *Journal of Comparative Pathology*, vol. 143, pp. 258-261

Loeffler S.H., De Vries M.J., Schukken Y.H. (1999) "The effects of time of disease occurrence, milk yield and body condition on fertility of dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 82, pp. 2589-2604

Loffreda S., Yang S.Q., Lin H.Z., Karp C.L., Bregman M.L., Wang D.J., Klein A.S., Bulkley G.B., Bao C., Noble P.W., Lane M.D., Diehl A.M. (1998) "Leptin regulates proinflammatory immune responses" *FASEB Journal*, vol. 12, pp. 57-65

Lopes C.N., Scarpa A.B., Cappelozza B.I., Cooke R.F., Vasconcelos J.L.M. (2009) "Effects of rumen protected polyunsaturated fatty acid supplementation on reproductive performance of bos indicus beef cows" *Journal of Animal Science*, vol. 87, pp. 3935-3943

Lopez H., Satter L.D., Wiltbank M.C. (2004) "Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows" *Animal Reproduction Science*, vol. 81, pp. 209-223

Lopez-Gatius F., Yaniz J., Madriles-Helm D. (2003) "Effects of body condition score and score change on the reproductive performance of dairy cows: a meta-analysis" *Theriogenology*, vol. 59, pp. 801-812

Lottbammer K. H., Ahlswede L., Meyer H. (1976) "Untersuchungen über eine spezifische, Vitamin-A-unabhängige Wirkung des 13-carotins auf die Fertilität des Rindes" Weitere klinische Befunde und Befruchtungsergebnisse, *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.*, vol. 83, pp. 353-357 (abstract)

Lovendahl P., Ridder C., Friggens N.C. (2010) "Limits to prediction of energy balance from milk composition measures at individual cow level" *Journal of Dairy Science*, vol. 93, pp. 1998-2006

Lucy M.C. (2000) "Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle" *Journal of Dairy Science*, vol. 83, pp. 1635-1647

Lucy M.C. (2003) "Mechanism linking nutritional and reproduction in postpartum cows" *Reproduction*, vol. 61, pp. 415-427

Lucy M.C., Beck J., Staples C.R., Head H.H., De La Sota R.L., Thatcher W.W. (1992) "Follicular dynamics, plasma metabolites, hormone and insulin like growth factor 1 (IGF-1) in lactating dairy cows with positive or negative energy balance during the preovulatory period" *Reproduction and Nutritional Development*, vol. 32, pp. 331-341

Lucy M.C., Bilby C.R., Kirby C.J., Yuan W., Boyd C.K. (1999) "Role of growth hormone in the maintenance of follicles and corpora lutea" *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 54, pp. 49-59

Lucy M.C., DeLa Sota R.L., Staples C.R., Thatcher W.W. (1993) "Ovarian follicular populations in lactating dairy cows treated with recombinant somatotropin or saline and fed diets differing in fat content and energy" *Journal of Dairy Science*, vol. 76, pp. 1014-1027

Madsen T.G., Nielsen M.O., Andersen J.B., Ingvarsten K.L. (2008) "Continuous lactation in dairy cows: effect on milk production and mammary nutrient supply and extraction" *Journal of Dairy Science*, vol. 91, pp. 1791-1801

Makuza S.T., McDaniel B.T. (1996) "Effects of days dry, previous days open, and current days open on milk yields of cows in Zimbabwe and North Carolina" *Journal of Dairy Science*, vol. 79, pp. 702-709

Mallard B.A., Dekkers J.C., Ireland M.J., Leslie K.E., Sherif S., Lacey Vankampen C., Wagter L., Wilkie B.N. (1998) "Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health" *Journal of Dairy Science*, vol. 81, pp. 585-595

Mann G.E., Mann S.J., Blache D., Webb R. (2005) "Metabolic variables and plasma leptin concentrations in dairy cows exhibiting reproductive cycle abnormalities identified through milk progesterone monitoring during the post partum period" *Animal Reproduction Science*, vol. 88, pp. 191-202

Marie M., Findlay P.A., Thomas L., Adam C.L. (2001) "Daily patterns of plasma leptin in sheep: effects of photoperiod and food intake" *Journal of Endocrinology*, vol. 170, pp. 277-286

Markusfeld O., Gallon N., Ezra E. (1997) "Body condition score, health, yield and fertility in dairy cows" *Veterinary Records*, vol. 116, pp. 67-72

Mattos R., Staples C.R., Arteché A., Willbank M.C., Diaz F.J., Jenkins T.C., Thatcher W.W. (2004) "The effects of feeding fish oil on uterine secretion of PGF_{2a}, milk composition and metabolic status of periparturient holstein cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 87, pp. 921-932

Mattos R., Staples C.R., Thatcher W.W. (2000) "Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminant" *Review of Reproduction*, vol. 5, pp. 38-45

Mattos R., Staples C.R., Williams J., Amorocho A., McGuire M.A., Thatcher W.W. (2002) "Uterine, ovarian and reproduction responses of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of menhaden fish meal" *Journal of Dairy Science*, vol. 85, pp. 755-764

McCormick M.E., French D.D., Brown T.F., Cuomo C.J., Chapa A.M., Fernandez J.M., Beatty J.F., Blouin D.C. (1999) "Crude protein and rumen undegradable protein effects on reproduction and lactation performance of holstein cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 82, pp. 2697-2708

McEvoy J.D., Pollock J.M. (1994) "A preliminary study of peripheral lymphocyte function in cows with chronic endometritis" *Veterinary Records*, vol. 134, pp. 237-243

McNamara J.P. (1991) "Regulation of adipose tissue metabolism in support of lactation" *Journal of Dairy Science*, vol. 74, pp. 706-719

McShane T.M., Petersen S.L., McCrone S., Keisler D.H. (1993) "Influence of food restriction on neuropeptide-Y, proopiomelanocortin and LHRH gene expression in sheep hypothalami" *Biology of Reproduction*, vol. 49, pp. 831-838

McWilliam E.L., Barry T.N., Lopez-Villalobos N., Cameron P.N., Kemp P.D. (2005) "Effects of willow (*Salix*) versus poplar (*Populus*) supplementation on the reproductive performance of ewes grazing low quality drought pasture during mating" *Animal Feed Science and Technology*, vol. 119, pp. 69-86

Meikle A., Kulcsar M., Chilliard Y., Febel H., Delavaud C., Cavestany D., et al. (2004) "Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow" *Reproduction*, vol. 127, pp. 727-737

Melendez P., Donovan A., Hernandez J. (2000) "Milk urea nitrogen and infertility in Florida holstein cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 83, pp. 459-463

Melendez P., Donovan A., Hernandez J., Bartolome J., Risco C.A., Staples C., Thatcher W.W. (2003) "Milk, plasma and blood urea nitrogen concentration, dietary protein and fertility in dairy cattle" *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 223, pp. 628-634

Milkkola M., Mantysaari P., Tammiranta N., Peippo J., Taponen J. (2005) "Effect of dietary crude protein on embryo recovery rate and quality in superovulated heifers" *Animal Reproduction Science*, vol. 87, pp. 193-202

Miyoshi S., Pate J.L., Palmquist D.L. (2001) "Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows" *Animal Reproduction Science*, vol. 68, pp. 29-43

Moallem U., Altmark G., Lehrer H., Arieli A. (2010) "Performance of high yielding dairy cows supplemented with fat or concentrate under hot and humid climates" *Journal of Dairy Science*, vol. 93, pp. 3192-3202

Moallem U., Folman Y., Bor A., Arav A., Sklan D. (1999) "Effect of calcium soaps of fatty acids and administration of somatotropin on milk production, preovulatory follicular development and plasma and follicular fluid lipid composition in high yielding dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 82, pp. 2358-2368

Moallem U., Katz M., Arieli A., Lehrer H. (2007) "Effects of peripartum propylene glycol or fats differing in fatty acid profile on feed intake, production and plams ametabolites in dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 90, pp. 3846-3856

Moeini M.M., Karami H., Mikaeili E. (2009) "Effect of selenium and vitamin E supplementation during the late pregnancy on reproductive indices and milk production in heifers" *Animal REPRODUCTION Science*, vol. 114, pp. 109-114

Mohammed H.O., White M.E., Guard C.L., Smith M.C., Mechor G.D., Booker C.W., Warnick L.D., Dascanio J.J., Kenney D.G. (1991) "A case-control study of the association between blood selenium and cystic ovaries in lactating dairy cattle" *Journal of Dairy Science*, vol. 74, pp. 2180-2185

Mohammed S.M., Ebrahimi A., Gharhy M., Bohonar A.R. (2009) "Study on the effect of dry period length on the reproductive indexed of holstein cows after parturition" *Veterinary Journal of Islamic, Azad. University*, vol. 5, pp. 35-40

Monget P., Fabre S., Mulsant P., Lecerf F., Elsen J.M., Mazerbourg S. (2002) "Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animal" *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 23, pp. 139-154

Monniaux D., Pisselet C. (1992) "Control of proliferation and differentiation of ovine granulosa cells by insulin like growth factor 1 and follicle stimulating hormone" *Biology of Reproduction*, vol. 46, pp. 109-119

Moore C.E., Kay J.K., Collier R.J., Van Baale M.J., Baumgard L.H. (2005) "Effect of supplemental conjugated linoleic acids on heat styressed brown swiss and holstein cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 88, pp. 1732-1740

Moore K.M., Barry T.N., Cameron P.N., Lopez-Villalobos N., Cameron D.J. (2003) "Willow (*Salix* sp.) as a supplement for grazing cattle under drought conditions" *Animal Feed Science and Technologies*, vol. 104, pp. 1-11

Morrison C.D., Daniel J.A., Holmberg E.J., Djiane J., Raver N., Gertler A., Keisler D.H. (2001) "Central infusion of leptin into well-fed and undernourished ewe lambs: effects of feed intake and serum concentration of growth hormone and luteinizing hormone" *Journal of Endocrinology*, vol. 168, pp. 317-324

Morrow D.A., Thomas J.W., Marteniuk J.V., Stowe H.D. (1980) "Effects of vitamin E and selenium on periparturient diseases and fertility in dairy cows" *Journal of Animal Science*, vol.51, pp. 382-388

Mosenfechtel S., Eigenmann U.J., Wanner M., Rusch P. (2000) "Back fat thickness and fertility in brown swiss cows" *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, vol. 142, pp. 679-689

Mueller F.J., Miller J.K., Ramsey N., DeLost R.C., Madsen F.C. (1989) "Effects of vitamin E and excess iron on placental retention and subsequent milk yield in dairy cow" *Journal of Animal Science*, vol. 67, pp. 564-570

Mueller W.M., Gregoire F.M., Stanhope K.L., Mobbs C.V., Mizuno T.M., Warden C.H., Stern J.S., Havel P.J. (1998) "Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes" *Endocrinology*, vol. 139, pp. 551-558

Mustacich D., Powis G. (2000) "Thioredoxin reductase" *Boichemistry Journal*, vol. 346, pp. 1-8

Ndiweni N., Finch J.M. (1996) "Effects of in vitro supplementation with a-tocopherol and selenium on bovine neutrophil function: implications for resistance to mastitis" *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol 47, pp. 67-78

Nourozi M., Moussavi A.H., Abazari M., Zadeh M.R. (2010) "Milk urea nitrogen and fertility in dairy farms" *Journal of Animal and Veterinary Advance*, vol. 9, pp. 1519-1525

Ocon O.M., Hansen P.J. (2003) "Distruption of bovine oocytes and preimplantation embryos by urea and acidic pH" *Journal of Dairy Science*, vol. 86, pp. 1194-1200

Odens L.J., Burgos R., Innocenti M., VanBaale M.J., Baumgard L.H. (2007) "Effects of varying doses of supplemental conjugated linoleic acid on production and energetic variables during the transition period" *Journal of Dairy Science*, vol. 90, pp. 293-305

Oldick B.S., Staples C.R., Thatcher W.W., Gyawu P. (1997) "Abomasal infusion of glucose and fat - effects on digestion, production and ovarian and uterine functions of cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 80, pp. 1315-1328

Olson J.D. (1995) "The role of selenium and vitamin E in mastitis and reproduction in dairy cattle" *Cattle Practice*, vol. 3, pp. 47-49

Ordonez A., Parkinson T., Holmes C.W., Matthew C., Miller R.D., Lopez-Villalobos N., Burke J., Brookes I. (2007) "Spring application of urea fertilizer does not reduce the reproductive performance of dairy cows" *New Zealand Veterinary Journal*, vol. 28, pp. 348-356

O'Shea R.D., Gundlach A.L. (1991) "Prepro-neuropeptide Y messenger ribonucleic acid in the hypothalamic arcuate nucleus of the rat is increased by food deprivation or dehydration" *Journal of Neuroendocrinology*, vol. 3, pp. 11-17

Overton T.R., Drackley J.K., Ottemann-Abbamonte C.J., Beaulieu A.D., Emmert L.S., Clark J.H. (1999) "Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increase glucose demand in ruminants" *Journal of Animal Science*, vol. 77, pp. 1940-1951

Papadopoulos S., Lonergan P., Gath V., Quinn K.M., Evans A.C., O'Callaghan D., Boland M.P. (2001) "Effect of diet quantity and urea supplementation on oocyte and embryo quality in sheep" *Theriogenology*, vol. 55, pp. 1059-1069

Patton J., Kenny D.A., McNamara S., Mee J.F., O'Mara F.P., Diskin M.G. (2007) "Relationship among milk production, energy balance, plasma analytes and reproduction in holstein friesian cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 90, pp. 649-658

Perfield J.W., Bernard-Santos G., Overton T.R., Bauman D.E. (2002) "Effects of dietary supplementation of rumen protected conjugated linoleic acid in dairy cows during established lactation" *Journal of Dairy Science*, vol. 85, pp. 2609-2617

Petit H.V., Dewhurst R.J., Scollan N.D., Proulx J.G., Khalid M., Haresign W., Twagiramungu H., Mann G.E. (2002) "Milk production and composition, ovarian function and prostaglandin secretion of dairy cows fed omega-3 fats" *Journal of Dairy Science*, vol. 85, pp. 889-899

Petit H.V., Germiquet C., Lebel D. (2004) "Effect of feeding whole, unprocessed sunflower seeds and flaxseed on milk production, milk composition and prostaglandin secretion in dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 87, pp. 3889-3898

Petit H.V., Twagiramungu H. (2006) "Conception rate and reproductive function of dairy cows fed different fat sources" *Theriogenology*, vol. 66, pp. 1316-1324

Pezeshki A., Mehrzad J., Ghorbani G.R., DeSpiegeleer B., Collier R.J., Burvenich C. (2008) "Consèquences du raccourcissement de la période de tarissement à 28 jours sur le rendement des vaches laitières multipares lors de la lactation subsèquente" *Canadian Journal of Animal Science*, vol. 88, pp. 449-456

Pezeshki A., Mehrzad J., Ghorbani G.R., Rahmani H.R., Collier R.J., Burvenich C. (2007) "Effects of short dry periods on performance and metabolic status in holstein dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 90, pp. 5531-5541

Pfaff D. (2005) "Hormone-driven mechanisms in the central nervous system facilitate the analysis of mammalian behaviours" *Journal of Endocrinology*, vol. 184, pp. 447-453

Pitta D.W., Barry T.N., Lopez-Villalobos N., Attwood G.T. (2009) "Effect of willow supplementation upon plasma amino acid concentration in ewes grazing drought pasture of low nutritive value" *Animal Feed Science and Technology*, vol. 148, pp. 183-191

Politis I., Hidiroglu M., Batra T.R, Gilmore J.R., Gorewit R.C., Scherf H. (1995) "Effects of vitamin E on immune function of dairy cows" American Journal of Veterinary Research, vol. 56, pp. 179-184

Politis I., Hidiroglu M., Cheli F., Baldi A. (2001) "Effects of vitamin E on urokinase plasminogen activator receptor expression by bovine neutrophils" American Journal of Veterinary Research, vol. 62, pp. 1934-1938

Politis I., Hidiroglu M., White J.H., Gilmore J.R., Williams S.N., Scherf H. (1996) "Effects of vitamin E on mammary and blood leukocyte function with emphasis on chemotaxis in periparturient dairy cows" American Journal of Veterinary Research, vol. 57, pp. 468-471

Polyak S.J., Morishima C., Lohmann V., Pal S., Lee D.Y.W., Liu Y., Graf T.N., Oberlies N.H. (2010) "Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin" Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 107, pp. 5995-5999

Ponter A.A., Parsy A., Saade M., Mialot J., Ficheux C., Duvaux-Ponter C., Grimard B. (2006) "Effect of a supplement rich in linolenic acid added to the diet of post partum dairy cows on ovarian follicle growth, and milk and plasma fatty acid compositions" Reproduction and Nutritional Development, VOL. 36, PP. 19-29

Pravettoni D., Doll K., Hummel M., Cavallone E., Re M., Belloli A.G. (2004) "Insulin resistance and abomasal motility disorders in cows detected by use of abomasoduodenal electromyography after surgical correction of left displaced abomasum" American Journal of Veterinary Research, vol. 65, pp. 1319-1324

Pryce J.E., Coffey M.P., Simm G. (2001) "The relationship between body condition score and reproductive performance" Journal of Dairy Science, vol. 84, pp. 1508-1515

Radko L., Cybulski W. (2007) "Application of silymarin in human and animal medicine" Journal of Pre-Clinical and Clinical Research, vol. 1, pp. 22-26

Rajala-Schultz P.J., Saville W.J.A., Frazer G.S., Wittum T.E. (2001) "Association between milk urea nitrogen and fertility in Ohio dairy cows" Journal of Dairy Science, vol. 84, pp. 482-489

Rastani R.R., Grummer R.R., Bertics S.J., Gumen A., Wiltbank M.C. (2005) "Reducing dry period length to simplify feeding transition cows: milk production, energy balance and metabolic status" Journal of Dairy Science, vol. 88, pp. 1004-1014

Rehak D., Rajmon R., Kubesova M., Stipkova M., Volek J., Jilek F. (2009) "Relationships between milk urea and production and fertility traits in holstein dairy herds in the Czech Republic" Czech Journal of Animal Science, vol. 54, pp. 193-200

Reist M., Erdin D., Von Euw D., Tschuemperlin K., Leuenberger H., Delavaud C., Chilliard Y., Hammon H.M., Kuenzi N., Blum J.W. (2003a) "Concentrate feeding strategy in lactating dairy cows: metabolic and endocrine changes with emphasis on leptin" Journal of Dairy Science, vol. 86, pp. 1690-1706

Reist, M., Erdin D., Von Euw D., Tschumperlin K., Delavaud C., Chilliard Y., Hammon H., Kunzi N., Blum J.W. (2001) "Concentrate feeding strategy in lactating dairy cows: metabolic and endocrine changes with emphasis on leptin" 11th Intional Conference of Production Diseases in Farm Animal.

Reist, M., Erdin, D.K., Von Euw, D., Tschumperlin, K.M., Leuenberger H., Hammon H.M., Kunzi N., Blum J.W. (2003b) "Use of threshold serum and milk ketone concentrations to identify risk for ketosis and endometritis in high-yielding dairy cows" *American Journal of Veterinary Research*, vol. 64, pp. 188-194

Reksen O., Havrevoll O., Grohn Y.T., Bolstad T., Waldmann A., Ropstad E. (2002) "Relationships among body condition score, milk constituents and postpartum luteal function in norwegian dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 85, pp. 1406-1415

Remond B., Rouel J., Pinson N., Jabet S. (1997) "An attempt to omit the dry period over three consecutive lactations in dairy cows" *Annual Zootechnique*, vol. 46, pp. 399-408

Reynolds C.K, Aikman P.C., Lupoli B., Humphries D.J. and Beever D.E. (2003) "Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation" *Journal of Dairy Science*, vol. 86, pp. 1201-1217

Rhoads M.L., Rhoads R.P., Gilbert R.O., Toole R., Butler W.R. (2006) "Detrimental effects of high plasma urea nitrogen levels on viability of embryos from lactating dairy cows" *Animal Reproduction Science*, vol. 91, pp. 1-10

Robert P.R., Kim J.W., Leury B.J., Baumgard L.H., Segole N., Frank S.J., Bauman D.E., Boisclair Y.R. (2004) "Insulin increase the abundance of the growth hormone receptor in liver and adipose tissue of periparturient dairy cows" *The Journal of Nutrition*, pp. 1020-1027

Roberts A.J., Nugent R.A., Klindt J., Jenkins T.G. (1997) "Circulating insulin like growth factor 1, insulin like growth factor binding proteins, growth hormone and resumption of estrus in postpartum dairy cows subjected to dietary energy restriction" *Journal of Animal Science*, vol. 75, pp. 1909-1917

Robinson R.S., Pushpakumara P.G.A., Cheng Z., Peters A.R., Abayasekara D.R.E., Wathes D.C. (2002) "Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows" *Reproduction*, vol. 124, pp. 119-131

Roche J.R., McDonald K.A., Burke C.R., Lee J.M., Berry D.P. (2007) "Associations among body condition score, body weight, and reproductive performance in seasonal calving dairy cattle" *Journal of Dairy Science*, vol. 90, pp. 376-391

Ruegg P.L., Milton R.L. (1995) "Body condition score of holstein cows of Prince Edward Island, Canada: relationships with yield, reproductive performance and disease" *Journal of Dairy Science*, vol. 78, pp. 552-564

Rutigliano H.M., Lima F.S., Cerri R.L.A., Greco L.F., Vilela J.M., Magalhaes V., Silvestre F.T., Thatcher W.W., Santos J.E.P. (2008) "Effects of method of presynchronization and source of selenium on uterine health and reproduction in dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 91, pp. 3323-3336

Ryan E.A., Enns L. (1988) "Role of gestational hormones in the induction of insulin-resistance" *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 67, pp. 341-347

Sakaguchi M. (2009) "Differences between body condition scores and body weight changes in postpartum dairy cows in relation to parity and reproductive indices" *Canadian Veterinary Journal*, vol. 50, pp. 649-653

Samarutel J., Waldmann A., Ling K., Jakson H., Kaart T., Leesmae A., Kart O. (2008) "Relationships between luteal activity, fertility, blood metabolites and body condition score in multiparous Estonian Holstein dairy cows under different management" *Journal of Dairy Research*, vol. 75, pp. 485-490

Sanchez-Rodriguez H.L., Vann R.C., Baravik-Munsell E., Willard S.T., Ryan P.L. (2011) "Effect of acetylsalicylic acid on vasodilatation of uterine arteries, right external iliac arterial blood flow, and pregnancy in beef cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 94, suppl. 1, pp. 254

Sangsritavong S., Combs D.K., Sartori R., Armetano L.E. (2002) "High feed intake increase liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol 17 β in dairy cattle" *Journal of Dairy Science*, vol. 85, pp. 2831-2842

Santos J.E.P., Huber J.T., Theurer C.B., Nussio C.B., Tarazon M., Fish D. (2000) "Effects of grain processing and bovine somatotropin on metabolism and ovarian activity of dairy cows during early lactation" *Journal of Dairy Science*, vol. 83, pp. 1004-1015

Sartori R., Haughian J.M., Shaver R.D., Rosa G.J.M., Wiltbank M.C. (2004) "Comparison of ovarian function and circulating steroids in oestrus cycles of Holstein heifers and lactating cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 87, pp. 905-920

Sato S., Suzuki T., Okada K. (1995) "Suppression of lymphocyte blastogenesis in cows with puerperal metritis and mastitis" *Journal of Veterinary Medicine Science*, vol. 57, pp. 373-384

Sattar A., Mirza R.H., Hussain S.M.I. (2007) "Effect of prepartum treatment of vitamin E-selenium on postpartum reproductive and productive performance of exotic cows and their calves under subtropical conditions" *Pakistan Veterinary Journal*, vol. 27, pp. 105-108

Sauerwein H., Heintges U., Hennies M., Selhorst T., Daxenberger A. (2004a) "Growth hormone induced alterations of leptin serum concentrations in dairy cows as measured by a novel enzyme immunoassay" *Livestock Production Science*, vol. 87, pp. 189-195

Sauerwein H., Heintges U., Hennies M., Selhorst T., Daxenberger A. (2004b) "Growth-hormone induced alteration of leptin serum concentration in dairy cows as measured by a novel enzyme immunoassay" *Livestock Production Science*, vol. 87, pp. 189-195

Schams D., Berisha B., Kosmann M., Amselgruber W.M. (2002) "Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy" *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 22, pp. 51-72

Schimdt A., Einspanier R., Amselgruber W., Sinowatz F., Schams D. (1994) "Expression of insuline like growth factor 1 in the bovine oviduct durinf the oestrous cycle" *Experimental Clinical Endocrinology*, vol. 102, pp. 364-369

Schingoethe D.J., Kirkbride C.A., Palmer I.S., Owens M.J., Tucker W.L. (1982) "Response of cows consuming adequate selenium to vitamin E and selenium supplementation prepartum" *Journal of Dairy Science*, vol.65, pp. 2338-2344

Schweigert F.J., Zucker H. (1988) "Concentration of vitamin A, beta-carotene and vitamin E in individual bovine follicles of different quality" *Journal fo Reproduction and Fertility*, vol. 82, pp. 575-579

Segerson E.C., Riviere G., Bullock T.R., Thimaya S., Ganapathy S.N. (1980) "Uterine contractions and electrical activity in ewes treated with selenium and vitamin E" *Biology of Reproduction*, vol. 23, pp. 1020-1026

Segerson E.C., Riviere G., Dalton H.L., Whitacre M.D. (1981) "Retained placenta of Holstein cows treated with selenium and vitamin E" *Journal of Dairy Science*, vol. 64, pp. 1833-1838

Seifi H.A., Farzaneh N., Mohri M. (2005) "Relationship between fertility, serum calcium and inorganic phosphorus in dairy cows" *Iranian Journal of Veterinary Research*, vol. 6, pp. 12-16

Shigemoto B.S., Stanley R.W., Olbrich S.E. (1980) "The effect of selenium and/or vitamin E on the incidence of retained placenta in Hawaii's dairy cows" *Journal of Animal Science*, vol. 31, pp. 280-287

Shin S., Jo C. (1987) "Effects of selenium-vitamin E administration and serum mineral levels on incidence of retained fetal membranes in dairy cows" *Korean Journal of Veterinary Research*, vol. 27, pp. 117-126.

Shrestha H.K., Nakao T., Suzuki T., Akita M., Higaki T. (2005) "Relationship between body condition score, body weight and some nutritional parameters in plasma and resumption of ovarian cyclicity postpartum during pre-service period in high producing dairy cows in a subtropical region of Japan" *Theriogenology*, vol. 64, pp. 855-866

Silvia W.J., Hatler T.B., Nugent A.M., Laranja de Fonseca L.F. (2002) "Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis" *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 23, pp. 166-167

Simpson R.B., Chase C.C., Spicer L.J., Carroll J.A., Hammond A.C., Welsh T.H. (1997) "Effect of exogenous estradiol on plasma concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor binding protein activity and metabolites in ovariectomized Angus and Brahman cows" *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 14, pp. 367-380

Sinclair K.D., Kuran M., Gebbie F.E., Webb R., McEvoy T.G. (2000b) "Nitrogen metabolism and fertility in cattle: Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen" *Journal of Animal Science*, vol. 78, pp. 2670-2680

Sinclair K.D., Sinclair L.A., Robinson J.J. (2000a) "Nitrogen metabolism and fertility in cattle: Adaptive changes in intake and metabolism to diet differing in their rate of energy and nitrogen release in the rumen" *Journal of Animal Science*, vol. 78, pp. 2659-2669

Sklan D., Moallem U., Folman Y. (1991) "Effect of feeding calcium soap of fatty acids on production and reproductive responses in high producing lactating cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 74, pp. 510-517

Sklan D., Tinsky M. (1993) "Production and reproduction responses by dairy cows fed varying undegradable protein coated with rumen bypass" *Journal of Dairy Science*, vol. 76, pp. 216-223

Smith K.L., Butler W.R., Overton T.R. (2009) "Effects of prepartum 2,4-thiazolidinedione on metabolism and performance in transition dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 92, pp. 3623-3633

Smith K.L., Hogan J.S., Weiss W.P. (1997) "Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality" *Journal of Animal Science*, vol. 75, pp. 1659-1665

Soleimani A., Moussavi A.H., Mesgaran M.D., Golian A. (2010) "Effects of dry period length on milk production and composition, blood metabolites and complete blood count in subsequent lactation of holstein dairy cows" *World Academy of Science, Engineering and Technology*, vol. 68, pp. 1062-1067

Son J., Grant R.J., Larson L.L. (1996) "Effects of tallow and escape protein on lactational and reproductive performance of dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 79, pp. 822-830

Sonderman J.P., Larson L.L. (1989) "Effects of dietary protein and exogenous gonadotropin releasing hormone on circulating progesterone and performance of holstein cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 72, pp. 2179-2183

Sordillo L.M. (2005) "Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility" *Livestock Production Science*, vol. 98, pp. 89-99

Sorensen J.T., Enevoldsen C. (1991) "Effect of dry period length on milk production in subsequent lactation" *Journal of Dairy Science*, vol. 74, pp. 1277-1283

Spicer L. J., Vernon R.K., Tucker W.B., Wettemann R.P. (1993) "Effects of inert fat on energy balance, plasma concentrations of hormones and reproduction in dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 76, pp. 2664-2673

Spicer L.J., Chamberlain C.S., Francisco C.C. (2000) "Ovarian action of leptin - Effects of insuline-like growth factor 1 stimulated function of granulosa and thecal cells" *Endocrinology*, vol. 12, pp. 53-59

Spicer L.J., Francisco C.C. (1997) "The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function" *Endocrinology*, vol. 138, pp. 3374-3379

Spicer L.J., Francisco C.C. (1998) "Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian theca cell steroidogenesis" *Biology of Reproduction*, vol. 58, pp. 207-212

Spicer L.J., Tucker W.B., Adams G.D. (1990) "Insulin like growth factor 1 in dairy cows: relationship among energy balance, body condition, ovarian activity and estrus behavior" *Journal of Dairy Science*, vol. 73, pp. 929-937

Staples C. R., Thatcher W.W., Burke J.M. (1997) "Influences of dietary energy, fat, and protein on reproductive performance of lactating dairy cows" *Proceeding of IX International Conference of Production Disease of Farm Animal, Ferdinand Enke Verlag, Stoccarda (Germania)*, pp. 204-221

Staples C.R., Garcia-Bojalil C.M., Oldick B.S., Thatcher W.W., Risco C.D. (1993) "Protein intake and reproductive performance of dairy cows: a review, a suggestive mechanism, and blood and milk urea measurements" *Proceeding of 4th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, Gainesville*, pp. 37-51

Steen A., Grantor H., Tureen P.A. (1997) "Glucose and insulin responses to glucagon injection in dairy cows with ketosis and fatty liver" *Journal of Veterinary Medicine*, vol. 44, pp. 521-530

Stevenson K.R., Wathes D.C. (1996) "Insulin like growth factors and their binding proteins in the ovine oviduct during the oestrous cycle" *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 108, pp. 31-40

Stowe H.D., Thomas J.W., Johnson T., Marteniuk J.V., Morrow D.A., Ullrey D. (1988) "Responses of dairy cattle to long-term and short-term supplementation with oral selenium and vitamin E" *Journal of Dairy Science*, vol. 71, pp. 1830-1836

Strang B.D., Bertics S.J., Grummer R.R., Armetano L.E. (1998) "Effect of long-chain fatty acids on triglyceride accumulation, gluconeogenesis and ureagenesis in bovine hepatocytes" *Journal of Dairy Science*, vol. 81, pp. 728-739

Tahira J.K., Filho A.B., Morales S.R., DaSilva N.L., Sarda P.O. (1983) "Influencia da administracao de selenio e vitamina E como meio profilatico a retentcao de placenta em vacas holandesas" *Revista Set Ciencia Agricola*, vol. 5, pp. 103-107

Tallam S.K., Ealy A.D., Bryan K.A., Wu Z. (2005) "Ovarian activity and reproductive performance of dairy cows fed different amounts of phosphorus" *Journal of Dairy Science*, vol. 88, pp. 3609-3618

Tarnish T.A., Larson L.L. (1992) "Vitamin A supplementation of holsteins at high concentrations: progesterone and reproductive performance" *Journal of Dairy Science*, vol. 75, pp. 2374-2381

Taylor V.J., Cheng Z., Pushpakumara P.G., Beever D.E., Wathes D.C. (2004) "Relationship between the plasma concentrations of insulin like growth factor 1 in dairy cows and their fertility and milk yield" *Veterinary Record*, vol. 155, pp. 583-588

Tedesco D., Domeneghini C., Sciannimanico D., Tameni M., Steidler S., Galletti S. (2004a) "Silymarin, a possible hepatoprotector in dairy cows: biochemical and histological observation" *Journal of Veterinary Medicine*, vol. 51, pp. 85-89

Tedesco D., Galletti S., Rossetti S., Turini J., Varisco G. (2004b) "Silymarin administration to periparturient dairy goats: effects on milk production and quality" *Journal of Dairy Science*, vol. 87, suppl., pp. 392

Tedesco D., Tava A., Galletti S., Tameni M., Varisco G., Costa A., Steidler S. (2004c) "Effects of silymarin, a natural hepatoprotector, in periparturient dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 87, pp. 2239-2247

Thangavelu G., Colazo M.G., Ambrose D.J., Oba M., Okine E.K., Dyck M.K. (2007) "Diet enriched in unsaturated fatty acids enhance early embryonic development in lactating holstein cows" *Theriogenology*, vol. 68, pp. 949-957

Tharnish T.A., Larson L. (1992) "Vitamin A supplementation of holsteins at high concentrations: progesterone and reproductive responses" *Journal of Dairy Science*, vol. 75, pp. 2374-2381

Thatcher W.W., Bilby T.R., Bartolome J.A., Silvestre F., Staples C.R., Santos J.E.P. (2006) "Strategies for improving fertility in the modern dairy cow" *Theriogenology*, vol. 65, pp. 30-44

Thatcher W.W., Binelli M., Burke J.M., Staples C.R., Ambrose J.D., Coelho S. (1997) "Antiluteolytic signals between conceptus and endometrium" *Theriogenology*, vol. 47, pp. 131-140

Thatcher W.W., De La Sota R.L., Schmitt E.J., Diaz T.C., Badinga L., Simmen F.A., Staples C.R., Drost M. (1996) "Control and management of ovarian follicles in cattle to optimize fertility" *Reproduction and Fertility Development*, vol. 8, pp. 203-217

Thissen J.P., Ketelsledgers J.M., Underwood L.E. (1994) "Nutritional regulation of the insulin like growth factor" *Endocrinology Review*, vol. 15, pp. 80-101

Thomas F.H., Campbell B.K., Armstrong D.G., Telfer E.E. (2007) "Effects of IGF-1 bioavailability on bovine preantral follicular development in vitro" *Reproduction*, vol. 133, pp. 1121-1128

Van Knegsel A.T.M., Van Den Brand H., Kemp B. (2007b) "Effects of dietary energy source on energy balance, metabolites, and reproduction variables in dairy cows in early lactation" *Theriogenology*, vol. 68, pp. 274-280

Van Knegsel A.T.M., Van Den Brand H., Dijkstra J., Van Straalen W.M., Heetkamp M.J.W., Tamminga S., Kemp B. (2007c) "Dietary energy source in dairy cows in early lactation: energy partitioning and milk composition" *Journal of Dairy Science*, vol. 90, pp. 1467-1476

Van Knegsel A.T.M., Van Den Brand H., Dijkstra J., Van Straalen W.M., Jorritsma R., Tamminga S., Kemp B. (2007a) "Effect of glucogenic vs. lipogenic diets on energy balance, blood metabolites and reproduction in primiparous and multiparous dairy cows in early lactation" *Journal of Dairy Science*, vol. 90, pp. 3397-3409

Van Straten M., Shpigel N.Y., Friger M. (2009) "Association among patterns in daily body weight, body condition scoring and reproductive performance in high producing dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 92, pp. 4375-4385

Veenhuizen, J.J., Drackley, J.K., Richard, M.J., Sanderson, T.P., Miller, L.D. and Young, J.W. (1991) "Metabolic changes in blood and liver during development and early treatment of experimental fatty liver and ketosis in cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 74, pp. 4238-4253

Villa-Godoy A., Hughes T.L., Emery R.S., Chapin L.T., Fogwell R.L. (1988) "Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 71, pp. 1063-1072

Vojatisek B., Hronova B., Hamrik J., Jankova B. (1991) "Milk thistle (*silybum marianum*) in the feed of ketotic cows" *Journal of Veterinary Medicine Czech Republic*, vol. 36, pp. 321-330

Wade G.N., Jones J.E. (2004) "Neuroendocrinology of nutritional infertility" *The American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 287, pp. 1277-1296

Waldmann A., Reksen O., Landsverk K., Kommisrud E., Dahl E., Refslad A.O., Ropstad E. (2001) "Progesterone concentration in milk fat at first insemination - effects on non-return and repeat-breeding" *Animal Reproduction Science*, vol. 65, pp. 33-41

Walters K.A., Binnie J.P., Campbell B.K., Armstrong D.G., Telfer E.E. (2006) "The effects of IGF-1 on bovine follicle development and IGFBP-2 expression are dose and stage dependent" *Reproduction*, vol. 131, pp. 515-523

Wandij S.A., Pelletier G., Sirard M.A. (1992) "Ontogeny and cellular localization of 125I labeled insulin like growth factor 1, 125I labeled follicle stimulating hormone and 125I labeled human chorionic gonadotropin binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves" *Biology of Reproduction*, vol. 47, pp. 814-822

Wang J.Y., Owen F.G., Larson L.L. (1987) "Effect of beta-carotene supplementation on reproductive performance of lactating holstein cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 71, pp. 181-186

Wathes D.C., Fenwick M., Cheng Z., Bourne N., Llewellyn S., Morris D.G., Kenny D., Murphy J., Fitzpatrick R. (2007) "Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cows" *Theriogenology*, vol. 68, pp. 232-241

Wathes D.C., Reynolds T.S., Robinson R.S., Stevenson K.R. (1998) "Role of insulin like growth factor system in uterine function and placenta development in ruminants" *Journal of Dairy Science*, vol. 81, pp. 1778-1789

Watters R.D., Guenther J.N., Brickner A.E., Rastani R.R., Crump P.M., Clark P.W., Grummer R.R. (2008) "Effects of dry period length on milk production and health of dairy cattle" *Journal of Dairy Science*, vol. 91, pp. 2595-2603

Watters R.D., Wiltbank M.C., Guenther J.N., Brickner A.E., Rastani R.R., Fricke P.M., Grummer R.R. (2009) "Effect of dry period length on reproduction during the subsequent lactation" *Journal of Dairy Science*, vol. 92, pp. 3081-3090

Webb R., Garnsworthy P.C., Gong J.G., Armstrong D.G. (2004) "Control of follicular growth: local interaction and nutritional influence" *Journal of Animal Science*, vol. 82, suppl., pp. 63-74

Weiss W.P., Hogan J.S., Smith K.L., Hoblet K.H. (1990) "Relationship among selenium, vitamin E and mammary gland health in commercial dairy herds" *Journal of Dairy Science*, vol 73, pp. 381-390

Weiss W.P., Spears J.W. (2006) "Vitamin and trace mineral effects on immune function of ruminants" *Ruminant Physiology*, Wageningen Academic Publishers, pp. 473-496

Weiss W.P., Todhunter D.A., Hogan J.S., Smith K.L. (1990) "Effect of duration of supplementation of selenium and vitamin E on periparturient dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 73, pp. 3187-3194

Westwood C.T., Lean I.J., Garvan J.K., Wynn P. (2000) "Effects of genetic merit and varying dietary protein degradability on lactating dairy cows" *Journal of Dairy Science*, vol. 83, pp. 2926-2940

Wettemann R.P., Bossis I. (2000) "Energy intake regulates ovarian function in beef cattle" <http://www.asas.org/symposia/9899proc/0934.pdf>

Wettemann R.P., Lents C.A., Ciccioli N.H., White F.J., Rubio I. (2003) "Nutritional and suckling mediated anovulation in beef cows" *Journal of Animal Science*, vol. 81, suppl. 2, pp. 48-59

Wichtell J.J., Craigie A.L., Thompson K.G., Williams N.B. (1996) "Effects of selenium and A-tocopherol supplementation on post-partum reproductive function in dairy heifers at pasture" *Theriogenology*, vol. 46, pp. 491-502

Williams G.L., Amstalden M., Garcia M.R., Stanko R.L., Nizielski S.E., Morrison C.D., Keisler D.H. (2002) "Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle" *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 23, pp. 339-349

Wiltbank M., Lopez H., Sartori R., Sangsritavong S., Gumen A. (2006) "Change in reproduction physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism" *Theriogenology*, vol. 65, pp. 17-29

Wittwer F.G., Gattardo P., Reyes P., Opitz H. (1999) "Bulk milk urea concentration and their relationship with cow fertility in grazing dairy herds in Southern Chile" *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 38, pp. 159-166

Wu Z., Satter L.D. (2000) "Milk production and reproductive performance of dairy cows fed two concentrations of phosphorus for two years" *Journal of Dairy Science*, vol. 83, pp. 1052-1063

Wu Z., Satter L.D., Sojo R. (2000) "Milk production, reproductive performance and fecal excretion of phosphorus by dairy cows fed three amounts of phosphorus" *Journal of Dairy Science*, vol. 83, pp. 1028-1041

Wynne K., Stanley S., McGowan B., Bloom S. (2005) "Appetite control" *Journal of Endocrinology*, vol. 184, pp. 291-328

Yamada K., Nakao T., Isobe N. (2003) "Effects of body condition score in cows peripartum on the onset of postpartum ovarian cyclicity and conception rates after ovulation synchronization/ fixed-time artificial insemination" *Journal of Reproduction and Development*, vol. 49, pp. 381-388

Zachut M., Arieli A., Lehner H., Argov N., Moallem U. (2008) "Dietary unsaturated fatty acids influence preovulatory follicle characteristics in dairy cows" *Reproduction*, vol. 135, pp. 638-692

Zachut M., Dekel I., Lehrer H., Arieli A., Arav A., Livshitz L., Yakoby S., Moallem U. (2010) "Effects of dietary fats differing in n-6:n-3 ratio fed to high-yielding dairy cows on fatty acid composition of ovarian compartments, follicular status, and oocyte quality" *Journal of Dairy Science*, vol. 93, pp. 529-545

Zieba D.A., Amstalden M., Morton S., Gallino J.L., Edwards J.F., Harms P.G. (2003) "Effects of leptin on basal and GHRH-stimulated GH secretion from the bovine adenohypophysis are dependent upon nutritional status" *Journal of Endocrinology*, vol. 178, pp. 83-89