



ORDINE DEI MEDICI
VETERINARI
DELLA PROVINCIA
DI BENEVENTO



FNOVI
ConServizi

IL MEDICO VETERINARIO COME FIGURA CENTRALE PER LA BUONA GESTIONE DEGLI ALLEVAMENTI DA LATTE

PATROCINIO:



Dipartimento Medicina Veterinaria
Università "Federico II" di Napoli



Ordini dei Medici Veterinari di:
AVELLINO - CAMPOBASSO - CASERTA
ISERNIA - NAPOLI - SALERNO

COLLABORAZIONE:



*Comune di
Solopaca*



Solopaca, Sabato 3 Ottobre 2015

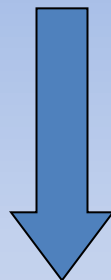
Sala Convegni del Museo Enogastronomico di Solopaca

MIGLIORAMENTO DELL'EFFICIENZA RIPRODUTTIVA MEDIANTE L'USO DI PROTOCOLLI FARMACOLOGICI INNOVATIVI

PROF.ssa ANNALISA RIZZO

Professore aggregato di Clinica Ostetrica e Ginecologia
Veterinaria – Università degli Studi di Bari «Aldo Moro»

La minore efficienza riproduttiva rappresenta uno dei problemi di maggiore rilevanza economica per gli allevatori di bovine da latte.



Il superamento dell'intervallo parto-concepimento ottimale (circa 100 gg) costa all'allevatore circa 5 € per bovina, per ogni giorno aggiuntivo

Affinchè la vacca sia in grado di concepire e portare a termine la gravidanza in tempi economicamente accettabili devono realizzarsi le seguenti condizioni:

- **Stato nutrizionale e manageriale ottimale**
- **Rapida ripresa dell'attività ciclica**
- **Rapida involuzione dell'utero**



A diagram with a central oval labeled 'ATTIVITA' RIPRODUTTIVA' and four surrounding ovals labeled 'SISTEMA IMMUNITARIO', 'SISTEMA ENDOCRINO', 'ATTIVITA' METABOLICA', and 'MANAGEMENT'. All ovals are outlined in red and overlap with the central oval.

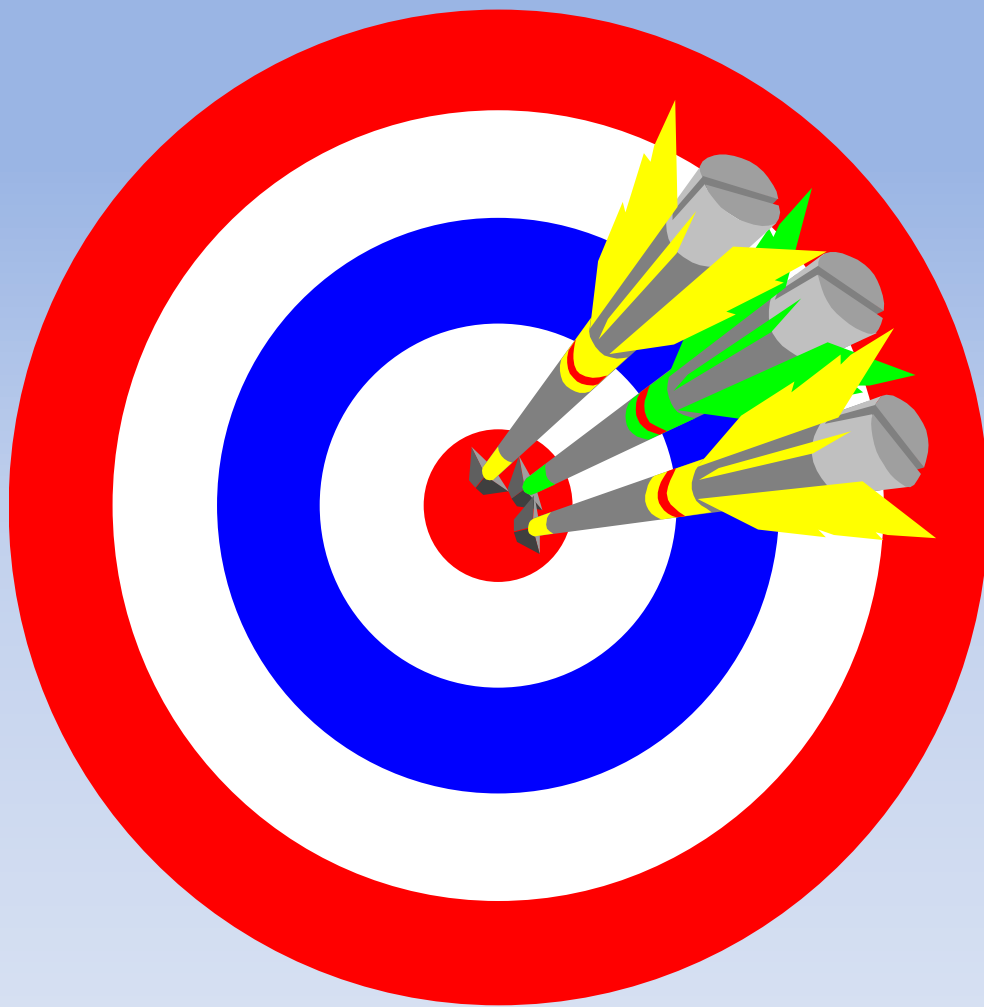
SISTEMA
IMMUNITARIO

SISTEMA
ENDOCRINO

ATTIVITA'
RIPRODUTTIVA

ATTIVITA'
METABOLICA

MANAGEMENT



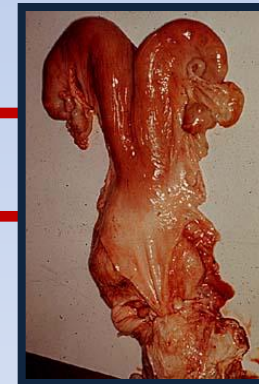
**1°: EFFETTI DELLA SOMMINISTRAZIONE DI
ANTIOSSIDANTI**



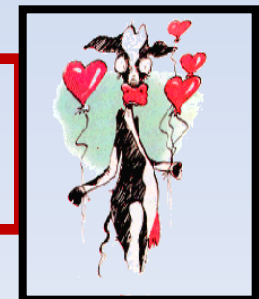
**2°: ATTIVITA', IN VIVO E IN VITRO, DELL'ACIDO
MEFEPRONICO. RISCONTI METABOLICI E RIPRODUTTIVI**



3°: TERAPIE NELL'INVOLUZIONE UTERINA



**4°: REPEAT BREEDER: TERAPIE CLASSICHE E
SPERIMENTALI**



Progetto Strategico CIP PS_019 Regione Puglia n. 2050 del 30/11/07

“Valutazione dello stress ossidativo nella bovina, influenza sulla qualità del latte: risvolti pratico-applicativi per il miglioramento delle produzioni lattiero-casearie”

Coordinatore scientifico: prof. R. L. SCIORSCI

EFFETTI DELLA SOMMINISTRAZIONE DI ANTIOSSIDANTI NELLA BOVINA DA LATTE

Partner :

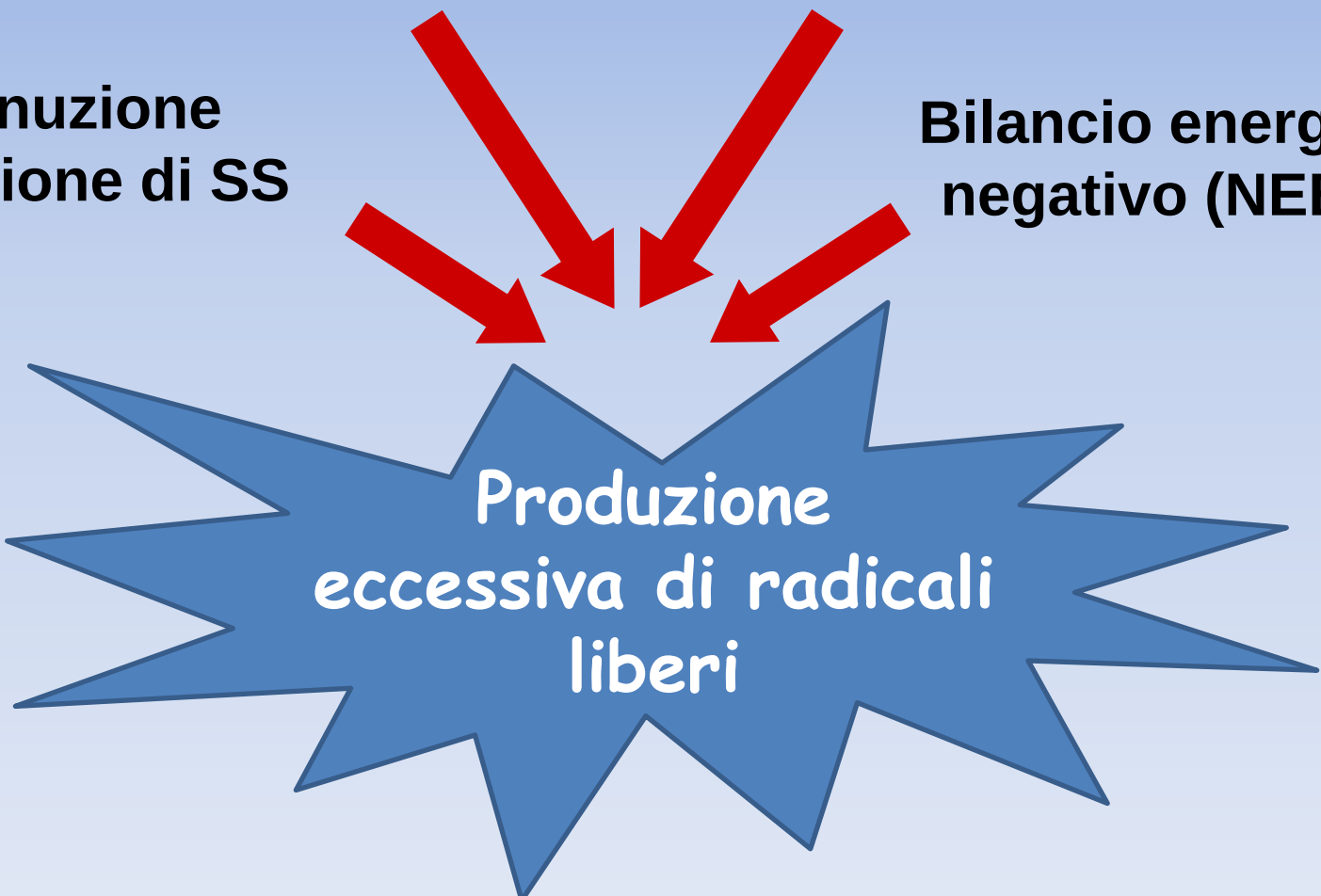


**Modificazioni del
metabolismo**

**Minore tensione di
ossigeno tissutale**

**Diminuzione
assunzione di SS**

**Bilancio energetico
negativo (NEBAL)**



**Produzione
eccessiva di radicali
liberi**

REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS)

Atomi o raggruppamenti di atomi, aventi sull'orbitale più esterno dell'ossigeno uno o più elettroni spaiati:

- anione superossido (O_2^-)
- idrossile (OH^-)
- radicale peridroxile (HO_2^-)
- ossigeno singoletto (O_2^+)



Negli organismi viventi i ROS sono generati durante la normale attività metabolica cellulare:

- Mitochondri
- Membrana plasmatica
- Metabolismo enzimatico di sostanze chimiche esogene o farmaci

(Bergendi et al., 1999)

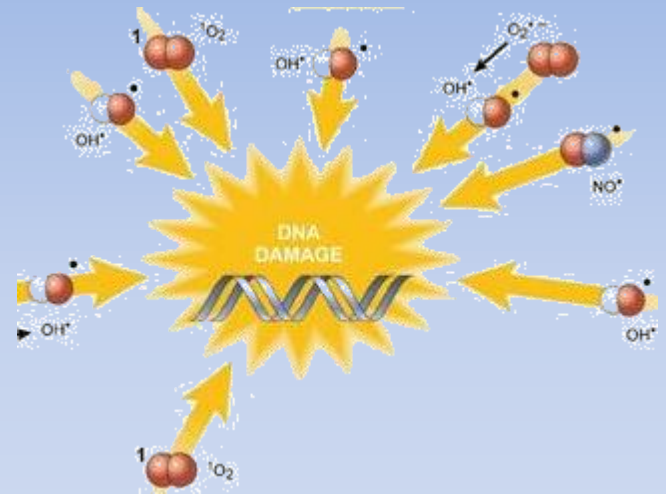
Ruolo fisiologico dei ROS

- Attivatori di alcune proteine, tra cui la tirosin-kinasi
- Difesa immunologica nei confronti dei batteri (burst respiratorio a livello di fagociti)
- Fattori pro-apoptotici

(Fleury et al., 2002)

Ruolo patologico dei ROS

- Perossidazione dei lipidi
- Ossidazione delle catene laterali dei residui aminoacidici
- Lesioni del DNA



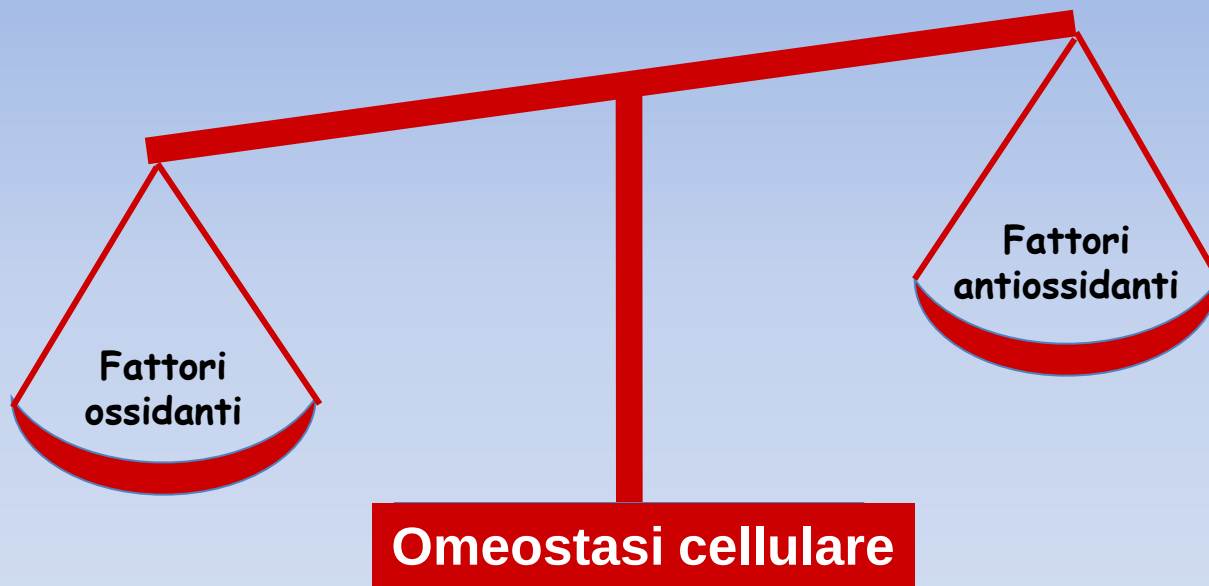
(Agarwal et al., 2003)

Antiossidanti

- Deossidano i radicali per prevenire la loro propagazione
- Sequestrano gli ioni metallici di transizione
- Riducono i perossidi
- Proteggono le biomolecole dai danni ossidativi

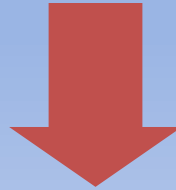
(Halliwell e Gutteridge, 1998)

STRESS OSSIDATIVO



(Janssen et al., 1993; Spitteler, 1993 Kirkinezos e Moraes, 2001)

Stress ossidativo



CAUSA e/o CONCAUSA di:

- ✓ Mastite
- ✓ Metrite
- ✓ Cisti
- ✓ Collasso puerperale
- ✓ Dislocazione dell'abomaso
- ✓ Steatosi epatica
- ✓ Chetosi



Lo stress ossidativo compromette la qualità del latte:

- la conservabilità (irrancidimento)
- le caratteristiche nutrizionali
- la lavorabilità
- la qualità dei derivati lattiero-caseari (formaggi, mozzarella, ecc.)



Stress ossidativo

Antiossidanti



Obiettivo

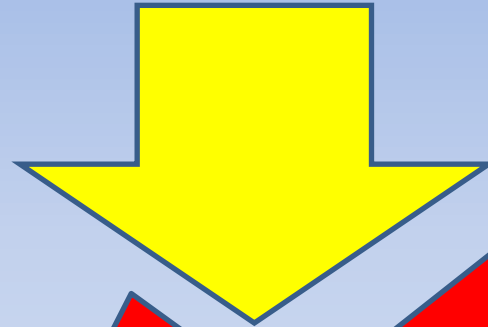
Verificare se somministrazioni parenterali di antiossidanti nelle bovine, siano in grado di migliorare le performance produttive e riproduttive



**Vitamine C, D, E,
B6, B12, Acido
Folico.**



Le vitamine esogene, di origine sintetica, addizionate al latte, sono in forma libera, non legate alle sostanze lipidiche del latte stesso,

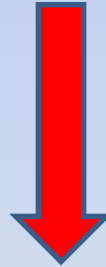


**Maggiore
degradabilità**

MATERIALI....

Somministrazione parenterale
(i.m.)

~~Somministrazione orale~~



- **Degradazione a livello ruminale**
- **Ridotto assorbimento intestinale.**

1 ml contiene:

Materiali...

- betacarotene 15 mg
- dl-alfa-tocoferolo 20 mg



- **Betacarotene** e' una molecola lipidica precursore della vitamina A;
- **dl-alfa-tocoferolo** (Vitamina E) è una vitamina liposolubile

INDICAZIONI:

- miglioramento dell'attività riproduttiva,
- effetto antiossidante
- capacità di modulare il sistema immunitario.

VIA DI SOMMINISTRAZIONE: i.m.

POSOLOGIA: 7 ml/100 kg

TEMPI DI SOSPENSIONE: 0 giorni

Materiali...

100 ml contengono:

- l-carnitina cloridrato 10 g,
- d,l-acetilmetionina 10 g,
- cianocobalamina (Vit. B12) 0,10 g.



L-carnitina può essere considerata una vitamina, con proprietà antiossidanti:

- Scavenger dei radicali liberi
- Inibizione della lipoperossidazione;
- Riduce l'attività dei metalli chelanti;

Acetilmetionina è la forma acetilata della metionina, amminoacido essenziale con spiccate capacità epatoprotettive.

Cianocobalamina (Vit. B12) è necessaria per l'utilizzazione dei grassi ed è importante nel metabolismo epatico delle proteine.

INDICAZIONI:

Materiali...

- trattamento di chetosi,
- epatodistrofie, insufficienza epatica, miocardiopatie,
- ritardo nella crescita

VIA DI SOMMINISTRAZIONE: i.m.

POSOLOGIA: 20 ml/100 kg

TEMPI DI SOSPENSIONE: 0 giorni

... E METODI



Azienda Zootechnica "Ceracchia"



Azienda Zootechnica "Cozzolicchio"



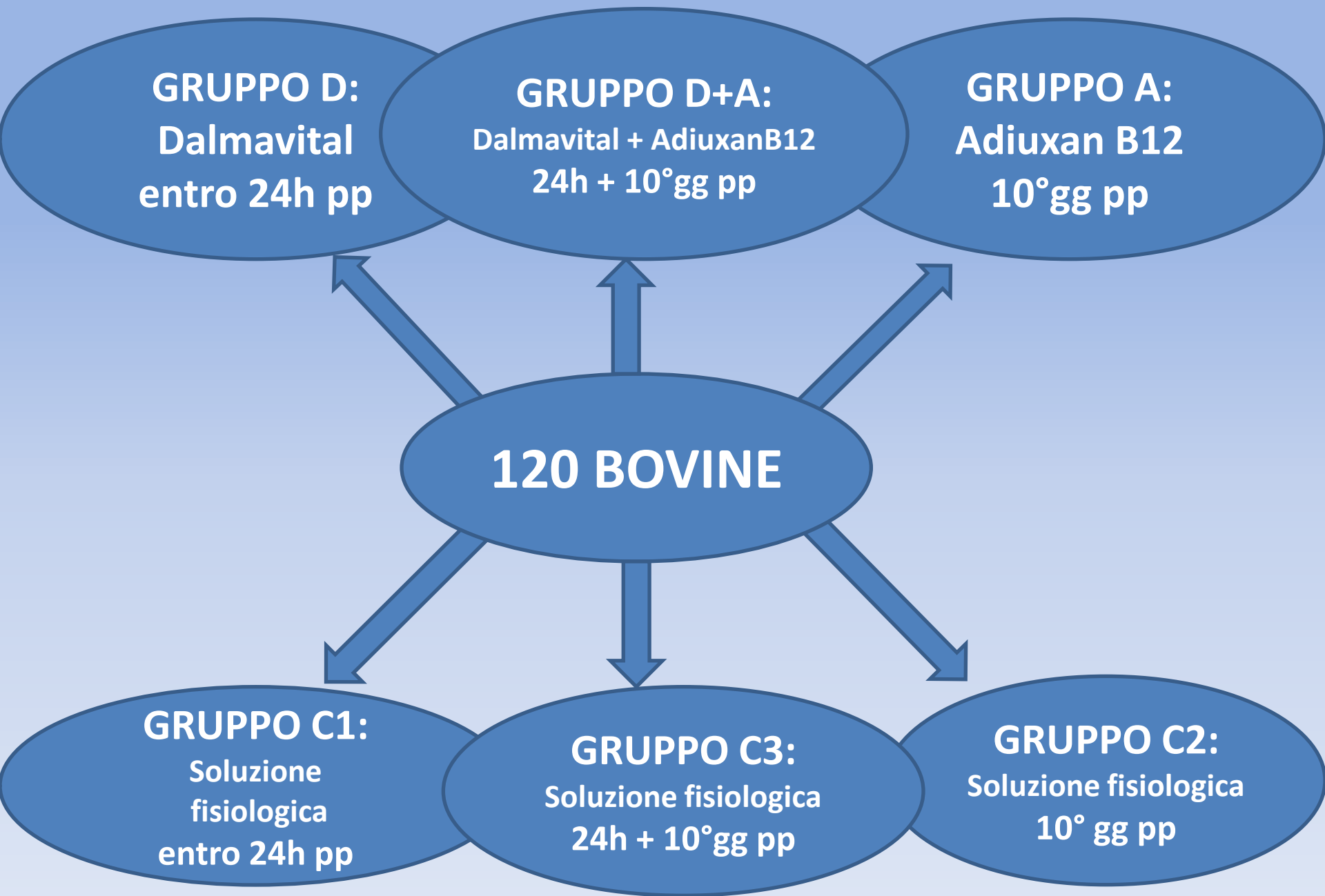
Azienda Zootechnica "Gentile"

Azienda Zootechnica "Don Felice"



Azienda Zootechnica "Don Marino"





GRUPPO C1:

Soluzione
fisiologica
entro 24h pp

GRUPPO C3:

Soluzione fisiologica
24h + 10°gg pp

GRUPPO C2:

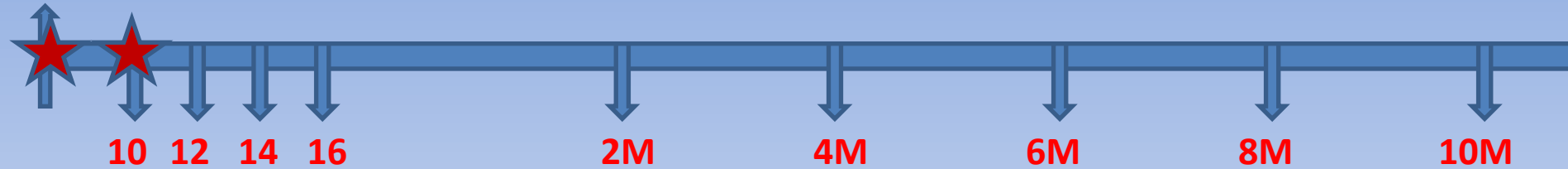
Soluzione fisiologica
10° gg pp

GRUPPO C

```
graph TD; C1([GRUPPO C1:  
Soluzione fisiologica  
entro 24h pp]) --> C([GRUPPO C]); C3([GRUPPO C3:  
Soluzione fisiologica  
24h + 10°gg pp]) --> C; C2([GRUPPO C2:  
Soluzione fisiologica  
10° gg pp]) --> C;
```

PRELIEVI EMATICI

PARTO

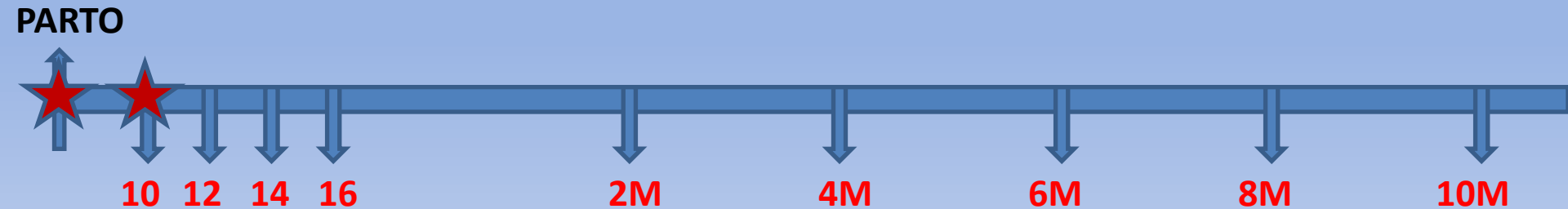


- **RADICALI LIBERI (ROS):** spettrofotometro FREE
- **VITAMINA A:** HPLC Spectrasystem AS3000
- **VITAMINA E:** HPLC Spectrasystem AS3000



: somministrazione farmaco/soluzione fisiologica

PRELIEVI DI LATTE



- **LIPOPEROSSIDI:** HPLC Spectrasystem AS3000
- **VITAMINA A:** HPLC Spectrasystem AS3000
- **VITAMINA E:** HPLC Spectrasystem AS3000

 : somministrazione farmaco/soluzione fisiologica

VALUTAZIONE STATO RIPRODUTTIVO

Indici di fertilità: parto-primo calore, parto-concepimento, tasso di gravidanza

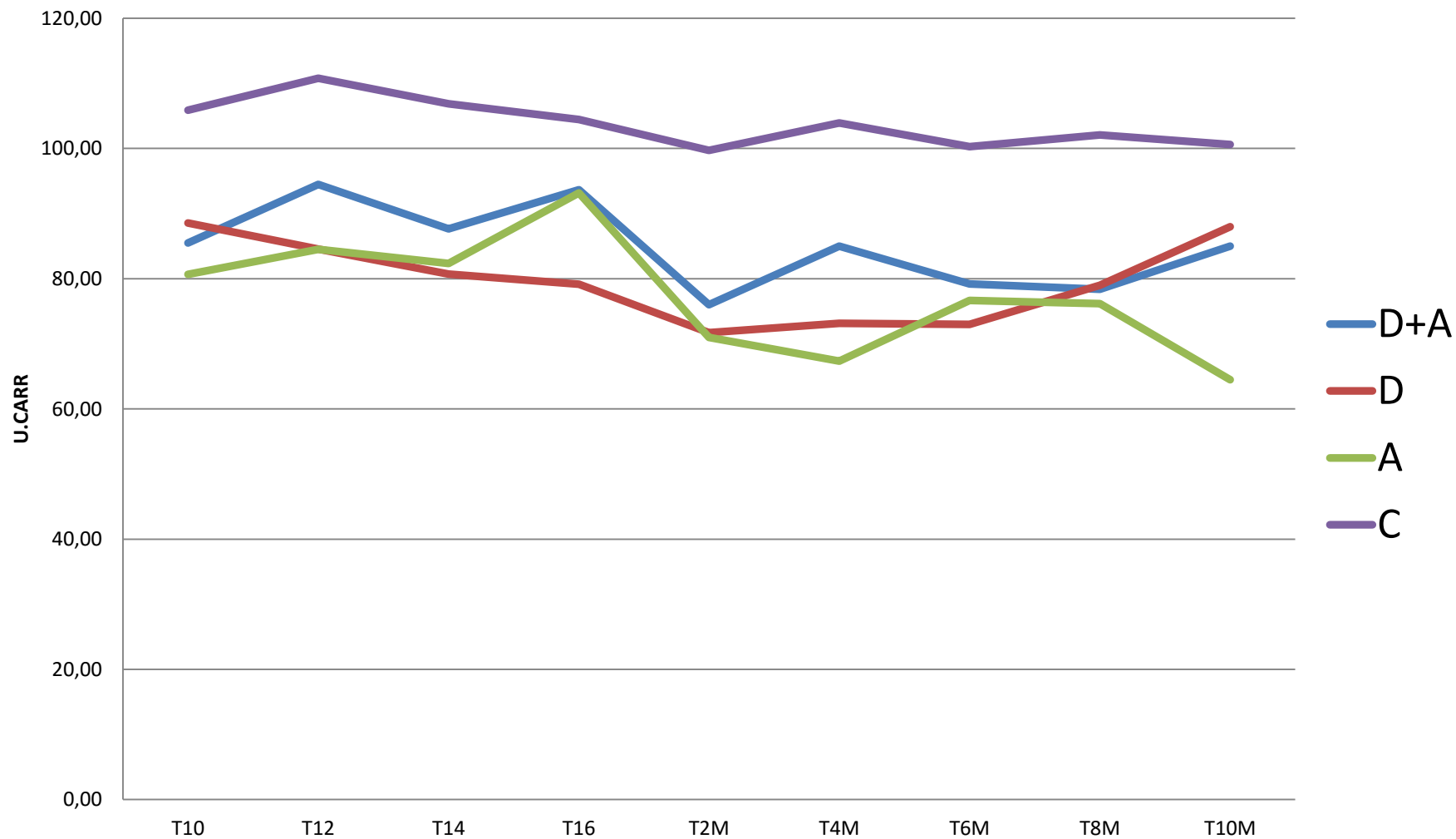
ANALISI STATISTICA

Tutti i dati sono stati analizzati mediante software SPSS 19, usando GLM per confronti intra-gruppo e one-way ANOVA per confronti inter-gruppo.

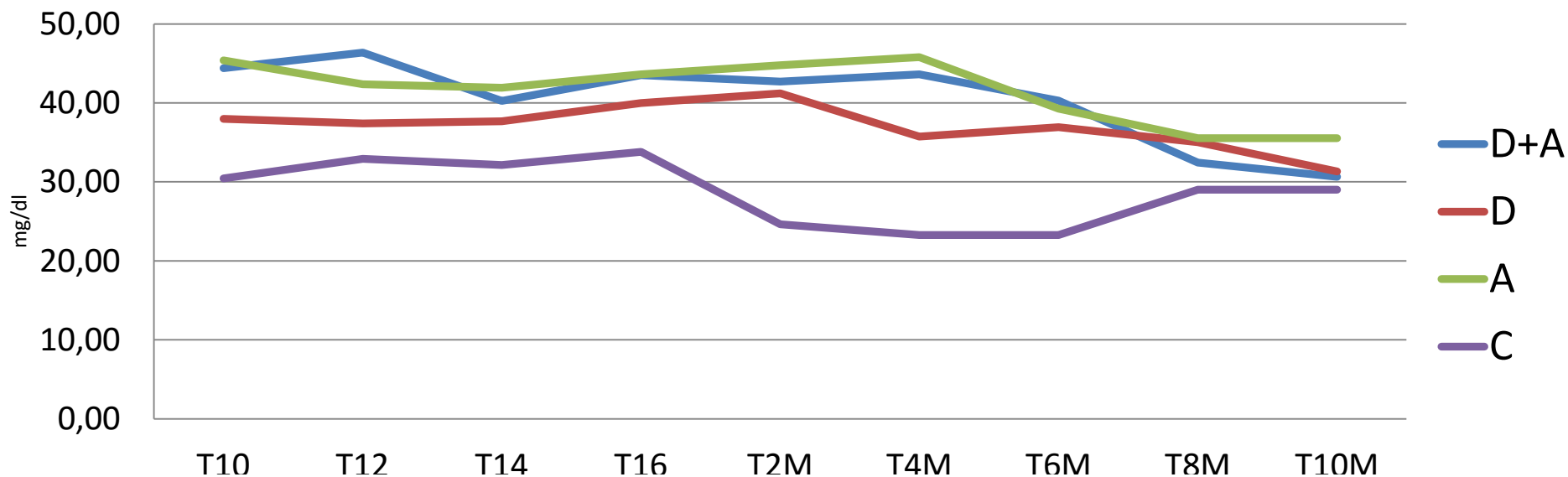
Un valore di $P < 0.05$ è stato considerato come livello di significatività.

RISULTATI

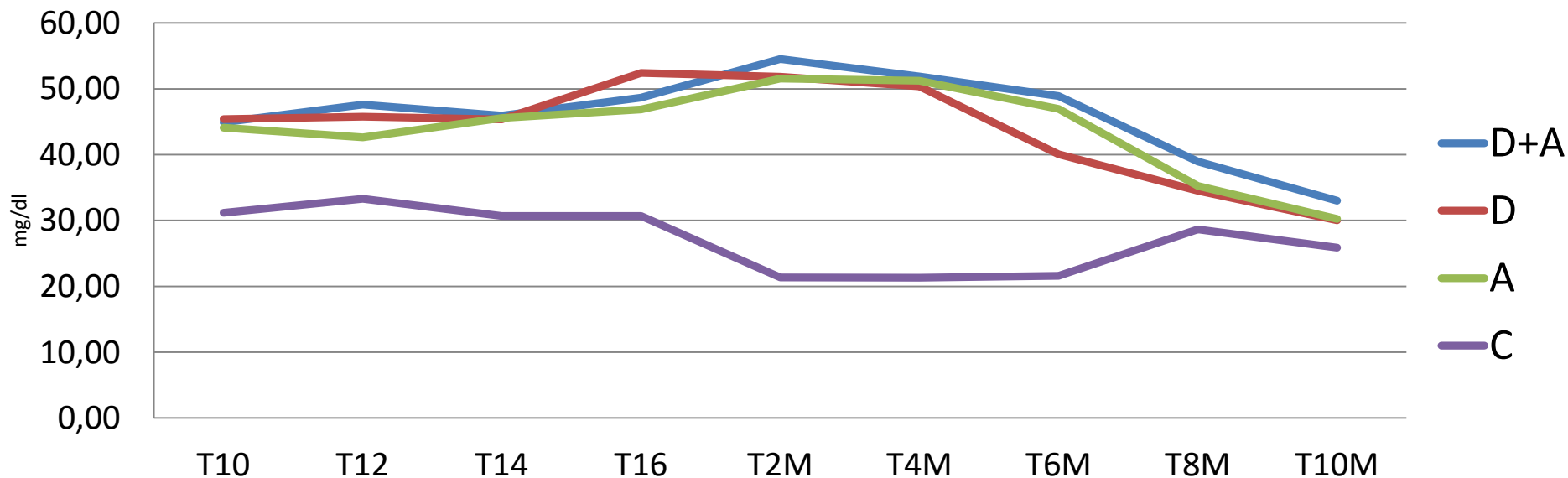
ROS SANGUE BRUNE



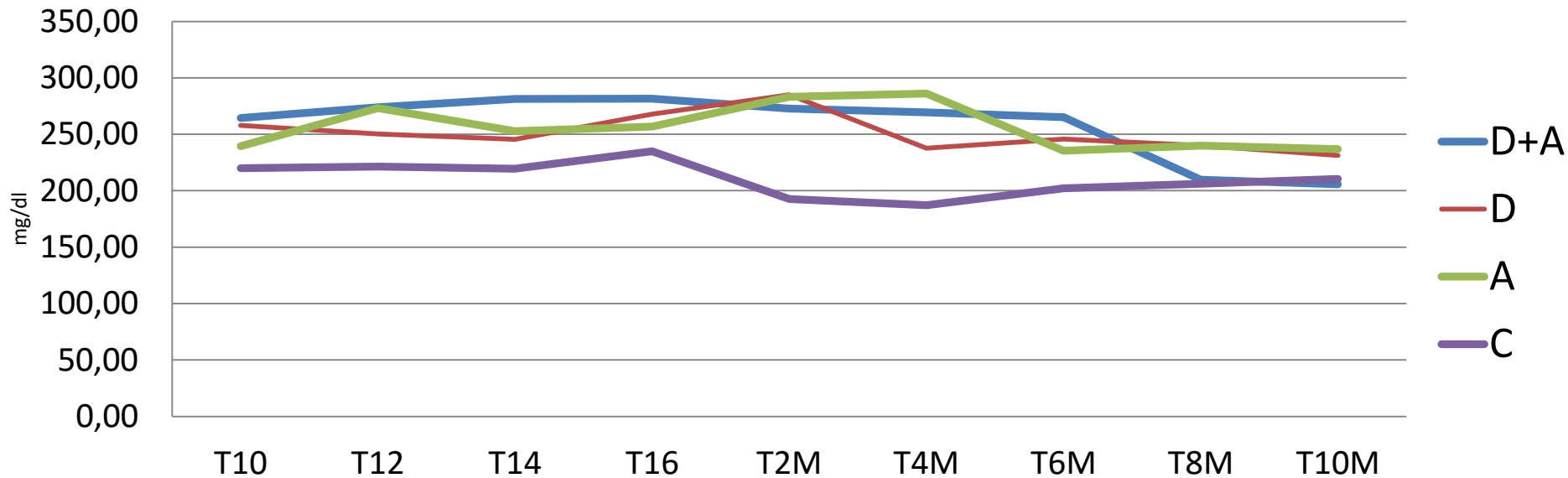
VITAMINA A SANGUE FRISONE



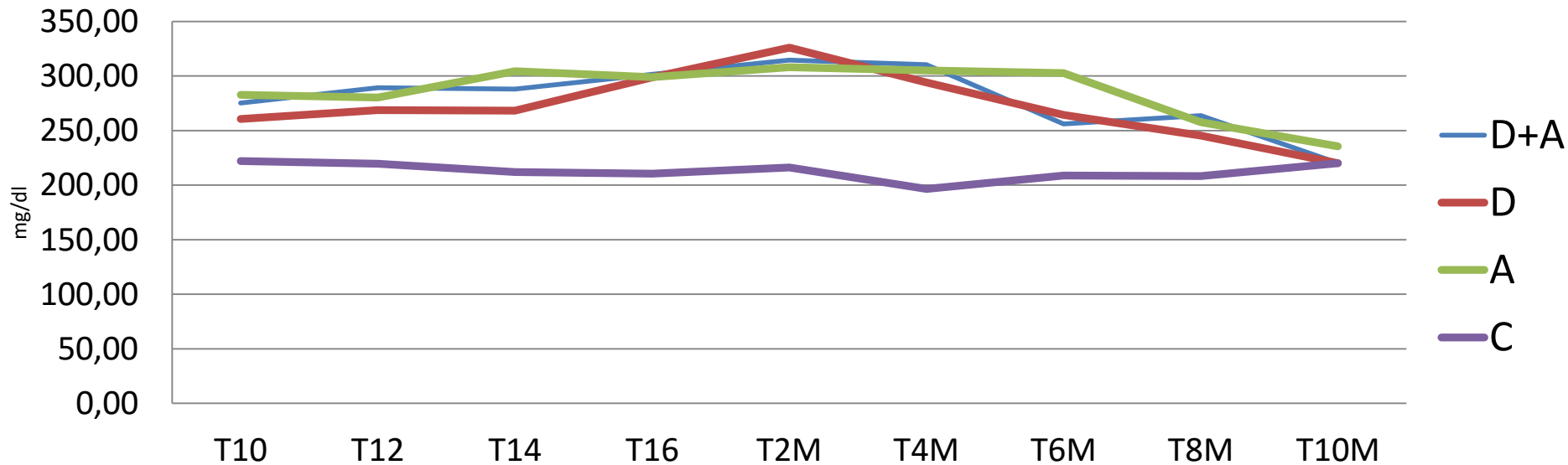
VITAMINA A SANGUE BRUNE



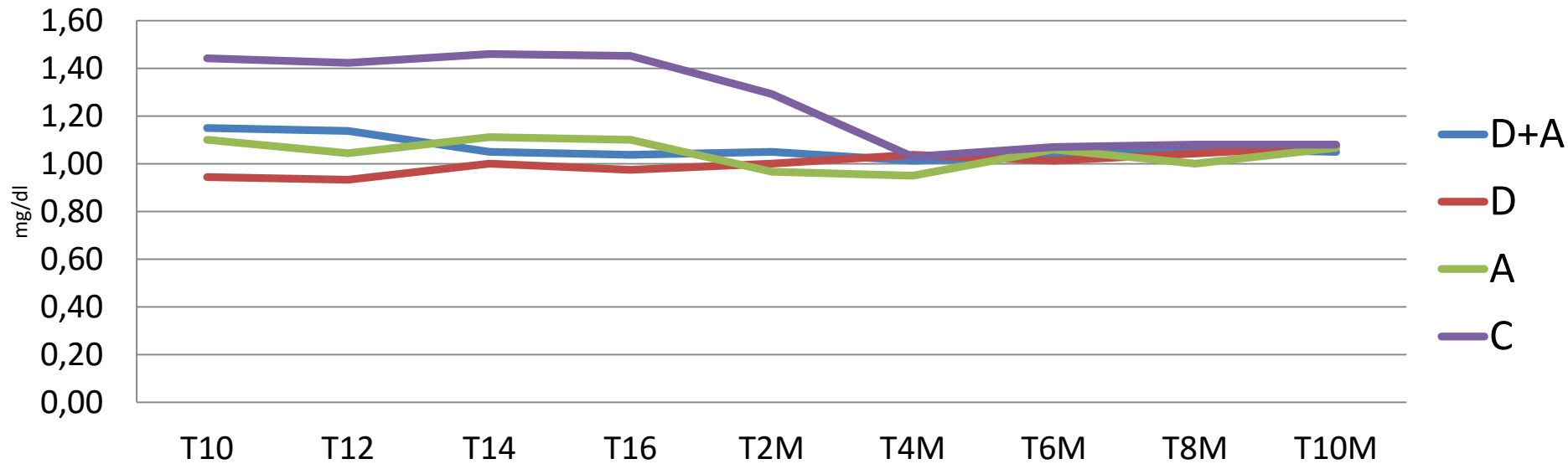
VITAMINA E SANGUE FRISONE



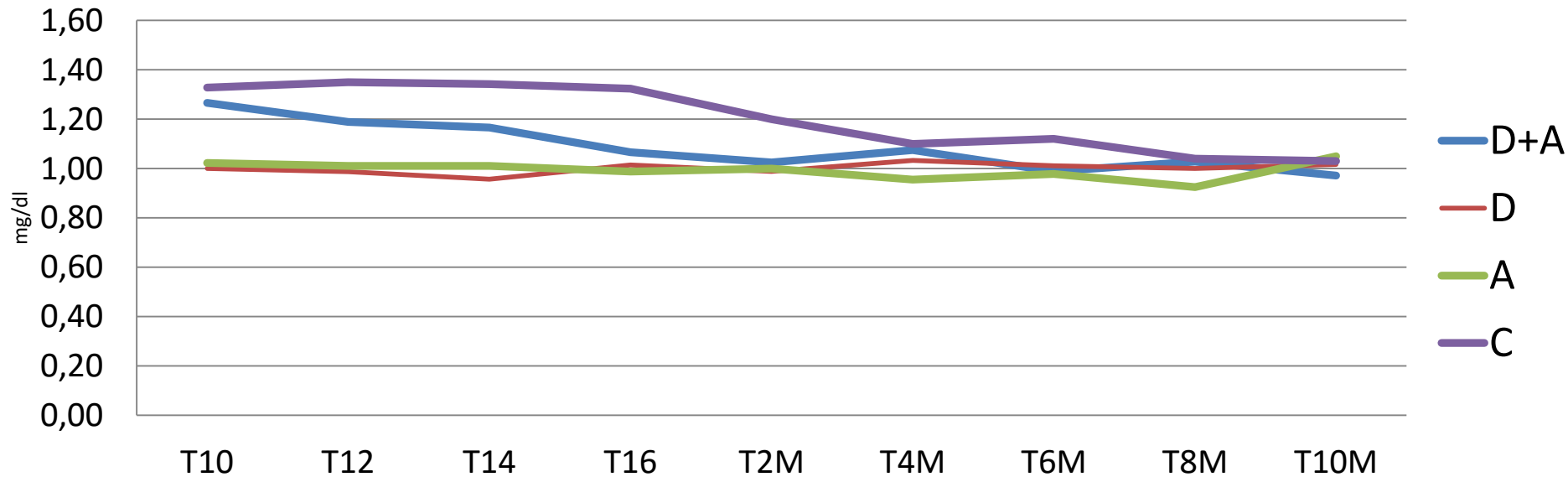
VITAMINA E SANGUE BRUNE



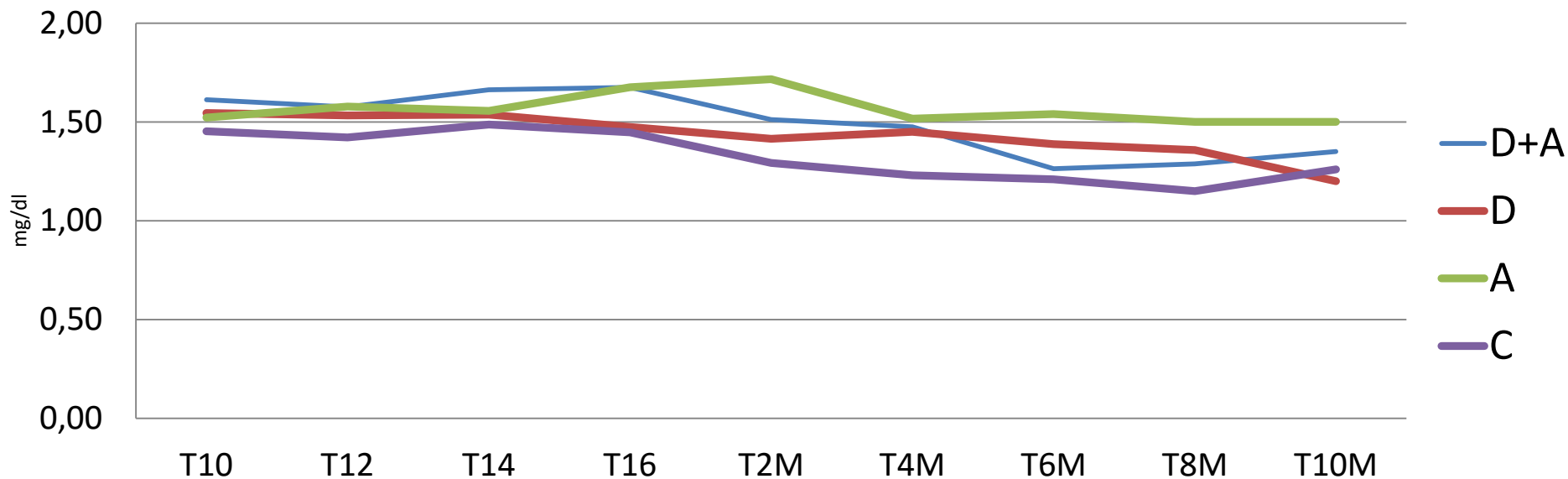
LIPOPEROSSIDI LATTE FRISONE



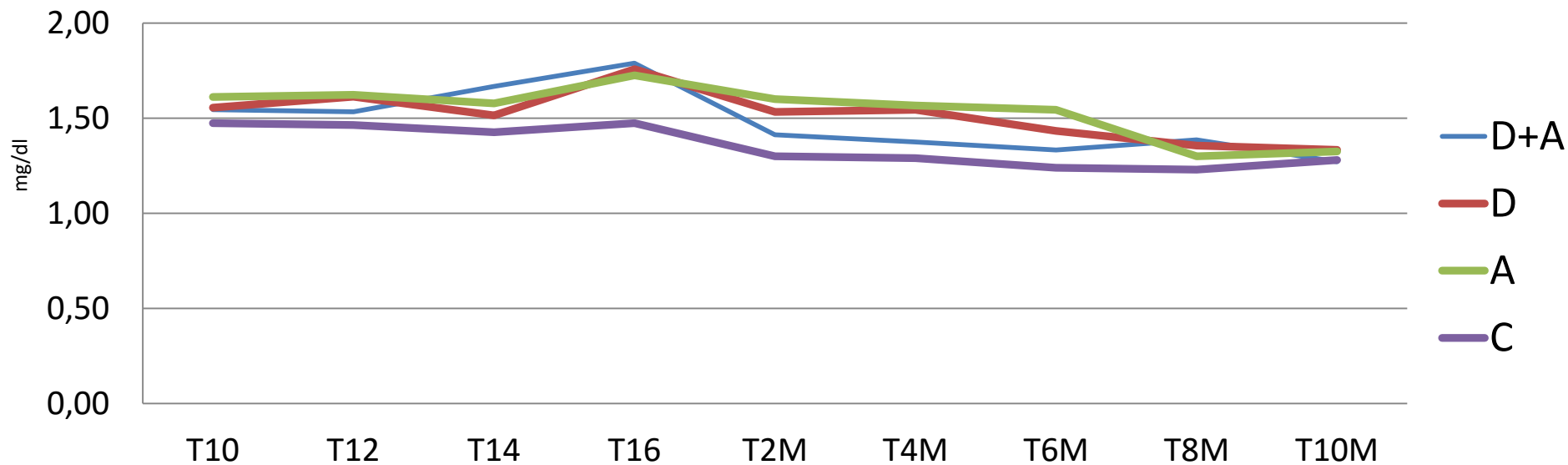
LIPOPEROSSIDI LATTE BRUNE



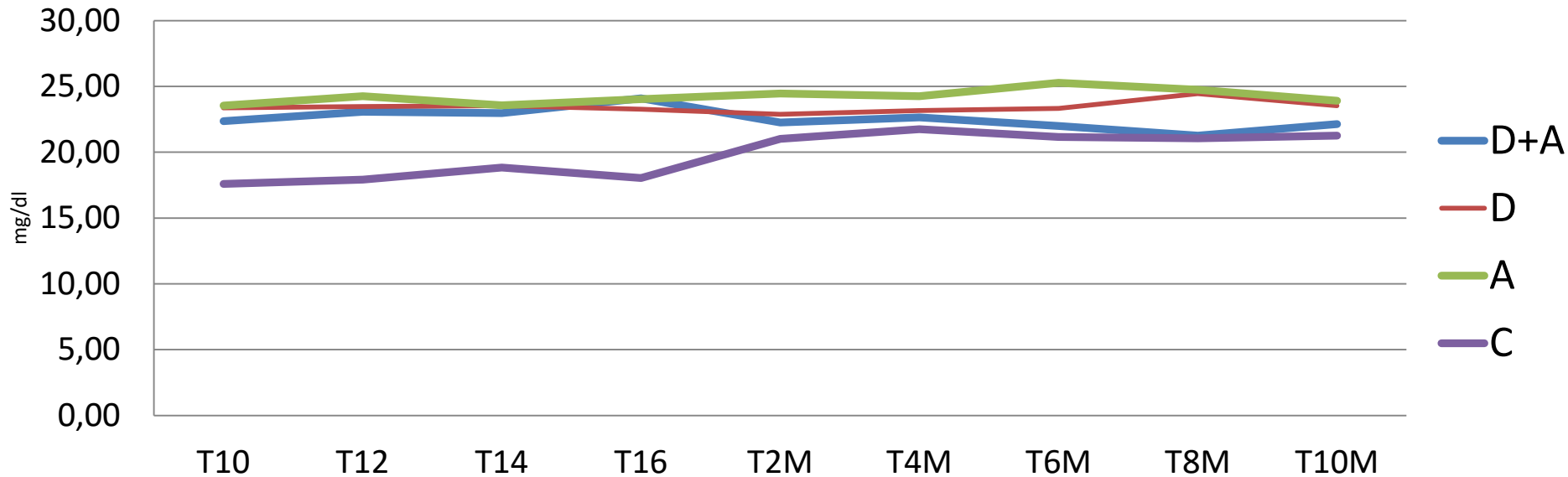
VITAMINA A LATTE FRISONE



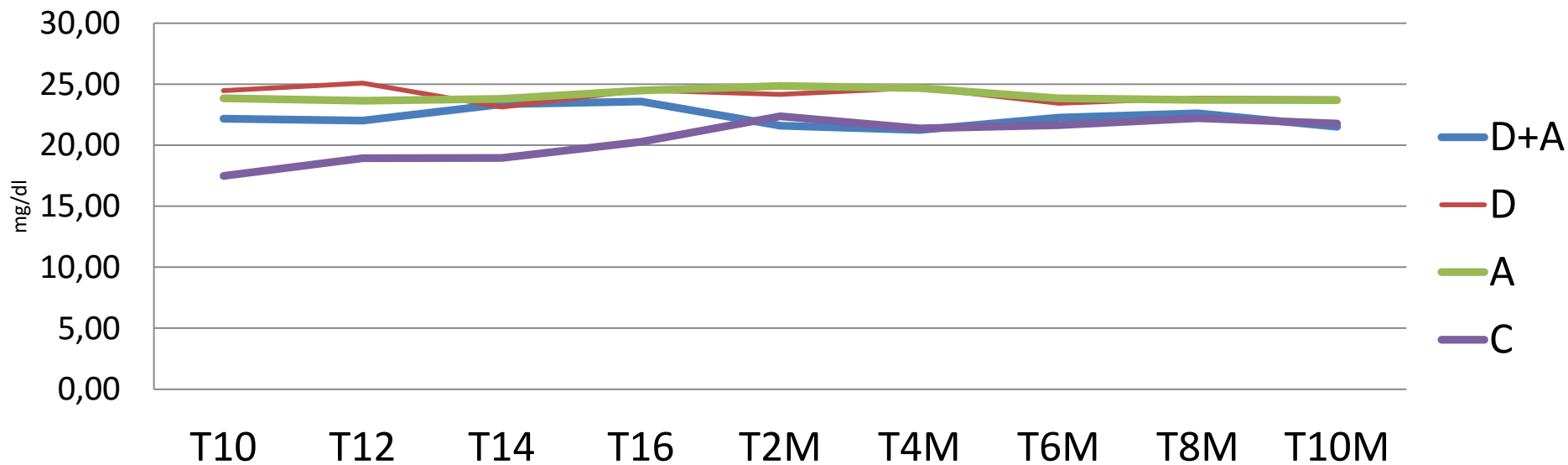
VITAMINA A LATTE BRUNE



VITAMINA E LATTE FRISONE



VITAMINA E LATTE BRUNE



	GRUPPO A		GRUPPO D		GRUPPO D+A		GRUPPO C	
	FRISONE	BRUNE	FRISONE	BRUNE	FRISONE	BRUNE	FRISONE	BRUNE
PARTO- 1°CALO RE	35±3.5	40±2.5	35.3±4	37±2.8	40±4.3	41.5±3.8	41.2±5.8	45±6.8
PARTO- CONCEPI MENTO	130±8.32	132.5±9.4	130±7.5	127±10.5	144±6.5	140.8±5.4	141±4.2	146±6.3
% GRAVIDA NZA	50	64	57	71	55	60	50	60

CONCLUSIONI

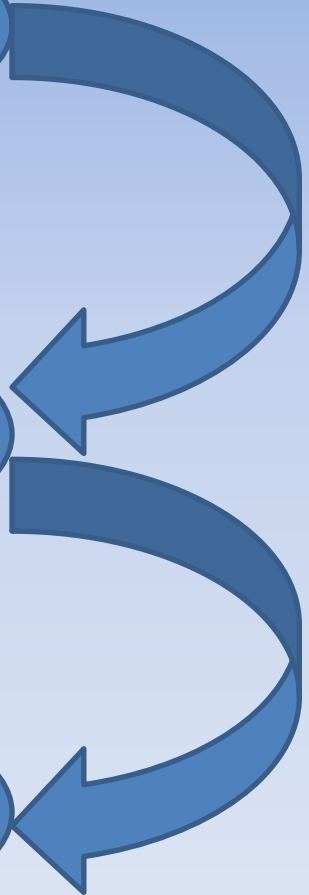
- **I trattamenti riducono le concentrazioni di ROS sia nelle Frisone che nelle Brune**
- **Singolo farmaco migliore rispetto all'associazione (evidente sia nel sangue che nel latte)**

Un adeguato supplemento di antiossidanti è consigliabile per:

Tenere sotto controllo lo stress ossidativo

Migliorare le funzioni immunitarie

Ridurre l'incidenza di patologie postpartum



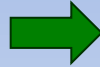
MIGLIORAMENTO DEL BENESSERE DELLA BOVINA



**L'eccessivo intake di antiossidanti
può risultare paradossalmente in un
incremento di ROS** (Salganik, 2001)

**La determinazione dello stato
ossidativo rappresenta un
essenziale esame per valutare
l'effettiva necessità della
somministrazione di antiossidanti.**

Dosaggio radicali liberi dell'ossigeno, sistema antiossidante e β -carotene



ROS e BAP

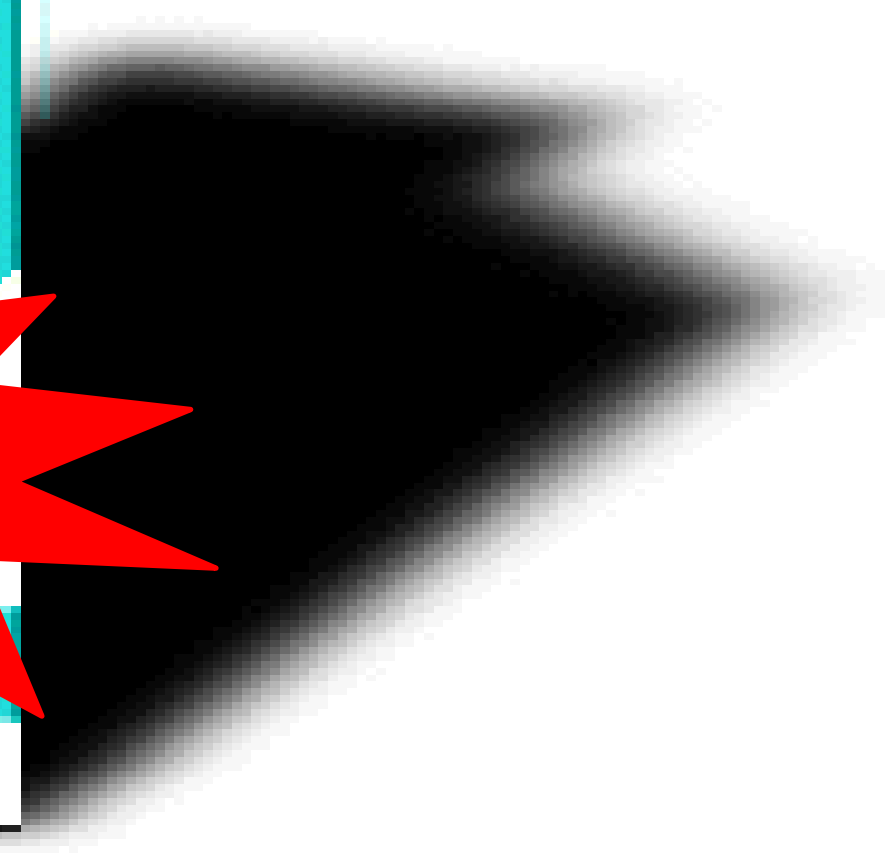


B-carotene

Livelli
deficitari: <1,5 mg/L
marginali: 1,5-3,5 mg/L
ottimali: >3,5 mg/L



**Naturalmente
arricchito di
vitamine**



Evaluation of blood and milk oxidative status during early *postpartum* of dairy cows

A. Rizzo¹, E. Ceci², M. Pantaleo¹, M. Mutinati¹, M. Spedicato¹, G. Minoia¹ and R. L. Sciorsci^{1†}

¹Department of Animal Production, Faculty of Veterinary Medicine, University of Bari, strada prov.le per Casamassima km3, 70010 Valenzano (BA), Italy;

²Department of Public Health and Zootechnic, Faculty of Veterinary Medicine, University of Bari, strada prov.le per Casamassima km3, 70010 Valenzano (BA), Italy

(Received 28 September 2011; Accepted 2 April 2012; First published online 8 June 2012)

Research in Veterinary Science 95 (2013) 1171–1174



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Research in Veterinary Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rvsc



Blood and milk oxidative status after administration of different antioxidants during early postpartum in dairy cows

A. Rizzo^a, M. Pantaleo^a, M. Mutinati^a, G. Minoia^a, C. Trisolini^a, E. Ceci^b, R.L. Sciorsci^{a,*}

^aDepartment of Emergency and Organ Transplantation, University of Bari "Aldo Moro", strada prov.le per Casamassima km3, 70010 Valenzano, BA, Italy

^bDepartment of Veterinary Medicine, University of Bari "Aldo Moro", strada prov.le per Casamassima km3, 70010 Valenzano, BA, Italy



**50 LITRI AL GIORNO...
SEMPRE IN STALLA...
MAI UNA VACANZA IN
MONTAGNA... SARA'
MICA STRESS?!?**



**Attività' in vivo ed in vitro dell'acido
mefepronico.**

**Riscontri metabolici e riproduttivi nella
bovina da latte in post-partum**



Il fegato è il crocevia di tantissime vie metaboliche:

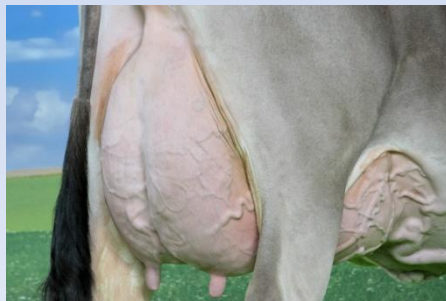
- ✓ Gluconeogenesi, Glicogenesi e Glicogenolisi
- ✓ Sintesi lipoproteine, colesterolo e fosfolipidi
- ✓ Sintesi urea, aminoacidi ed albumina
- ✓ Sintesi fattori di coagulazione e fibrinolitici
- ✓ Deaminazione e transaminazione aminoacidi
- ✓ Ossidazione acidi grassi e chetogenesi
- ✓ Produzione di bile
- ✓ Metabolismo di ormoni, vitamine e xenobiotici



**Il rapido adattamento epatico a supporto della lattazione
è centrale per un postpartum fisiologico**

Adattamenti epatici in lattazione

PARAMETRI	PRE-PARTO	POST-PARTUM	Δ
Flusso ematico epatico (L/h)	1140 L/h	2099 L/h	+ 84%
Utilizzazione ossigeno (mmol/h)	1619 mmol/h	3159 mmol/h	+ 95%
Attività metabolica (O_2/g)	4.4 mmol O_2/g	8.6 mmol O_2/g	$\sim X2$



Reynolds et al., 2000

Riduzione assunzione di sostanza secca



Bilancio energetico negativo (NEBAL)



Mobilizzazione eccessiva di acidi grassi non esterificati (NEFA)



Uptake epatico di lipidi eccede la capacità ossidante del fegato



I lipidi in eccesso sono stoccati come trigliceridi



LIPIDOSI EPATICA

NEFA circolanti



Ossidazione completa
(ATP, CO₂)

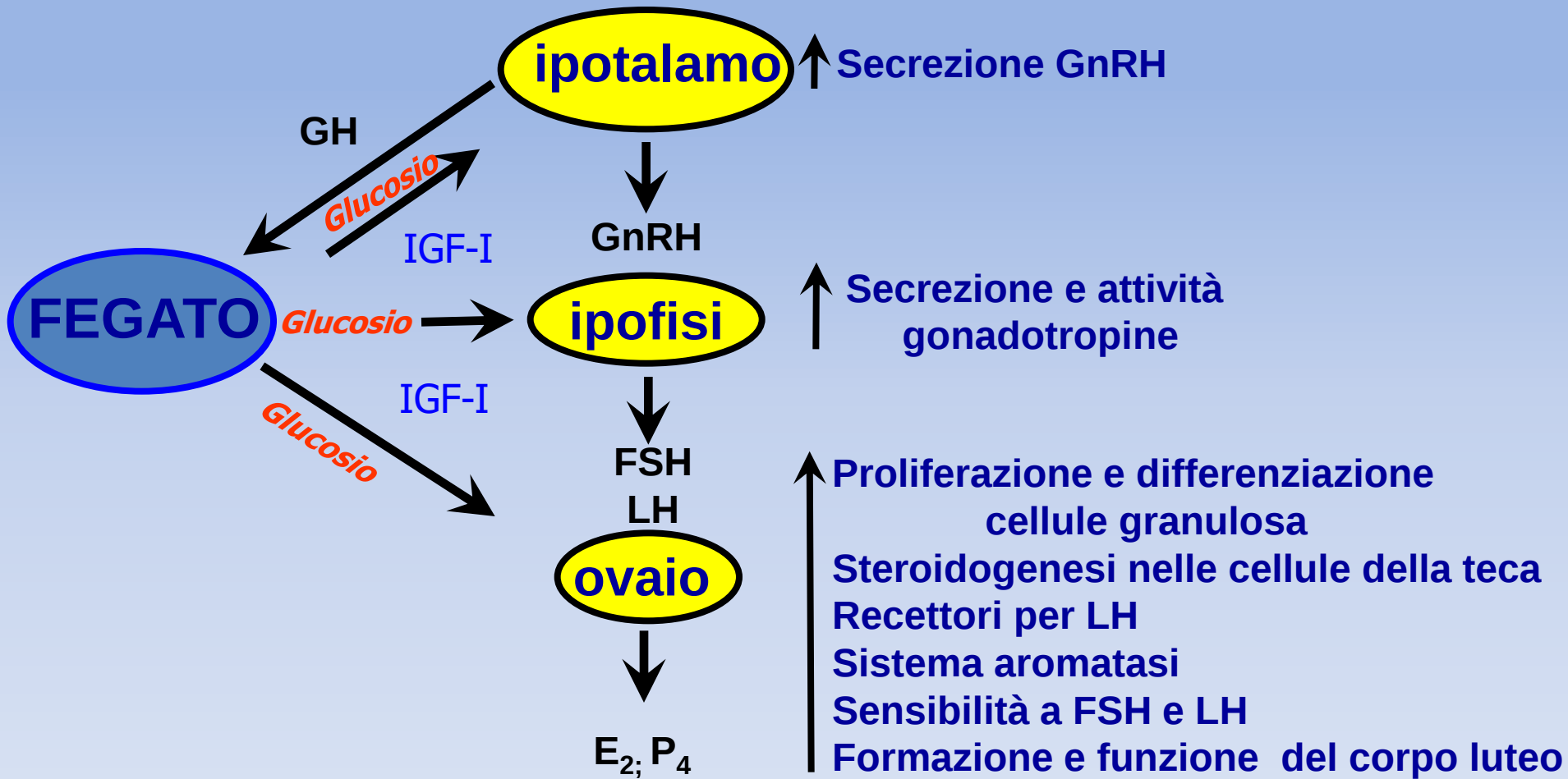
Ossidazione incompleta
(corpi chetonici)

Esterificazione
(trigliceridi)

Incorporazione nelle
Very Low Density Lipoprotein (VLDL)

Depositati nel fegato

Rapporti fra funzionalità epatica e riproduzione

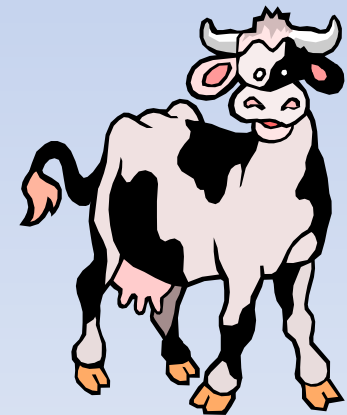


Attività ovarica ritardata:

- ✓ Diminuita e ritardata sintesi degli ormoni steroidei
- ✓ Diminuita concentrazione di Insulin-like Growth Factor (IGF)-I e insulina
- ✓ Ridotta attività degli ormoni glicoproteici per deficit dei substrati energetici a livello di recettori specifici

Minore tasso di concepimento:

- ✓ Ridotta sopravvivenza di oociti ed embrioni
- ✓ Aumento di ammoniaca e urea

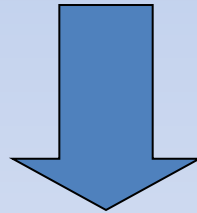


Ridotta sopravvivenza degli oociti

Alcuni studi suggeriscono che il declino nella fertilità bovina sia anche dovuto ad una minore qualità degli ovociti

Harrison et al., 1990; O'Callaghan e Boland, 1999, Horan et al. 2005

Britt (1994) ipotizzò che la crescita follicolare durante il NEBAL è inficiata da condizioni metaboliche sfavorevoli e possono contenere un *oocita incompetente*



È stato dimostrato che livelli elevati di NEFA compromettano lo sviluppo e la maturazione degli ovociti bovini

Leroy et al., 2005

Stimolare la β -ossidazione perossisomiale

**Via alternativa per ossidare gli acidi grassi in caso di
eccessiva mobilizzazione di NEFA**

Peroxisome Proliferators-Activated Receptors

Nel metabolismo lipidico sono coinvolti numerosi geni la cui azione è modulata dai recettori nucleari Peroxisome Proliferators-Activated Receptors (PPARs)

Tali recettori sono stati trovati anche nei **tessuti riproduttivi**

Ovaio

Testicolo

Utero

Prostata

Ghiandola mammaria

Ipofisi

L'isoforma recettoriale PPAR- α è abbondantemente espressa in tessuti ad elevata attività catabolica nei confronti dei lipidi:

Fegato

Reni

Cuore

Muscolo scheletrico

Tessuto adiposo bruno

Braissant et al., 1996; Wilson et al., 2000

Inoltre, tale isoforma è stata trovata anche nei macrofagi ovarici di topo, e si presuppone un suo ruolo nel **rimodellamento ciclico dell'ovaio**

Minge et al., 2006

L'espressione genica dei PPAR α è stata dimostrata nel fegato bovino (Loor et al., 2005) e nell'ovaio di ratto (Braissant et al., 1996).

Meccanismo d'azione PPARs

Recettori PPARs presenti nel nucleo, complessati a delle proteine (corepressori)



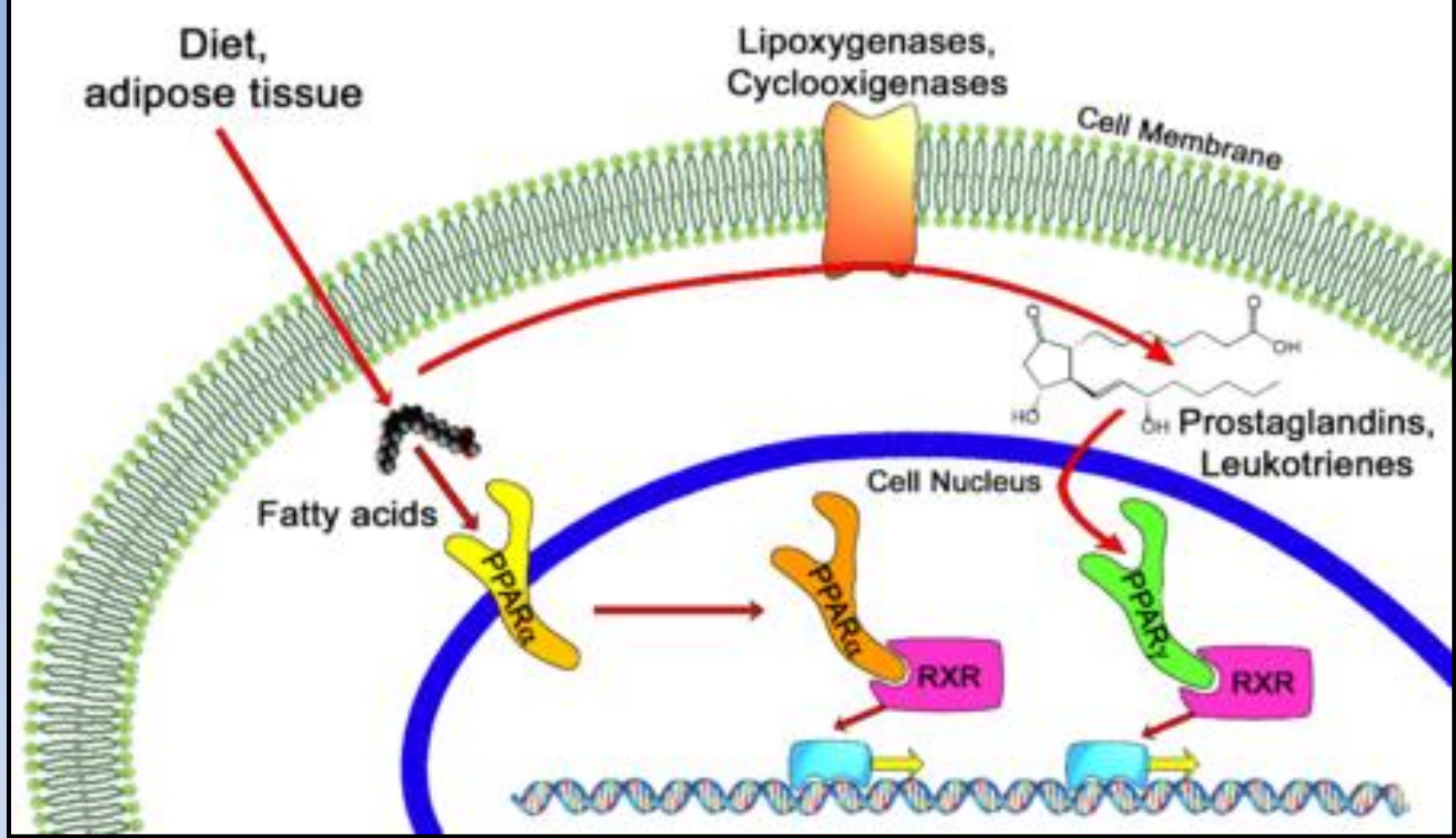
Dopo l'attivazione ligando-dipendente, si ha la dissociazione del recettore dai corepressori, il reclutamento di coattivatori, e la dimerizzazione con il Retinoid X Receptor (RXR)



Tale dimero si lega a specifiche regioni del DNA cellulare (Hormone Response Elements)



Reclutamento della RNA-polimerasi cellulare e inizio della trascrizione genica



Trascrizione genica di enzimi implicati nel metabolismo lipidico

- Acil-CoA-ossidasi
- 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA-sintasi
- Carnitina-palmitoil-transferasi

PPAR- α

Attivazione dei PPAR α promuove

- Attivazione mitocondriale
- β -ossidazione perossisomiale
 - Gluconeogenesi epatica
 - Metabolismo lipoproteine
- Attività coleretica e colagoga



in condizioni di lipidosi epatica potrebbe garantire un'accelerazione del metabolismo dei trigliceridi accumulati e un incremento dei processi ossidativi deputati alla produzione di energia

Tra gli agonisti del recettore PPAR- α ,
in medicina veterinaria, vi è
l'acido *2-fenossi-2-metil propionico sodico*
(AFMPS)

Scopo del lavoro

1) Valutare l'efficacia della somministrazione di AFMPS nel:

- migliorare la funzionalità epatica
- migliorare la degradazione dei trigliceridi e prevenirne l'accumulo epatico.

Effetti dedotti sulla scorta dell'esame clinico, dei parametri biochimici epatici e dei riscontri istologici su biopsie epatiche

2) Valutare l'effetto dell'AFMPS sui parametri riproduttivi

- Intervallo parto-1° calore
- Intervallo parto-concepimento
- % gravidanza 1° e 2° FA

3) Localizzare i PPAR- α nel fegato di bovina

Materiali e metodi

- 60 bovine di razza Frisona (2-5 lattazione) durante il Negative Energy Balance (NEBAL)
- Le bovine sono state divise a random in 2 gruppi da 30 soggetti ciascuno:

▶ **Gruppo A (sperimentale)** somministrazione I.M. di 5 g di AFMPS/capo (50 ml di Hepagen[®], Fatro), ai tempi: T_1 (entro 24 ore dal parto), T_2 (al 3° giorno del postpartum) e T_3 (al 5° giorno del postpartum)

▶ **Gruppo B (controllo)** somministrazione I.M. di 50 ml di Soluzione fisiologica (NaCl 0.9%)/capo, ai tempi: T_1 (entro 24 ore dal parto), T_2 (al 3° giorno del postpartum) e T_3 (al 5° giorno del postpartum)

Valutazione clinica

- ✓ Anamnesi
- ✓ Visita clinica
- ✓ Valutazione del Body Condition Score

Sono stati considerati i seguenti "tasti":

- processi spinosi delle vertebre lombari;
- passaggio dai processi trasversi delle vertebre lombari alla fossa del fianco Dx;
- profilo tra gli ilei;
- incavatura della groppa con l'attacco della coda.



Prelievi ematici

T1: entro 24 ore dal parto

T2: a 3 giorni dal parto

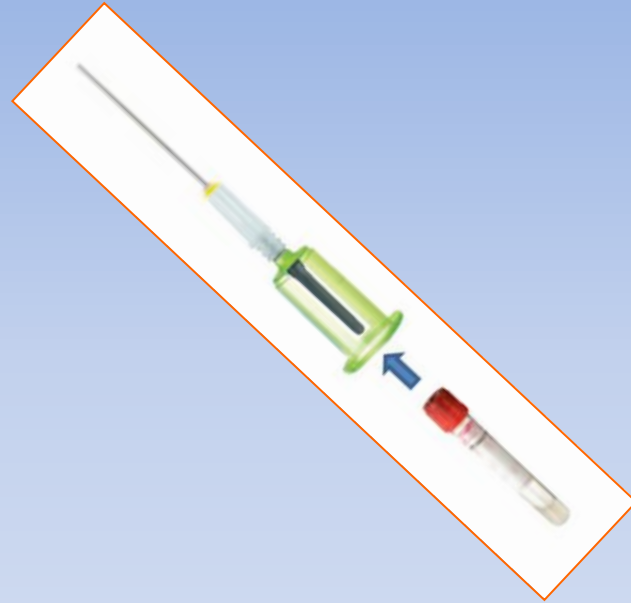
T3: a 5 giorni dal parto

T4: a 10 giorni dal parto

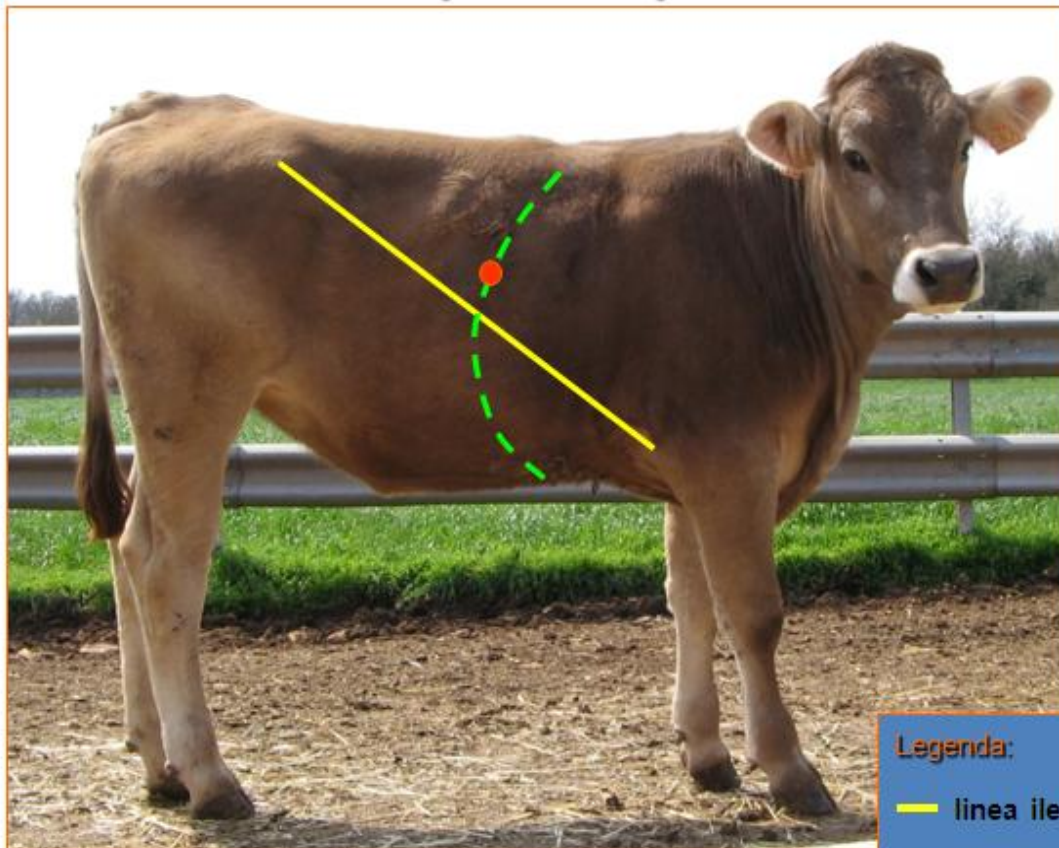
T5: a 15 giorni dal parto

T6: a 30 giorni dal parto

T7: a 40 giorni dal parto



✓ Su tali prelievi è stato effettuato il profilo biochimico completo.



Legenda:

- linea ileo – olecrano
- - - 10° spazio intercostale
- punto incisione

Punti di riferimento:

- 10° spazio intercostale dx
- linea retta immaginaria tracciata dall'angolo esterno dell'ileo sino all'olecrano
- 10-15 cm dorsalmente alla linea ileo-olecrano

Bernardini, 1992

Grado di steatosi

Valutato su 5 campi microscopici (100x) presi a random, mediante l'analizzatore di immagini Quantimet 500/W (Leika, UK):

- ✓ percentuale di area del parenchima epatico occupata dalle goccioline lipidiche
- ✓ diametro delle goccioline lipidiche più grandi (media $\pm$ D.S.)

Distribuzione del glicogeno

Evidenziata con Ematossilina-PAS

Analisi statistica: ANOVA

Presenza dei PPAR α

- ✓ applicazione di **immunoistochimica indiretta** per la localizzazione dei PPAR α
- ✓ utilizzo di anticorpo policlonale di capra anti PPAR α umano e anticorpo secondario biotinilato
- ✓ visualizzazione dell'immunocomplesso con Vecta-lab "Elite" (ABC) kit

Controllo negativo: 1) sostituzione dell'anticorpo primario con NGS;
2) omissione dell'anticorpo primario.

Parametri riproduttivi

- ✓ intervallo parto-1° calore
- ✓ intervallo parto-concepimento
- ✓ % di gravidanza alla 1^a e alla 2^a Inseminazione Artificiale

(Butler e Smith, 1987, 1989; Britt,1992; Butler, 2005)

È stata valutata anche la concentrazione di progesterone
(LKPG1, Medical System, Genova, Italia*)
a 11 giorni (T_{11}) e a 13 giorni (T_{13}) dall'inseminazione
artificiale

*range di calibrazione tra 0.2 e 20 ng/mL, sensibilità analitica 0.2 ng/mL



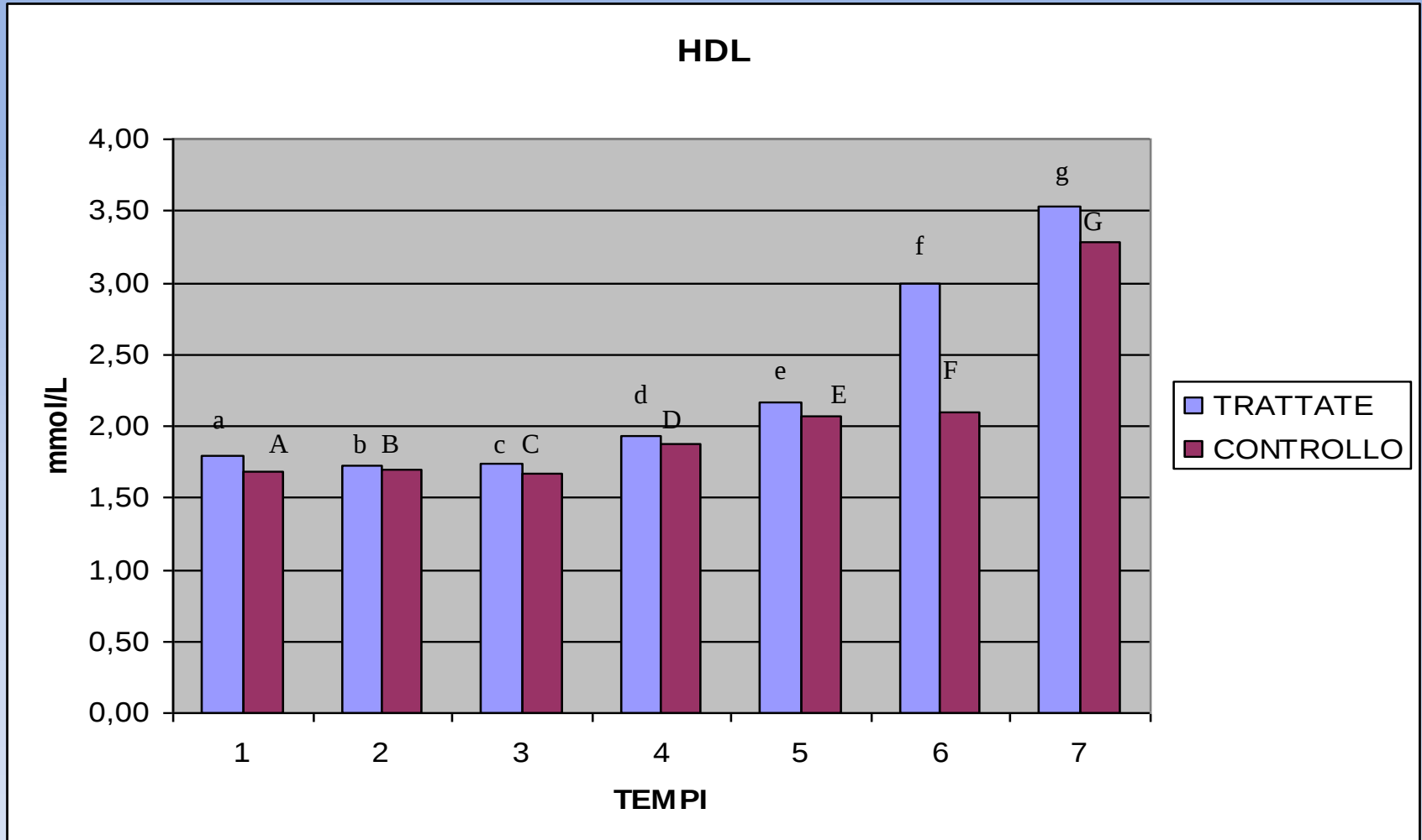
RISULTATI E DISCUSSIONI

Risultati e discussioni

- ✓ La somministrazione di acido mefepronico non ha dato alcun effetto collaterale
- ✓ Il prelievo biptico non ha dato complicazioni, né al momento dell'esecuzione né nel periodo successivo
- ✓ In 4 bovine è stata necessaria una lieve sedazione effettuata con xilazina (0,03 mg/Kg e.v.) per l'esecuzione del prelievo biptico



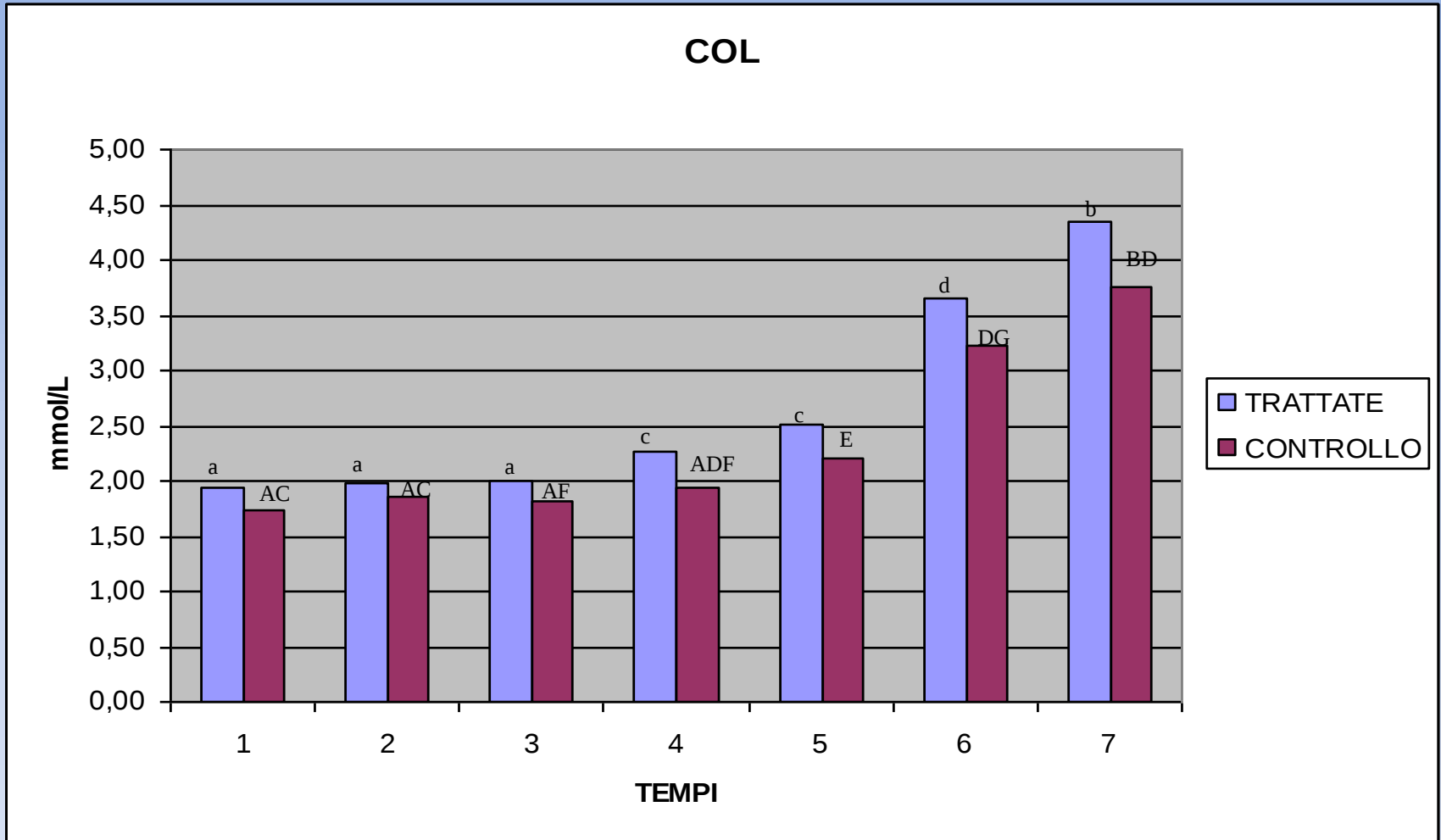
Parametri biochimici: High Density Lipoprotein



a, b, c vs g: $p < 0.001$; d vs g: $p < 0.01$; e vs g: $p < 0.05$; b, c vs f: $p < 0.05$

A, B, C vs G: $p < 0.001$; D vs G: $p < 0.01$; E vs G: $p < 0.05$; A, B, C vs F: $p < 0.05$

Parametri biochimici: Colesterolo



a,b;A,B: $p < 0.001$ - b,c; C,D; E,D: $p < 0.01$ - a,d; F,G: $p < 0.05$

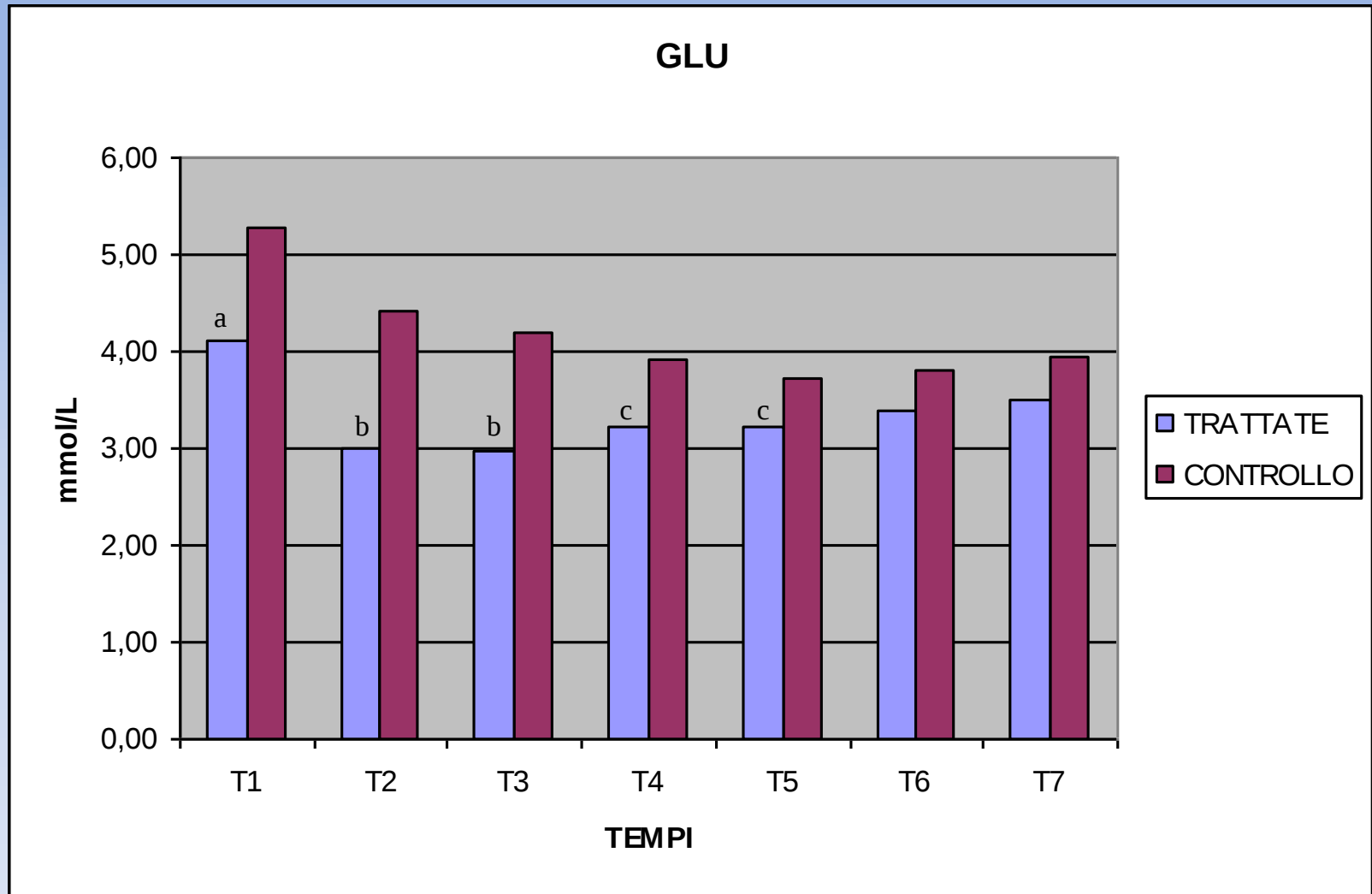
Parametri biochimici: HDL e Colesterolo

- ✓ Sia l'HDL che il colesterolo sono aumentati in maniera significativa, nei diversi tempi, in entrambi i gruppi, senza differenze significative tra gli stessi.
- ✓ Nel **gruppo trattato**, però, sia l'HDL che il colesterolo hanno avuto concentrazioni più elevate rispetto al **gruppo controllo**



Tale trend ci permette di ipotizzare un effetto
dell'acido mefepronico
sul metabolismo di tali sostanze

Parametri biochimici: Glucosio



a,b: $p < 0.01$ - a,c : $p < 0.05$

Parametri biochimici: Glucosio

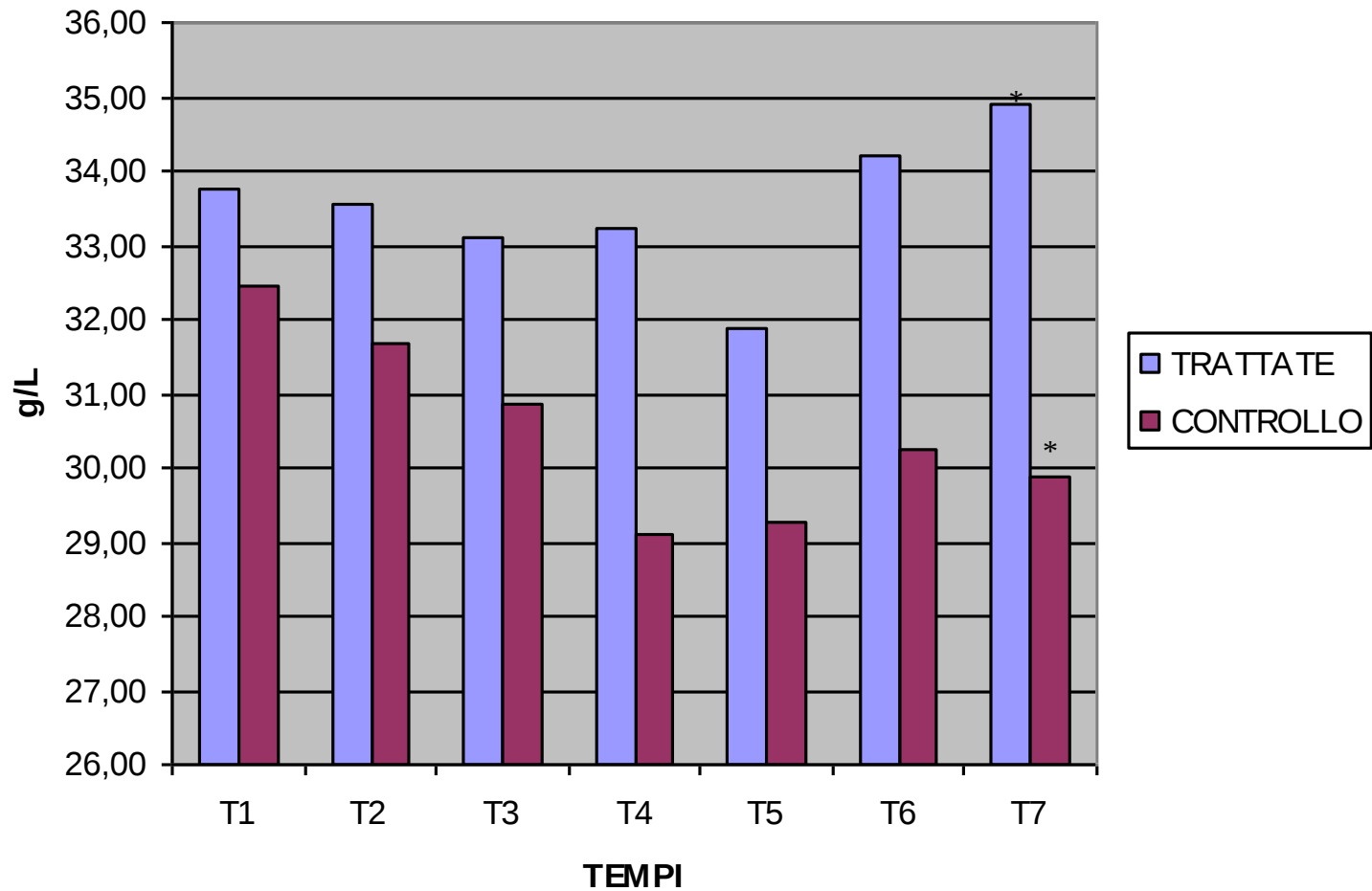
Nel **gruppo trattato**, la glicemia subisce un decremento fino a T_3 , per poi aumentare gradatamente

Nel **gruppo controllo**, invece, il glucosio è andato decrescendo da T_1 a T_5



Si può ipotizzare che l'acido mefepronico, stimolando la gluconeogenesi epatica (Farina, 2005), compensi la fisiologica riduzione della glicemia, frequente nel postpartum

ALB



* : $p < 0.05$.

Parametri biochimici: Albumine

- ✓ La concentrazione delle albumine, a T_7 , è stata significativamente più alta nel **gruppo trattato** rispetto al **gruppo controllo**.
- ✓ In quest'ultimo, inoltre, è stata lievemente al di sotto dei range fisiologici tra T_4 e T_7



il trattamento con acido mefeprónico ha
stimolato la sintesi proteica epatica

Valutazione istologica: grado steatosi

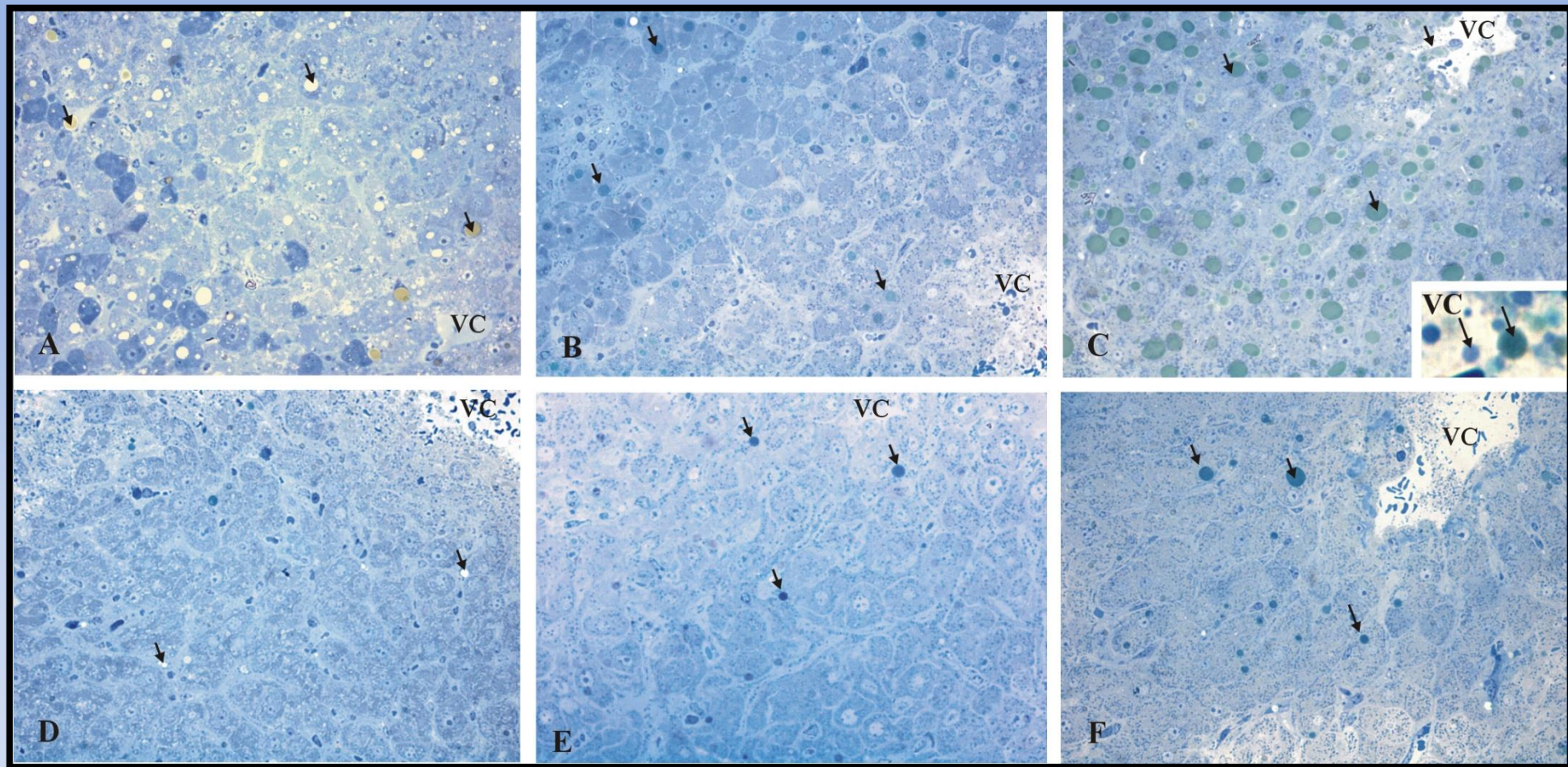
- ✓ Il parenchima epatico dei campioni **controllo** ha presentato epatociti contenenti molti **piccoli vacuoli** (corrispondenti a piccole goccioline lipidiche) confluenti in un **unico vacuolo** più grande (unica gocciola lipidica).
- ✓ **T₁** ($4,32 \pm 1,31 \mu\text{m}$) vs **T₅** ($5,83 \pm 0,78 \mu\text{m}$): $p < 0.05$
- ✓ **T₁** ($4,32 \pm 1,31 \mu\text{m}$) vs **T₆** ($6,58 \pm 1,2 \mu\text{m}$): $p < 0.001$.



Valutazione istologica: grado steatosi

- ✓ I soggetti **trattati** hanno mostrato epatociti con **microvacuoli** raramente confluenti in un'unica goccia lipidica, a tutti i tempi considerati
- ✓ Il diametro di tali vacuoli ha subito **un decremento**, anche se non statisticamente significativo, nel corso della sperimentazione.
- ✓ Il confronto tra i gruppi ha messo in evidenza **una riduzione** statisticamente significativa tra i diametri dei vacuoli lipidici a **T₅** ($p < 0.01$) e a **T₆** ($p < 0.001$)



T1**T5****T6**

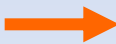
Sezioni semifini di fegato di vacca colorate con blu di toluidina
A,B,C: animali controllo; D,E,F: animali trattati

Valutazione istologica: grado steatosi

Nei soggetti **controllo**, il diametro medio e l'area occupata dalle gocce lipidiche aumentano progressivamente:

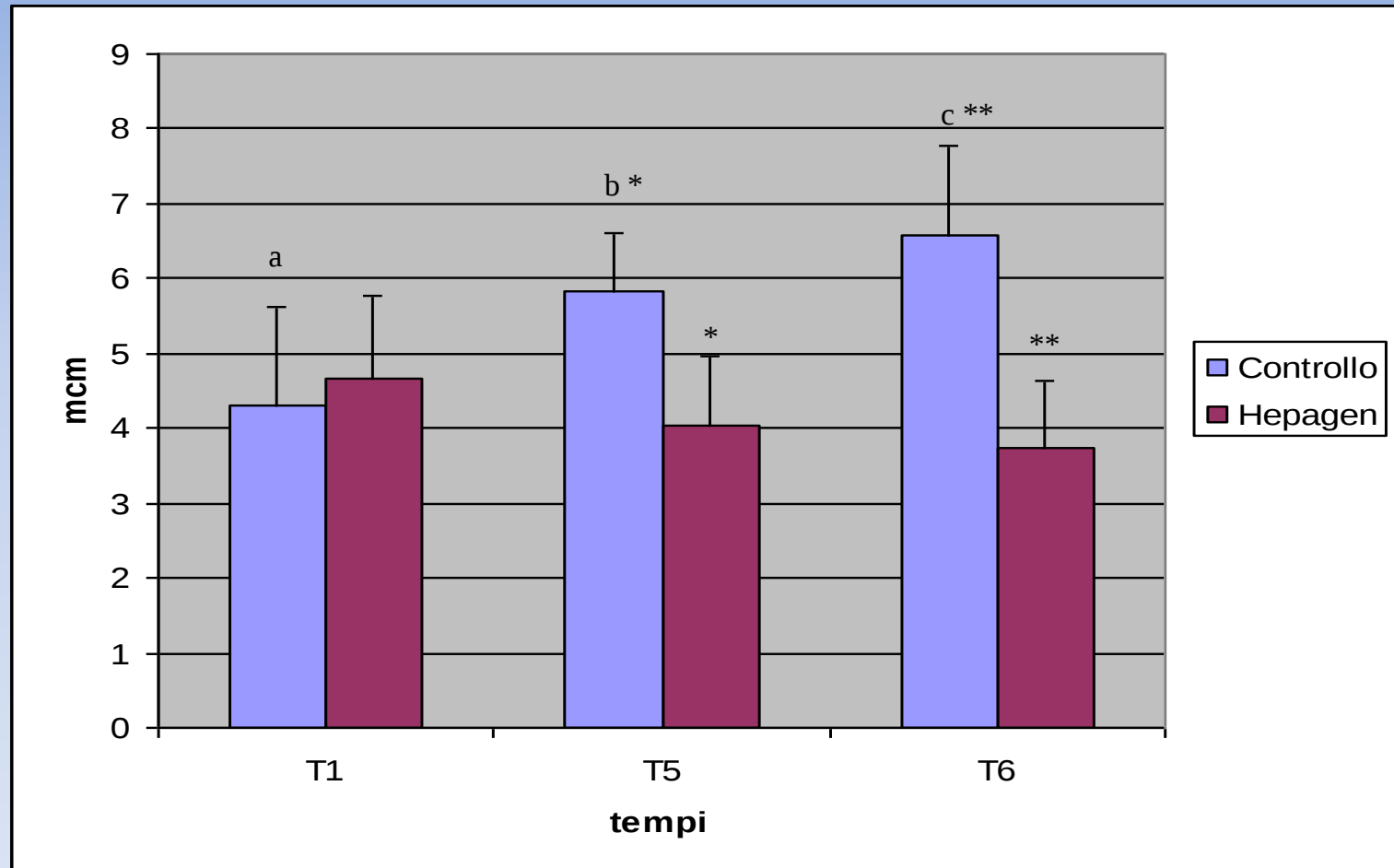
- il diametro da $4.3 \pm 0.4 \mu\text{m}$ in T1  $6.6 \pm 0.4 \mu\text{m}$ in T6;
- l'area dal 7.4% in T1  9.0% in T6 .

Al contrario nei soggetti **trattati** con acido mefepronico, il diametro medio e l'area occupata dalle gocce lipidiche diminuiscono progressivamente:

- il diametro da 4.7 ± 0.4 in T1  3.7 ± 0.4 in T6;
- l'area dal 2.4% in T1  0.1% in T6

Valutazione istologica: grado steatosi

Diametro dei vacuoli lipidici (μm)



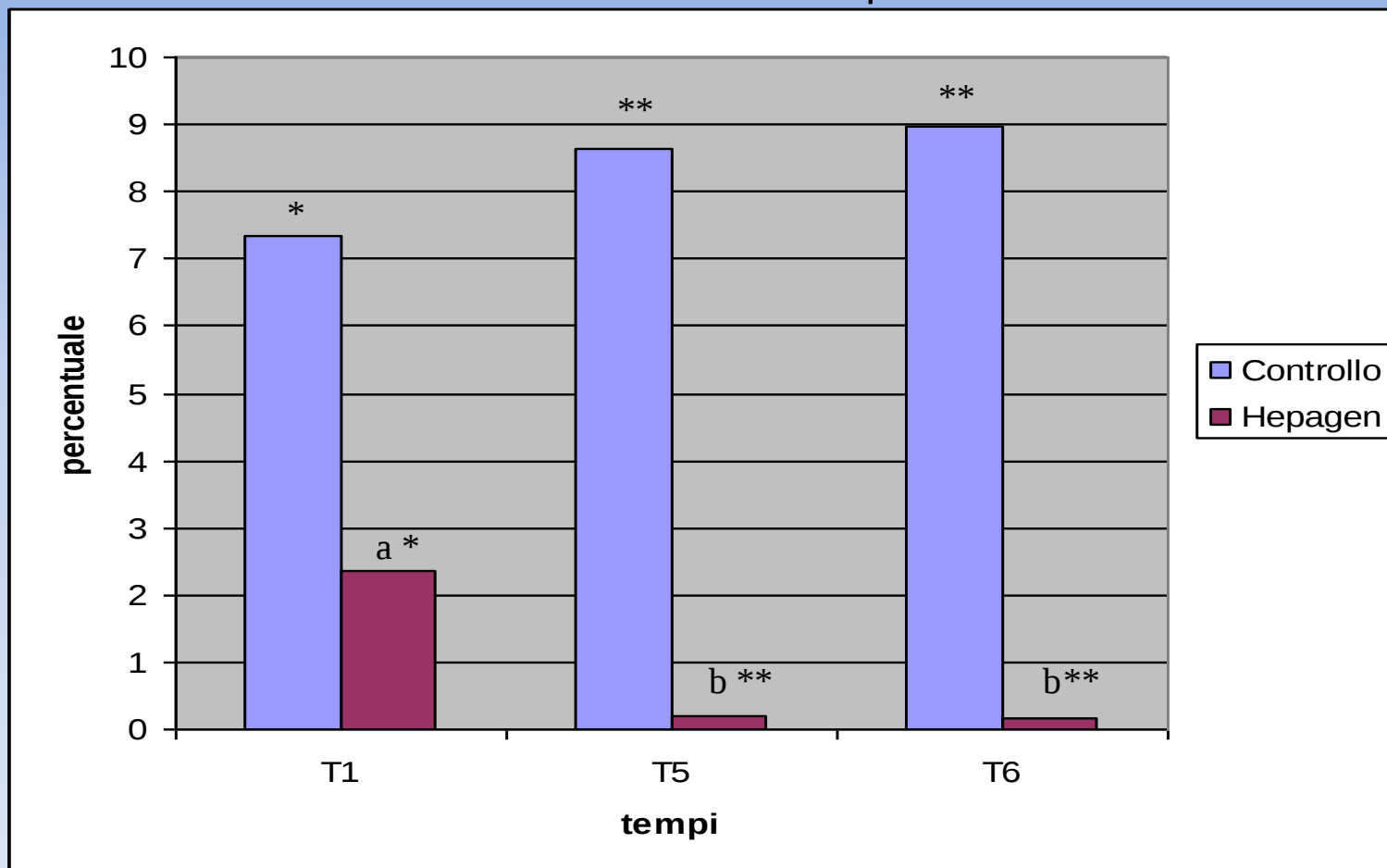
a,b: $p < 0.05$ - a,c: $p < 0.001$ - *: $p < 0.01$ - **: $p < 0.0001$

Valutazione istologica: grado steatosi

- ✓ La misurazione della percentuale di area del parenchima epatico occupata dai lipidi ha evidenziato un graduale aumento (non significativo) nel **gruppo controllo**.
- ✓ Nel **gruppo trattato**, invece, si assiste ad una significativa riduzione ($p < 0.01$) tra T1, T5 e T6
- ✓ Il confronto tra i gruppi controllo e trattato ha mostrato una differenza statisticamente significativa a T1 ($p < 0.01$), a T5 e T6 ($p < 0.001$)

Valutazione istologica: grado steatosi

Percentuale infarcimento lipidico

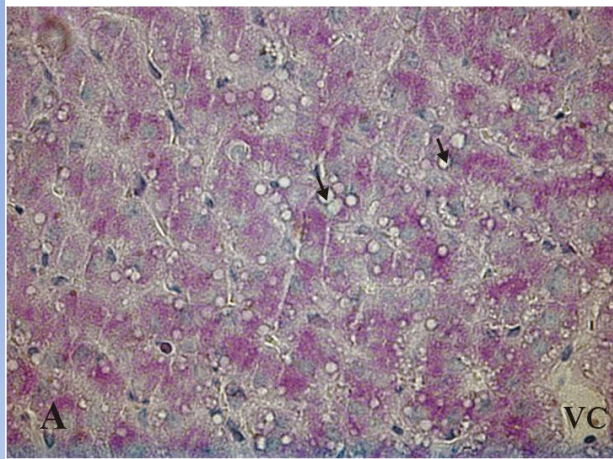


a,b; * : $p < 0.01$ - ** : $p < 0.001$

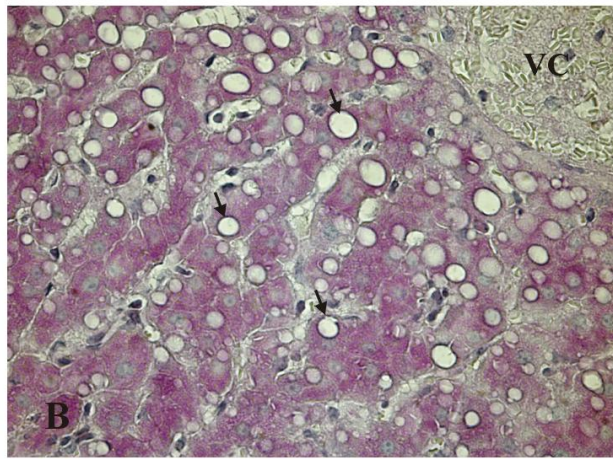
Valutazione istologica: distribuzione del glicogeno

- ✓ La reazione PAS ha evidenziato, nel parenchima epatico dei campioni controllo, una graduale riduzione di glicogeno.
- ✓ Nei campioni trattati si è osservata una più diffusa presenza di glicogeno negli epatociti a T5 e a T6 rispetto a quelli prelevati a T1

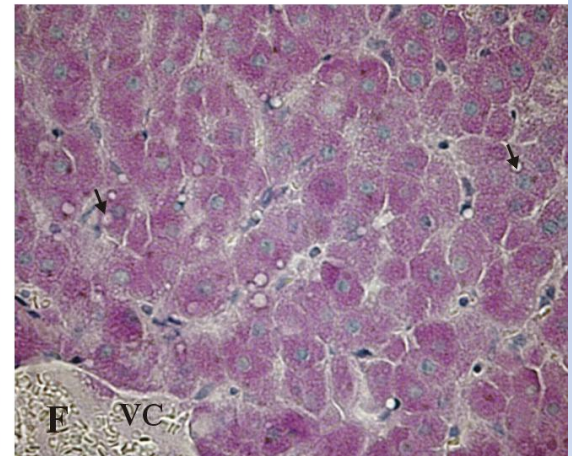
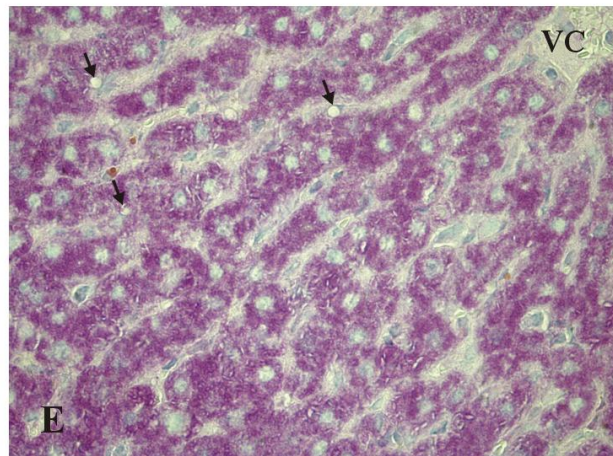
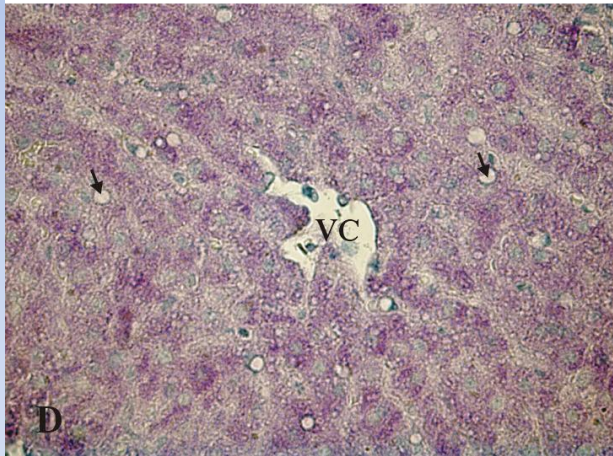
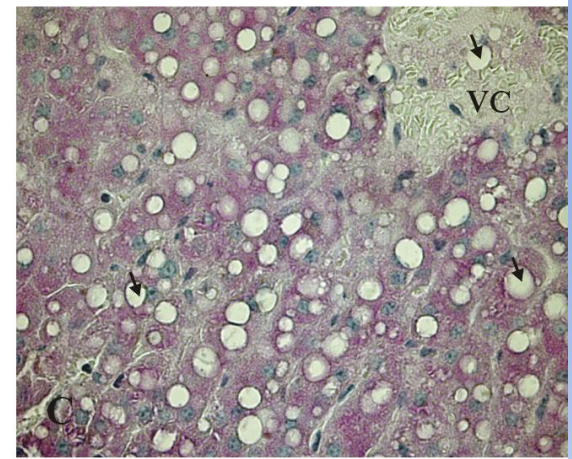
T1



T5



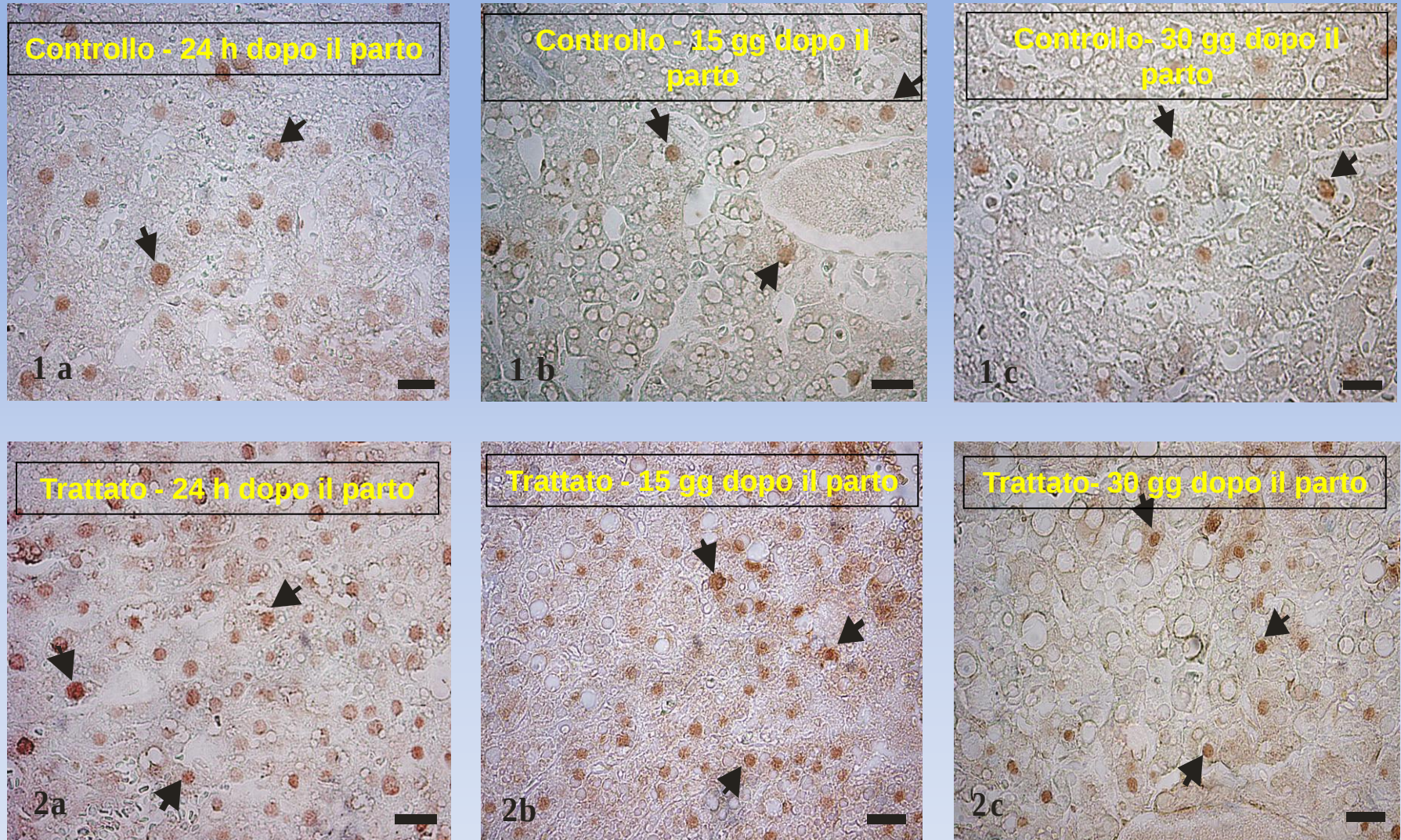
T6



**Sezioni in paraffina di fegato di vacca colorate con Ematossilina-PAS
per evidenziare il glicogeno.**

A,B,C: animali controllo; D,E,F: animali trattati

Presenza dei recettori PPAR α nel fegato di bovina



Sezioni istologiche di fegato di vacca immunocolorate con anticorpo anti PPAR α umano.

Fig. 1 a,b,c: animali controllo; Fig. 2 a,b,c: animali trattati.

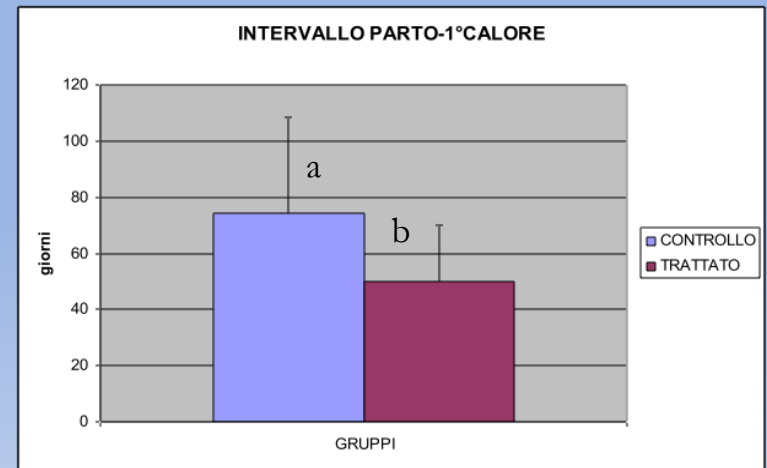
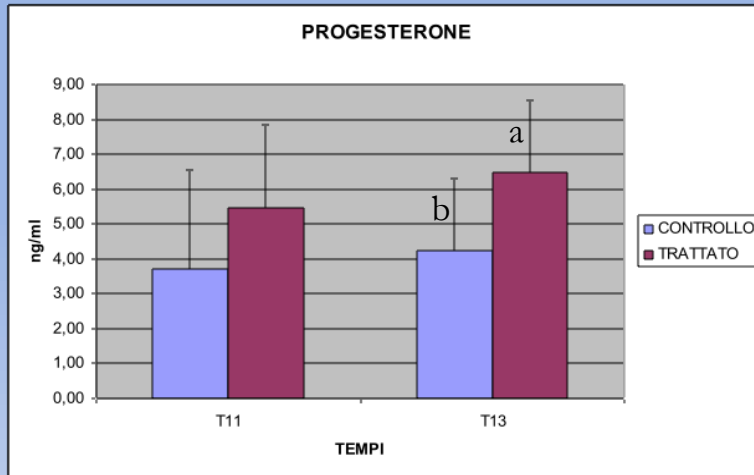
Non tutti gli epatociti mostrano la immunopositività per l'anticorpo utilizzato. L'immunoreattività è situata a livello nucleare (freccia). I PPAR α si riducono drasticamente entro 15 gg dal parto negli animali controllo. Nel gruppo trattato, invece, l'immunopositività rimane elevata a 15 gg dal parto mentre si riduce solo a 30 gg dal parto. Barre: 30 μ m.

EFFETTI SUI PARAMETRI RIPRODUTTIVI

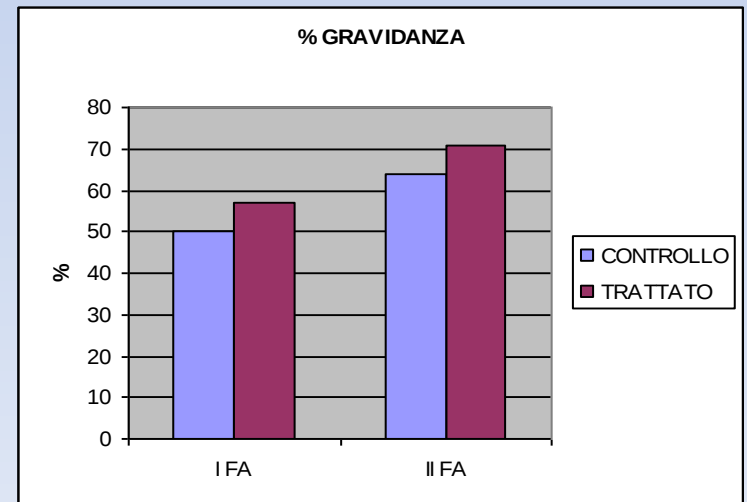
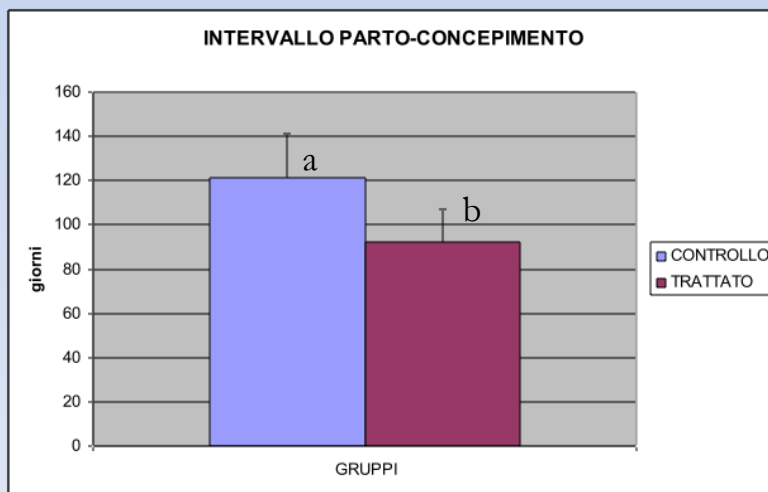
	P4 T11 (ng/ml)	P4 T13 (ng/ml)	Parto- 1° calore (gg)	Parto- concepimento (gg)	%Grav I F.A.	% Grav. II F.A.
TRATTATO	5.46 ± 2.38	6.47 ± 2.06 ^a	50 ± 20.10 ^a	92 ± 15.15 ^a	57	71
CONTROLLO	3.70 ± 2.85	4.24 ± 2.06 ^b	74.36 ± 34.07 ^b	121.4 ± 19.6 ^b	50	64

Concentrazioni medie ± DS di progesterone a T11 e T13, intervallo parto-1° calore, parto-concepimento e % di gravidanza nel gruppo trattato e controllo. a,b: p<0.05

Parametri riproduttivi



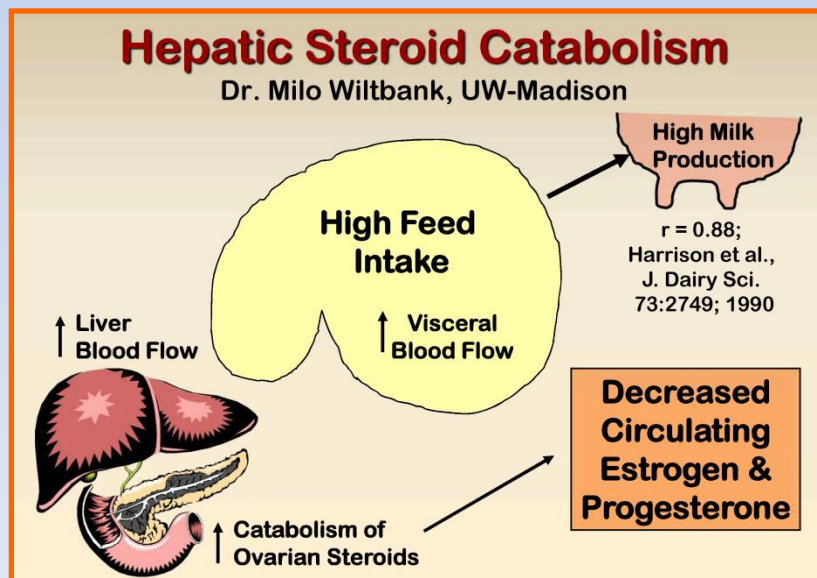
Si può notare un **aumento** significativo del P4 a T13 nel gruppo trattato rispetto al gruppo controllo, e una **diminuzione** significativa degli intervalli parto - 1° calore e parto - concepimento



Parametri riproduttivi: Progesterone plasmatico

Un aumento delle concentrazioni di progesterone nei soggetti trattati risulta importante

L'aumentata attività metabolica del fegato della bovina in transizione porta ad un aumento del catabolismo degli ormoni steroidei ovarici, con loro conseguente diminuzione in circolo e calo dell'efficienza riproduttiva



Effects of Mefepronic Acid (2-Phenoxy-2-Methyl Propionic Acid) on Hepatic Metabolism and Reproductive Parameters in Postpartum Dairy Cows

Annalisa Rizzo^a, Carlo Gazza^b, Maddalena Mutinati^a, Salvatore Desantis^a, Sara Zizza^a,
Giovanni D'Onghia^c, Gianfranco D'Onghia^c, Marianna Pantaleo^a and Raffaele Luigi Sciorsci^{a,*}

MENSA SANA IN CORPORE SANO



TERAPIA NELL'INVOLUZIONE UTERINA

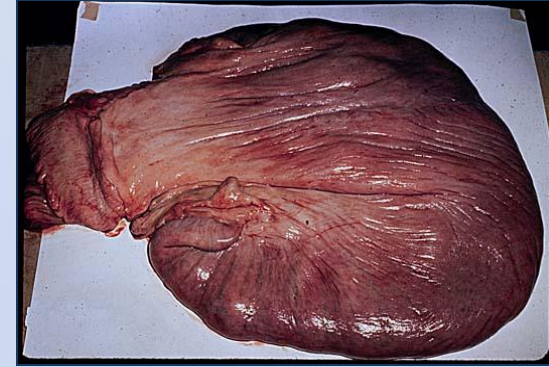


EVENTI DEL POSTPARTUM

- ✓ Riduzione di volume dell'apparato genitale
- ✓ Atrofia ghiandolare e muscolare
- ✓ Necrosi e rigenerazione dell'endometrio
- ✓ Eliminazione della contaminazione batterica
- ✓ Ripresa dell'attività ovarica



L'utero riacquisisce le condizioni idonee
ad affrontare una nuova gestazione



CONTRATTILITÀ MIOMETRIALE



Meccanismo fondamentale per un
normale processo di involuzione uterina



OSSITOCINA



PGF2 α



(Vigo et al., 2001; Bajcsy et al., 2006)

OSSITOCINA

Ormone neuropeptidico prodotto principalmente a livello ipotalamico

PRINCIPALI FUNZIONI:

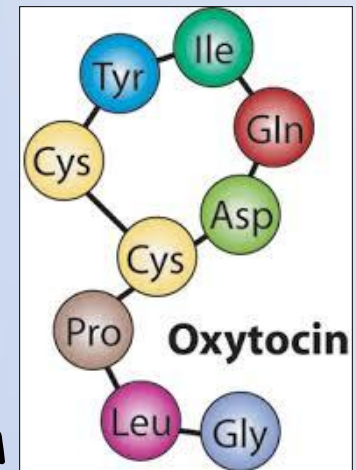
- Luteolisi

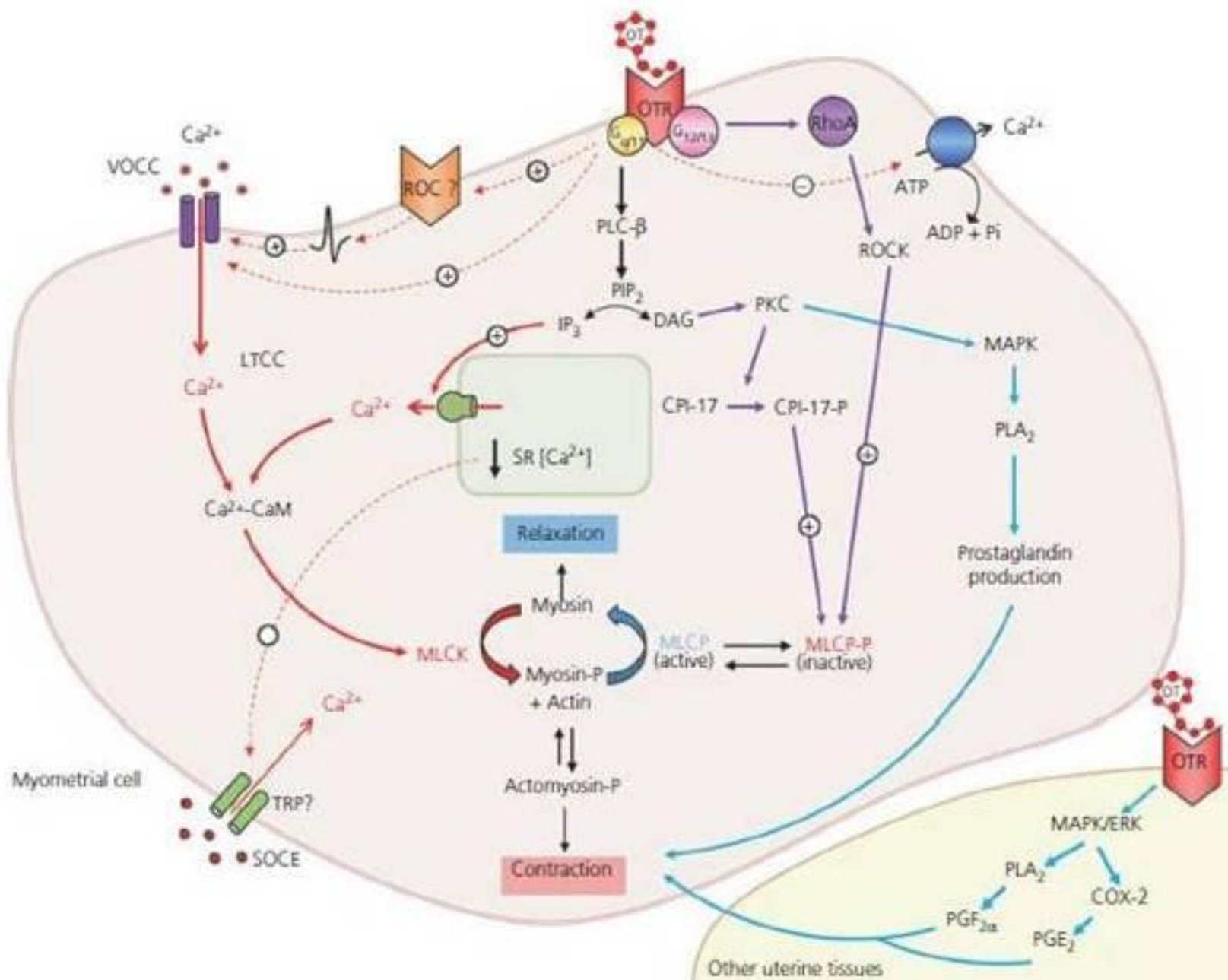
- Contrattilità uterina

parto

postpartum

- Eiezione del latte





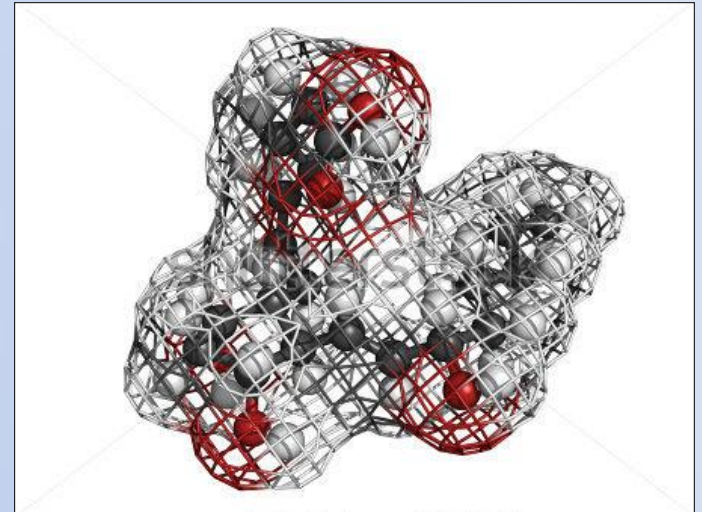
PROSTAGLANDINE

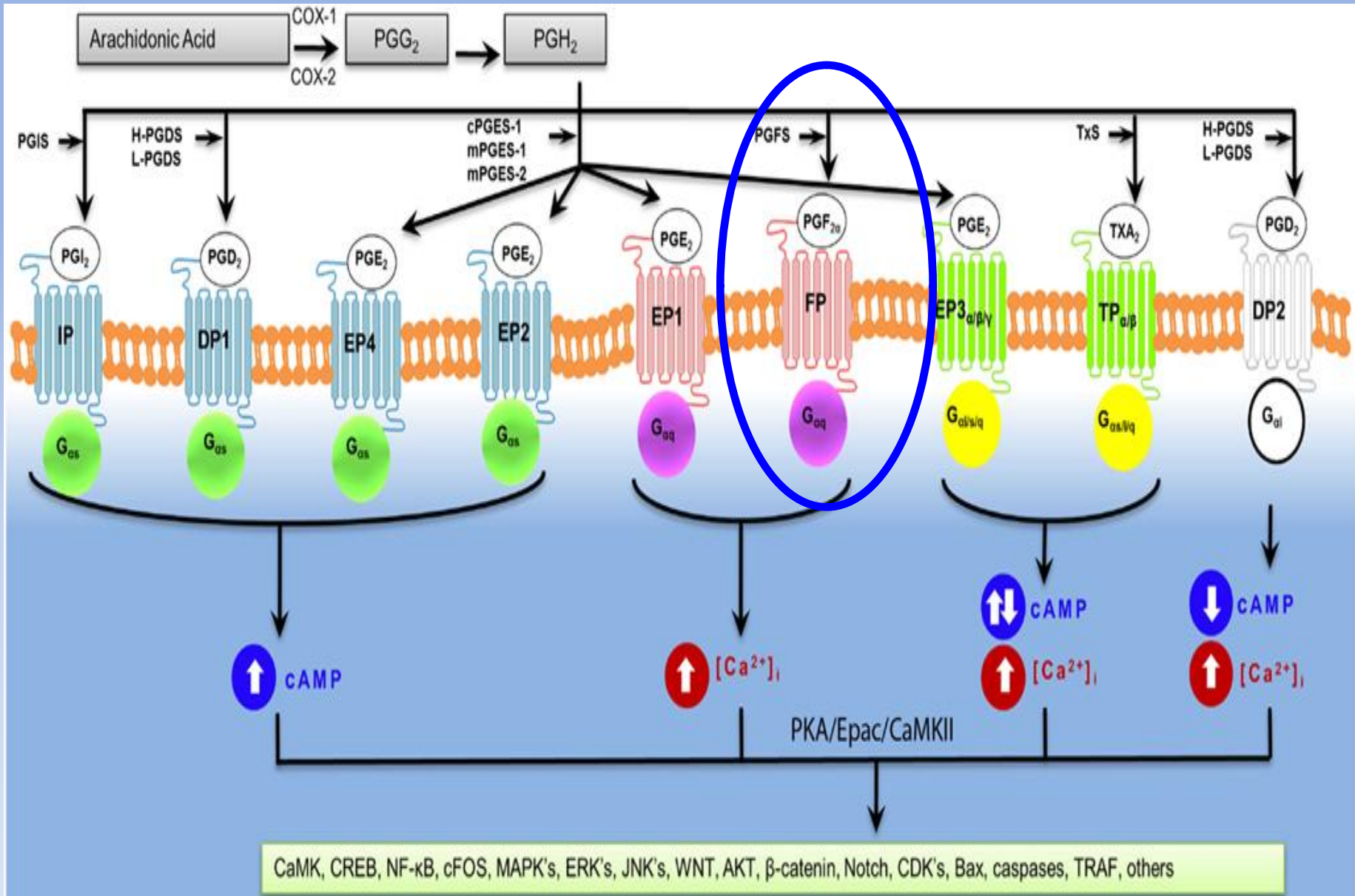
Autacoidi prodotti da diversi tessuti, ne esistono di diversi tipi

PRINCIPALI FUNZIONI:

- Luteolisi
- Ovulazione
- Motilità uterina
- Ripresa dell'attività ovarica
- Stimolazione del sistema immunitario

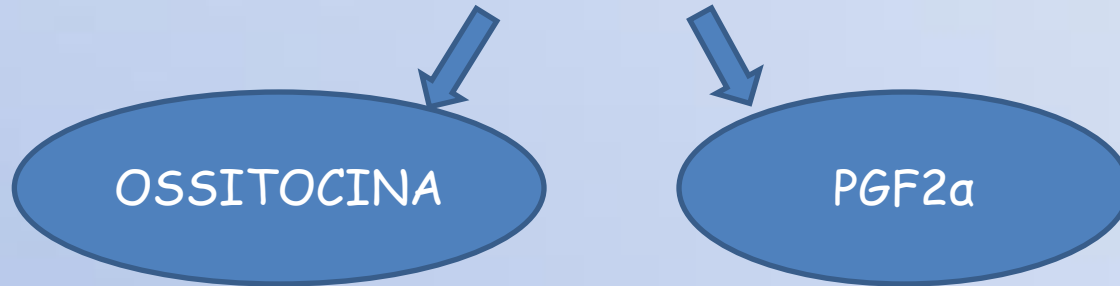
PGF_{2α}





OBIETTIVI

Confrontare l'effetto



Somministrare a 24 ore dal parto



INVOLUZIONE UTERINA

IDROSSIPROLINA: marker diagnostico dell'involuzione uterina



MATERIALI E METODI



80 bovine in
postpartum

3 - 5[^]
lattazione

500-600 Kg
p.v.

- esame obiettivo generale e particolare dell'apparato riproduttore;
- divise a random in 4 gruppi:

Gruppo OT



20 bovine a cui sono state somministrate 120 U.I. di ossitocina, i.m. (pari a 12 ml di Myometryl[®], Ternova)

Gruppo PGF2 α



20 bovine a cui sono stati somministrati 150 mcg di d-cloprostenolo, i.m. (pari 2 ml di Dalmazin[®], Fatro)

Gruppo OT-
CONTROLLO



20 bovine trattate con 12 ml di soluzione fisiologica, i.m. (NaCl 0,9%)

Gruppo PGF2-
CONTROLLO



20 bovine trattate con 2 ml di soluzione fisiologica, i.m. (NaCl 0,9%)

PRELIEVI EMATICI

- ❖ T0: 24 ore dopo il parto, immediatamente prima delle somministrazioni;
- ❖ T7: 7° giorno postpartum;
- ❖ T14: 14° giorno postpartum;
- ❖ T28: 28° giorno postpartum.



- Prelevati dalla vena coccigea in provette vacutainer da siero
- Centrifugati a $1620 \times g$ per 10', a $+4^\circ \text{C}$

Il siero ottenuto è stato stoccato in eppendorf da 1,5 ml a -20°C , fino al momento della determinazione analitica

DOSAGGIO DELL'IDROSSIPROLINA

Kit Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munchen, Germany), in HPLC (sensibilità 0,1 micromoli/mL; specificità: 87%)

MONITORAGGIO NEL POSTPARTUM

- intervallo parto – primo calore
 - intervallo parto – concepimento
 - percentuali di gravidanza
- Esplorazione rettale
- Osservazione dei segni tipici
- Diagnosi a 40 giorni dalla F.A. per mezzo di ecografia trans-rettale con sonda lineare multifrequenza (5-10 MHz, settata a 7,5 MHz) (SonoSite, MicroMaxx Bothell, WA, USA)



ANALISI STATISTICHE

Con programma PASW Statistics 19 (IBM, NY), impiegando il test GLM per misure ripetute, per il confronto infragruppo, e one way ANOVA e il test post hoc LSD, per il confronto intergruppo

I valori sono stati ritenuti statisticamente significativi per $p < 0.05$

RISULTATI

	INTERVALLO PARTO – PRIMO CALORE (giorni) (media ± d.s.)	INTERVALLO PARTO – CONCEPIMENTO (giorni) (media ± d.s.)	PERCENTUALI DI GRAVIDANZA
GRUPPO OT	25,1 ± 10,62	80,14 ± 15,96	50%
GRUPPO PGF2 α	27,1 ± 9,35	47,33 ± 9,2	45%
GRUPPO CONTROLLO	26,33 ± 7,74	88,4 ± 8,2	20%

Tabella 1: media ± deviazione standard (d.s.) dell'intervallo parto – primo calore e parto – concepimento (in giorni) e percentuali di gravidanza nelle bovine dei gruppi OSSITOCINA (OT), PROSTAGLANDINE F2 α (PGF2 α) e CONTROLLO.

[IDROSSIPROLINA] ($\mu\text{moli/mL}$)				
	T0 (media $\pm$ d.s.)	T7 (media $\pm$ d.s.)	T14 (media $\pm$ d.s.)	T28 (media $\pm$ d.s.)
GRUPPO OT	5,97 $\pm$ 3,33	6,01 $\pm$ 3,33	5,76 $\pm$ 3,17 ^A	7,46 $\pm$ 3,9 ^B
GRUPPO PGF2 α	6,14 $\pm$ 2,9 ^A	7,83 $\pm$ 2,44 ^{Bc}	7,42 $\pm$ 2,8 ^{Ca}	8,94 $\pm$ 3,92 ^{BD}
GRUPPO CONTROLLO	5,98 $\pm$ 2,89 ^A	3,87 $\pm$ 1,63 ^{BCd}	4,67 $\pm$ 1,89 ^{CDb}	6,98 $\pm$ 3,7 ^D

Tabella 2: media $\pm$ deviazione standard (d.s.) delle concentrazioni sieriche di idrossiprolina ($\mu\text{moli/mL}$), nelle bovine dei gruppi OSSITOCINA (OT), PROSTAGLANDINE F2 α (PGF2 α) e CONTROLLO, a T0 (dopo 24 ore dal parto, prima del trattamento), T7, T14 e T28 (7, 14 e 28 giorni dopo il parto, rispettivamente). In riga: A, B: $p < 0,05$; C, D: $p < 0,01$. In colonna: a, b: $p < 0,05$; c, d: $p < 0,01$.

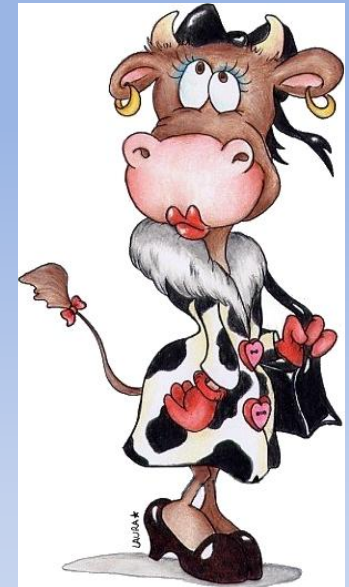
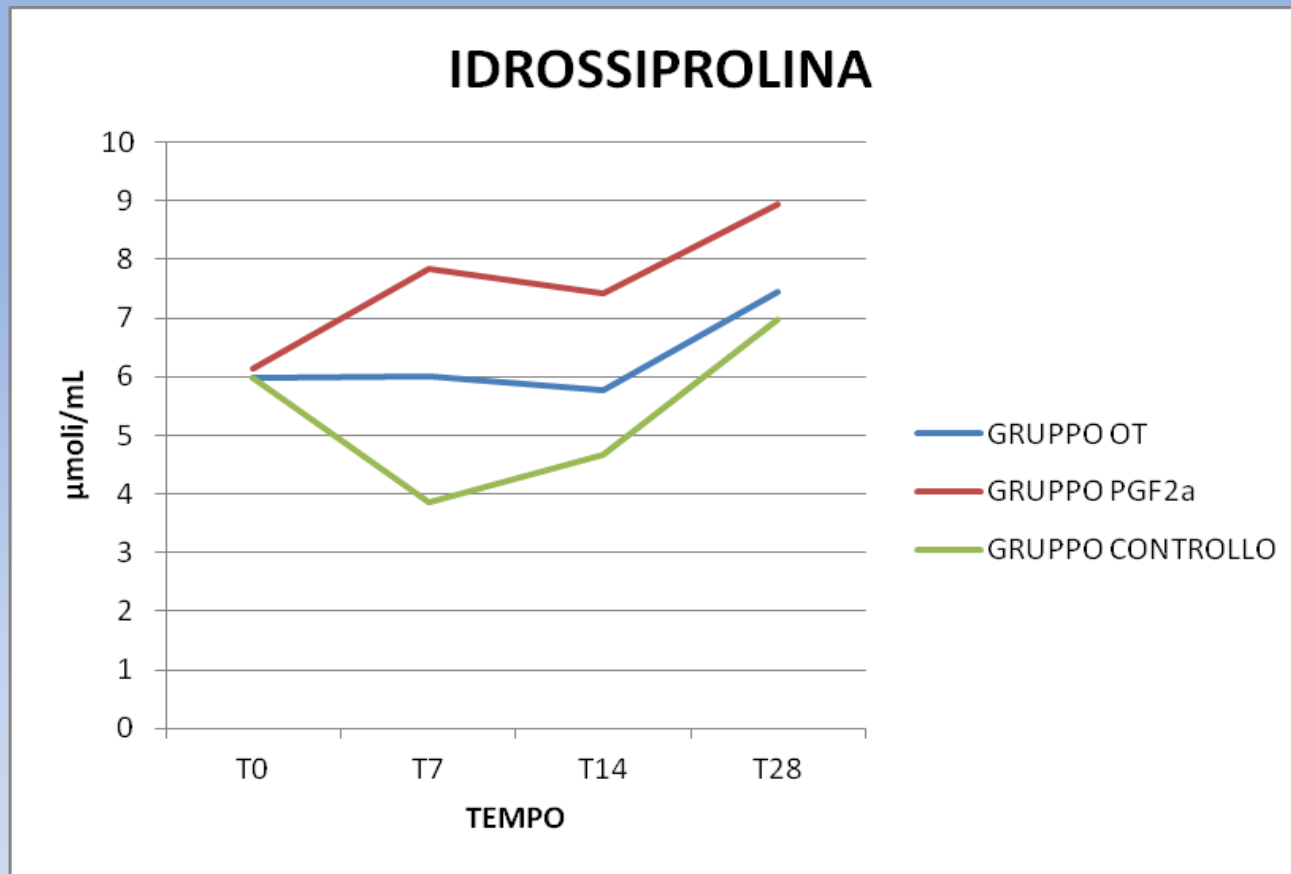


Grafico 1: concentrazioni sieriche di idrossiprolina (esprese in $\mu\text{moli/mL}$), nelle bovine dei gruppi OSSITOCINA (OT), PROSTAGLANDINE $F2\alpha$ ($\text{PGF2}\alpha$) e CONTROLLO, a T0 (dopo 24 ore dal parto, prima del trattamento), T7, T14 e T28 (7, 14 e 28 giorni dopo il parto, rispettivamente).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Gruppo PGF2 α

↑ [IDROSSIPROLINA]

↓ Intervallo parto - concepimento

↑ Riassorbimento del collagene uterino



↙ Attivazione immunitaria

↘ Innesco della fagocitosi

PROCESSO DI INVOLUZIONE UTERINA PIÙ CELERE

(Maffeo et al., 1996; Vigo et al., 2001)

Gruppo OT

Più alta percentuale di gravidanza



Maggiore funzione contrattile del miometrio



Miglioramento del processo di involuzione uterina

Intervallo parto - concepimento

Manca la stimolazione immunitaria

GRUPPO
CONTROLLO

Concentrazioni più basse di idrossiprolina

Più bassi indici riproduttivi



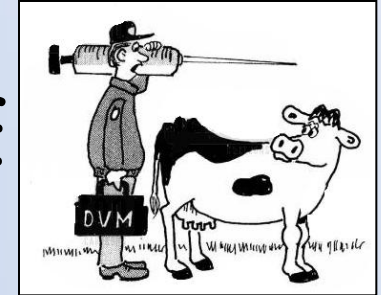
Ritardo del riassorbimento della matrice collagenica

Processo di involuzione uterina più lento





SOSTANZE ECBOLICHE



Accelerare involuzione uterina

Migliorare l'efficienza riproduttiva

PGF2 α



RISULTATI MIGLIORI

OSSITOCINA



Migliora la qualità della rigenerazione tissutale come dimostrato dalle alte percentuali di gravidanza registrate

SONO TUTTE LEGGENDE... LO SANNO
TUTTI CHE IL MASCHIO DELLA VACCA È
IL BIDONE CON L'AZOTO LIQUIDO E
LE PAILLETTES!

TU LO SAPEVI CHE
ESISTE IL BOVINO
MASCHIO E SI
CHIAMA TORO?



ALLEN SYBREK



REPEAT BREEDER: TERAPIE CLASSICHE E INNOVATIVE

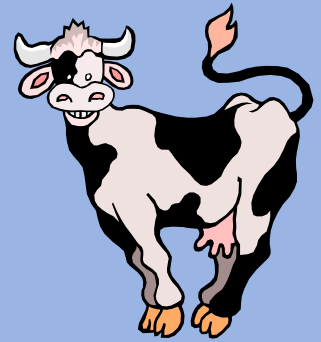
Definizione

Bovine clinicamente sane, con un ciclo estrale regolare, che non risultano gravide dopo 3 o più interventi fecondativi.



(Arthur, 2001; Sali, 2013)

Eziopatogenesi



Mancato concepimento:

- ritardata ovulazione;
- qualità scadente del seme;
- errata scelta del momento per la FA;
- impedimenti fisici e funzionali alla migrazione dei gameti;
- reazioni immunologiche;
- elevate temperature ambientali.

Mortalità embrionale:

- gameti invecchiati;
- anomalie cromosomiche letali;
- errata alimentazione;
- carenza di progesterone;
- stress.

(Sheldon et al., 2009)

Terapia

Per migliorare lo sviluppo e la funzione del corpo luteo si è utilizzato

- **progesterone e progestinici** (Arthur, 2001; Ballabio et al. 2002)
- **hCG** (Walton et al., 1990)
- **GnRH** (Morgan e Lean, 1993)
- **GnRH/Calcio-Naloxone** (Robbe et al., 2001)
- **PGF2 α** (d-cloprostenolo - Dalmazin, Fatro-Italia) (Rizzo et al., 2003).

- Secondo Conneely et al. (2001) l'esistenza di due isoforme recettoriali per il P4 (A e B), ognuno con una funzione ed una distribuzione diversa, potrebbe spiegare il fallimento della somministrazione esogena di **progestinici**.



L'utilizzo del **GnRH** 11 giorni dopo la F.A. ha dato risultati piuttosto incoraggianti perché:

- induce la luteinizzazione del follicolo dominante durante la seconda ondata follicolare
- aumenta la progesteronemia
- riduce il tasso di estrogeni in circolo
- previene l'aumento dei recettori endometriali per l'ossitocina e, quindi, la stimolazione della produzione uterina di PGF2a (Cairolì, 2002).

Le $\text{PgF}_{2\alpha}$ hanno azione **LUTEOLITICA**, ma NON nei primi 5 giorni dopo lo scoppio del follicolo



in vitro le $\text{PgF}_{2\alpha}$ manifestano un'azione **TROFICA** sul CL in via di formazione.

(Tsai e Wiltbank, 1998; Kobayashi e Miyamoto, 2000)

Obiettivi



valutare, in bovine Repeat Breeder, l'effetto della somministrazione di d-cloprostenolo:

- al momento della FA
- 4° giorno post- FA
- migliorare l'efficienza riproduttiva di tali soggetti.

GRUPPO TRATTATO: bovine repeat breeder (RB) a cui è stata somministrata i.m. una dose di 2 ml di d-cloprostenolo (150µg di Dalmazin®-Fatro, Italia);

GRUPPO CONTROLLO: bovine RB a cui è stata somministrata i.m. 2 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0,9%);



$PgF_{2\alpha}$ al momento della FA

Risultati

Gruppo	N° soggetti	Gravidanze ottenute	P4 (ng/ml) al 12° giorno (MEDIA $\pm$ ds)	Diametro medio del CL al 12° giorno (mm)
Gruppo A ($PgF_{2\alpha}$)	67	45 (67%)	2.58 $\pm$ 1.36	23 $\pm$ 2
Gruppo C (controllo)	37	7 (19%)	1.2 $\pm$ 0.69	20 $\pm$ 3

$\text{PgF}_{2\alpha}$ al 4° giorno dalla FA

Gruppo	N° soggetti	Gravidanze ottenute
Gruppo A ($\text{PgF}_{2\alpha}$)	21	12 (57%)
Gruppo C (controllo)	19	8 (42%)



Le PgF2 α attivano il processo di sintesi del P4:

- a partire dalle lipoproteine per attivazione della **citocromossidasi P450_{scc}** (Meidan et al, 1998)
- agendo sulla **StAR** (Steroidogenic Acute Regulatory), una proteina a turnover rapido, che agisce accelerando il trasferimento di colesterolo dalla membrana esterna a quella interna del mitocondrio (Leymarie e Martal, 2001).

Sarebbe riduttivo improntare il programma di miglioramento dell'attività riproduttiva solo su un unico protocollo farmacologico, in quanto alla base dell'ipofertilità negli allevamenti bovini ci sono una serie di problematiche, di tipo principalmente manageriale, che portano inevitabilmente l'animale a subire continui stress, che si ripercuotono poi sulle stesse produzioni.

**Grazie per la
cortese
attenzione!**

