

UNIVERSITÀ CATTOLICA DEL SACRO CUORE

Facoltà di Scienze agrarie, alimentari e ambientali

Corso di Laurea Magistrale
in Scienze e Tecnologie Agrarie

**Adattamento immunometabolico nel periparto di bovine
con marcatori genetici associati a bio-marcatori di stress**

Relatore:

Prof. Erminio Trevisi

Correlatore:

Prof. Paolo Ajmone Marsan

Tesi di Laurea di:

Passerini Lucio

matr. n°. 5014387

anno accademico 2021/2022

Sommario

1. Introduzione	4
1.1 Stress.....	4
1.1.1 Definizione e tipologie.....	4
1.1.2 La risposta endocrino-metabolica allo stress.....	5
1.1.3 Modificazioni indotte dallo stress.....	7
1.1.4 Stress, produzione e riproduzione	8
1.1.5 Stress e sistema immunitario	8
1.1.6 Come misurare la risposta allo stress?	9
1.1.7 Stress e resilienza	10
1.2 Il periodo di transizione	11
1.2.1 Definizione e caratteristiche.....	11
1.2.2 Misurare l'adattamento al peri-parto.....	15
1.3 Effetto Genetico	17
1.3.1 Genetica e resilienza	17
1.3.2 Studi di associazione genome-wide (GWAS).....	18
1.3.3 GWAS sui marcatori della risposta allo stress.....	19
2. Scopo della ricerca	21
3. Materiali e metodi	21
3.1 Fase 1.....	22
3.1.1 Animali.....	22
3.1.2 Campionamenti e analisi su sangue e latte	22
3.1.3 Genotipizzazione e controllo qualità.....	24
3.1.4 Definizione del dataset	24
3.1.5 Studio di associazione genome-wide per singolo marcatore.....	24
3.1.6 Studio di associazione genome-wide per gene.....	25
3.1.7 GWAS sui dati imputati	25
3.2 Fase 2.....	25
3.2.1 Animali.....	25
3.2.2 Campionamenti e raccolta dati	26
3.2.4 Confronto tra gruppi	27
4. Risultati	28
4.1 Fase 1.....	28
4.1.1. Animali.....	28

4.1.2 Metaboliti ematici.....	29
4.1.3 Associazioni genome-wide	30
4.2 Fase 2.....	37
4.2.1 Animali.....	37
.....	37
4.2.2 Produzione.....	38
4.2.3 Body Condition Score	40
4.2.4 METABOLISMO	43
4.2.5 Confronti metabolici sui genotipi GGT	54
4.2.6 Confronti metabolici sui genotipi PON	55
4.2.7 Confronti metabolici sui genotipi CUCP	59
5. Considerazioni conclusive	60
6.Appendici.....	63
6.1 Metodiche.....	63
Analisi del sangue.....	63
6.2 Tabelle.....	75
7.Bibliografia	89

1. Introduzione

1.1 Stress

1.1.1 Definizione e tipologie

Lo stress è un fenomeno complesso e multidimensionale promosso da diversi agenti perturbativi di natura fisica, chimica, emotiva detti stressori. Tali agenti richiedono una risposta biologica di adattamento primaria, che serve a contrastare situazioni ritenute pericolose dall'organismo. Si tratta di una risposta aspecifica, ossia indipendente dalla natura dell'agente stressante e innescata in modo simile in quasi tutte le specie animali. Questo meccanismo tende a superare la difficoltà (adattamento) e a ripristinare il più presto possibile l'omeostasi, cioè il normale equilibrio operativo dell'organismo (Moberg, 1985). Lo stress, quindi, è una condizione normale della vita di un individuo, che nella sua esistenza si deve adattare continuamente alle situazioni esterne in perenne mutamento. Le fonti di stress possono essere caratterizzate sotto diversi aspetti:

- natura, ossia la matrice da cui deriva l'insulto, che può essere interna o esterna all'organismo, ad esempio ambientale (es. temperatura), metabolica (es. chetosi), psico-sociale (es. sovraffollamento);
- intensità (es. decibel, percentuale di sovraffollamento);
- frequenza con cui accade il fenomeno e la durata, in quanto anche un evento di intensità minima, se ripetuto diverse volte o se insiste per un tempo prolungato, può essere fonte rilevante di stress;
- condizione fisiologica dell'individuo (es. stato di salute, genoma, sesso, esperienze pregresse...);
- prevedibilità e apprendimento (se l'animale viene educato, accetterà con meno difficoltà le attività manageriali, che non verranno viste come stressori);
- comportamenti tipici dell'etologia di specie, in quanto se non possono essere espletati l'animale risulterà stressato.

In alcuni casi, lo stress costituisce uno stimolo favorevole per la vita ed è percepito come una condizione neutrale o positiva. In tal caso si parla di "eustress": la risposta adattativa dell'organismo è efficace, adeguata ad evitare conseguenze avverse. Quando invece lo

stress causa effetti negativi, si parla di “distress”. In questa condizione la risposta adattativa è compromessa da un’attivazione psicofisica eccessiva, l’adattamento non è possibile e l’animale sperimenta una riduzione del benessere.

In base alla durata dello stimolo si distinguono lo stress acuto, che ha breve durata (minuti, ore) ed è tipicamente piuttosto intenso ma limitato nel tempo e lo stress cronico, che persiste nel tempo (ore, giorni, mesi, anni) e che per essere in qualche modo “sopportato” è di bassa intensità.

1.1.2 La risposta endocrino-metabolica allo stress

L’insorgenza di un evento stressante comporta un’alterazione a livello neurochimico, la secrezione di neurotrasmettitori ed ormoni, principalmente regolata dal sistema nervoso centrale (SNC) e dall’asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) (Liu, Wang and Jiang, 2017). Il primo ricercatore che si occupò di questa tematica fu Hans Selye, che già nel 1936 descrisse la “sindrome generale di adattamento”, dimostrando che si organizza in tre fasi successive. La prima fase, di allarme, è contrassegnata da una reazione ad uno stress acuto in cui sono mobilitate le difese dell’organismo. In particolare, in questa fase il SNC comunica istantaneamente con la midollare del surrene e porta alla produzione di catecolamine (adrenalina, noradrenalina), che iniziano ad essere liberate nel sangue già qualche secondo dopo la percezione dello stimolo. Dopo i primi minuti dall’attivazione di questa risposta, viene stimolato l’asse HPA: l’ipotalamo produce l’ormone di rilascio della corticotropina (CRH, Corticotropin-Releasing Hormone) che stimola l’adenoipofisi a rilasciare l’ormone adrenocorticotropo (ACTH, Adreno Cortico Tropic Hormone) che a sua volta stimola le corticali del surrene a secernere cortisolo (Figura 1). Il rilascio di cortisolo nel sangue svolge un feedback negativo sulla produzione di CRH e ACTH da parte di ipotalamo e ipofisi. Mentre le catecolamine hanno una risposta rapida e fugace, i glucocorticoidi hanno una risposta più lenta, ma di maggiore durata.

Nella seconda fase, di resistenza, al persistere dello stress si verifica una sovrapproduzione di cortisolo con conseguente soppressione delle difese immunitarie. Infine, la terza fase, di esaurimento, subentra quando l’esposizione all’agente stressante si protrae per troppo tempo, cronicizzando la risposta ipofisaria. La corteccia surrenale entra in uno stato di esaurimento funzionale e l’organismo non può mantenere più a

lungo lo stato di resistenza. In questa fase si possono sviluppare nell'organismo patologie difficilmente reversibili che portano, nei casi estremi, alla morte.

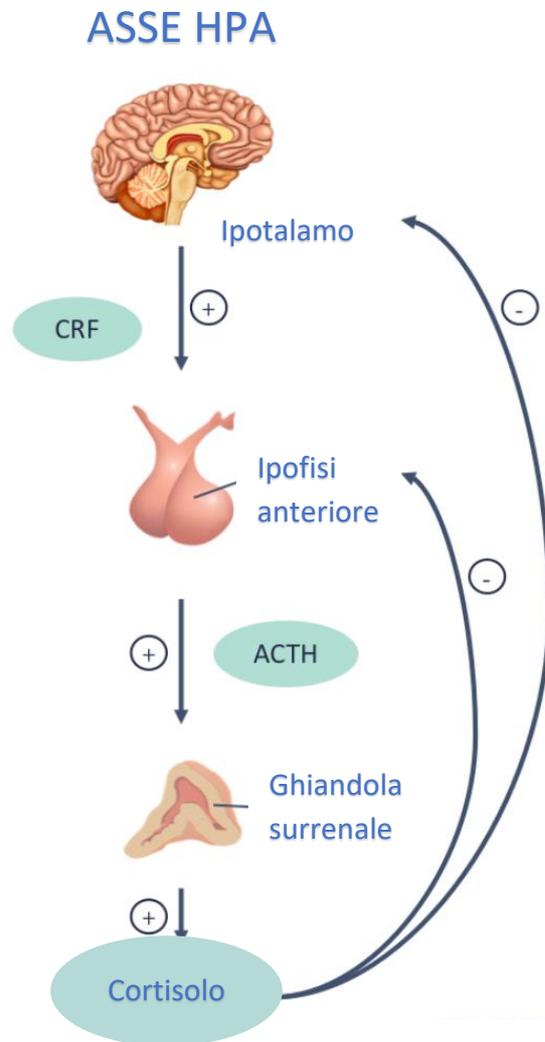


Figura 1 - Schematizzazione del funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrenale.
(Empowered health institute)

La modalità con cui gli ormoni precedentemente descritti vengono rilasciati varia in funzione del tipo di stress: nello stress acuto si osserva un picco di adrenalina seguito in un secondo tempo da uno di cortisolo. È importante sottolineare che il livello massimo di produzione di questi ormoni non può essere superato, in quanto è stabilito dalla capacità fisiologica dell'animale di produrli.

Nello stress cronico, invece, si ha una scarsa produzione di adrenalina e una preponderanza del cortisolo. A differenza dell'adrenalina, il cortisolo può mantenere più a lungo livelli alti, ma sempre in funzione della riserva surrenalica di tale ormone. Chiaramente, se persiste lo stimolo, il rilascio aumenta. È importante considerare che nel sangue un livello basale di questi ormoni. Tipicamente, nello stress cronico ritroviamo livelli di cortisolo più bassi di quando si ha il picco di stress acuto, ma più alti rispetto al valore fisiologico. Lo stress cronico è dunque la forma più insidiosa, in quanto più difficile da individuare: non tutti gli animali hanno lo stesso valore fisiologico di cortisolo.

1.1.3 Modificazioni indotte dallo stress

La risposta endocrino-metabolica descritta nel precedente paragrafo porta a modificazioni di tipo:

- metabolico, allo scopo di utilizzare l'energia delle riserve endogene (iperglicemia, iperlipemia, inibizione delle risposte difensive e calo delle gonadotropine) e
- comportamentale, che aiutano ad affrontare lo stimolo (aumento dell'aggressività, diminuzione dell'interesse per il cibo, diminuzione dell'interesse sessuale).

Sia catecolamine che cortisolo sono associate a una condizione di iperglicemia e a una maggiore mobilitazione di acidi grassi non esterificati (NEFA). Nello specifico, le modificazioni generate dalle catecolamine provocano nell'individuo un aumento della frequenza respiratoria e cardiaca, della forza di contrazione sistolica e della pressione arteriosa, della maggiore ossigenazione dei tessuti e glicolisi. Questo porta a un aumento della glicemia nel sangue e dell'ATP muscolare, a una diminuzione della secrezione insulinica, a un aumento del glucagone, della gluconeogenesi nel fegato e dell'utilizzo di glicogeno. Inoltre, le riserve energetiche vengono indirizzate verso muscoli e cervello e viene inibita l'attività del tratto gastro-intestinale. Tutto questo permette di rispondere allo stimolo stressante con il meccanismo "*fight or flight*", termine coniato nel 1929 da Walter B. Cannon in seguito ai suoi studi sull'adrenalina (Cannon, 1929), e che rende pronto l'individuo a rispondere efficacemente a uno stimolo stressante.

Il cortisolo è invece responsabile dell'aumento del catabolismo proteico (accelerata distruzione degli anticorpi), della modificazione della formula leucocitaria (neutrofilia, linfopenia, eosinopenia), della riduzione del tessuto linfatico (timo, milza, linfonodi), dell'inibizione delle reazioni infiammatorie e della condizione di leucocitosi.

1.1.4 Stress, produzione e riproduzione

Con riguardo alle produzioni animali, gli alti livelli di cortisolo che caratterizzano lo stato di stress cronico portano a ricadute negative a livello di performance produttive e riproduttive. Per esempio, la letteratura scientifica riporta che lo stress da caldo nelle bovine in asciutta porta a una riduzione della produzione di latte alla successiva lattazione tra il 14 e il 35% (Tao and Dahl, 2013). Oltre alla quantità, anche la qualità del latte è influenzata dalle condizioni ambientali, con una riduzione del contenuto proteico e di grassi durante la stagione estiva. Inoltre, riduce la crescita degli oociti e inibisce l'individuazione degli estri, rallentando dunque l'efficienza riproduttiva (Jordan, 2003).

1.1.5 Stress e sistema immunitario

Il collegamento tra sistema neuro-endocrino e sistema immunitario rende lo stress un potente modulatore della risposta immunitaria dell'individuo (Quan and Banks, 2007).

In particolare, l'adrenalina provoca l'attivazione del sistema immunitario e della risposta infiammatoria. Infatti, stimola la produzione di citochine pro-infiammatorie, la mobilitazione dei leucociti (picco linfociti NK a 30 minuti, picco neutrofili a 2-4 ore, aumento monociti), aumenta la risposta dei linfociti TH1, diminuisce l'espressione antivirale, attiva la fagocitosi dei neutrofili. La prima fase dello stress acuto, quindi, potenzia le difese dell'organismo, consentendo la pronta eliminazione degli agenti patogeni e la rapida risoluzione del processo infiammatorio.

Al contrario, il cortisolo svolge una funzione antinfiammatoria: tipicamente il processo infiammatorio viene attivato dall'adrenalina e risolto dal cortisolo. A livello basale, il cortisolo regola lo sviluppo di organi, tra cui la ghiandola mammaria e funziona da ripartitore di nutrienti nei vari tessuti dell'organismo. Inoltre, stimola le cellule fagocitarie, la maturazione dei leucociti, la produzione di anticorpi, le risposte cellulo-mediate. A livelli medio-alti, ma per brevi periodi, il cortisolo induce una risoluzione del processo infiammatorio inibendo la produzione di citochine e provoca un aumento del processo di riparazione cellulare. Inoltre, inibisce la liberazione di istamina, la diapedesi dei neutrofili, la sintesi di prostaglandine, i sintomi principali dell'infiammazione e cioè rubor, tumor, calor (antipiretico) e dolor. A concentrazioni elevate, il cortisolo ha invece un effetto immunodepressivo, riducendo in generale l'attività e il numero dei leucociti. Causa

inibizione delle difese aspecifiche, come chemiotassi, apoptosi, attività dei macrofagi, citotossicità dei linfociti NK e immunodepressione di alcune funzioni specifiche, per esempio spostamento di linfociti da TH1 a TH2, riduzione della produzione di citochine. Tutte queste modificazioni spiegano l'effetto immunosoppressivo di alti livelli di cortisolo. Negli ultimi venti anni, la letteratura scientifica ha dimostrato, operando in modelli animali, che la condizione di stress cronico è associata a un aumento del rischio di patologie cardio-vascolari, metaboliche, psicotiche, neurodegenerative e tumorali (Cohen, Janicki-Deverts and Miller, 2007).

1.1.6 Come misurare la risposta allo stress?

La connessione esistente tra livello di benessere e lo stress deriva dal fatto che la condizione di benessere/adattamento è raggiunta quando l'animale ha la capacità di affrontare e rispondere efficacemente agli stimoli e non solo quando c'è assenza di fattori di stress (Loor et al., 2013).

Sono stati proposti diversi indicatori per la valutazione dello stress cronico:

- comportamentali: comportamento normale o alterato (vocalizzazioni, irrequietezza, dolore, paura, deambulazione, riposo, atti ruminativi), stereotipie;
- di performance: produzione di latte, condizione corporea (BCS), fertilità, longevità, sviluppo corporeo (IMG), incidenza di patologie (infettive, metaboliche);
- fisiologici: parametri immunologici, parametri infiammatori, temperatura corporea, parametri metabolici ed ormonali.

Questi sono utili per monitorare lo stato funzionale degli animali in risposta ad interventi terapeutici o cambiamenti manageriali (Bertoni et al., 2008; Bertoni e Trevisi, 2013; Loor et al., 2013). Inoltre, con l'avvento di nuove tecnologie di monitoraggio del comportamento animale, come ad esempio i sensori che rilevano gli atti ruminativi o il tempo dedicato al riposo, è possibile individuare più semplicemente degli indicatori che evidenziano situazioni di distress (Soriani et al., 2012; Calamari et al., 2014; Trevisi et al., 2014; Rodriguez-Jimenez et al., 2018).

Presso il Dipartimento degli Animali, della Nutrizione e degli Alimenti (DiANA) dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza è stato sviluppato un ampio profilo metabolico, composto da diversi parametri e due indici composti, utilizzabili come

strumento per la diagnosi di problematiche sviluppatesi a seguito di errori nutrizionali-manageriali (Bertoni e Trevisi, 2013), specialmente nel periodo di transizione. Questo è utile sia per la valutazione della gestione aziendale a livello di mandria, sia per la valutazione a livello individuale, permettendo così anche il monitoraggio dell'incidenza di patologie cliniche e subcliniche. Inoltre, permette la quantificazione dello stato infiammatorio anche in soggetti senza evidenti segni clinici.

Il profilo metabolico (Piacenza) comprende i seguenti parametri ematici:

- *Metabolismo energetico*: Glucosio, Colesterolo, Acidi grassi non esterificati (NEFA), β -idrossibutirrato (BHB);
- *Metabolismo proteico*: Urea e Creatinina;
- *Immunità innata*: Aptoglobina, Ceruloplasmina (CuCp), Proteine totali, Albumine, Globuline, Paraonasi e Mieloperossidasi (MPO);
- *Funzionalità/danno epatico*: Aspartato transaminasi (GOT/AST), γ -Glutamilttranspeptidasi (GGT), Bilirubina totale e Fosfatasi alcalina (ALP);
- *Metabolismo minerale*: Calcio (Ca), Fosforo (P), Magnesio (Mg), Sodio (Na), Potassio (K), Cloro (Cl), Zinco (Zn).

La valutazione di questi viene fatta considerando i range di riferimento ed i valori basali riportati in bibliografia (Bertoni e Trevisi, 2013; Premi et al; 2021).

1.1.7 Stress e resilienza

La resilienza è la capacità di un organismo di essere minimamente influenzato dai disturbi o di tornare rapidamente allo stato in cui si trovava prima dell'esposizione allo stressore (Colditz and Hine, 2016). Dal punto di vista della ricerca, un forte interesse negli ultimi anni è stato indirizzato sull'argomento (Berghof, Poppe and Mulder, 2019). Infatti, di fronte alla variabilità dei cambiamenti climatici già in atto, avere un sistema agro-zootecnico resiliente permetterebbe di affrontare le sollecitazioni ambientali in modo efficiente, vale a dire minimizzando le perdite a livello ambientale ed economico.

Per esempio, l'effetto dello stress da caldo sulla produzione delle vacche da latte ha ovvie ricadute sulla sostenibilità economica delle aziende zootecniche; la perdita annuale dovuta allo stress da caldo nella filiera "dairy" negli Stati Uniti è stimata infatti intorno ai 1500 milioni di dollari USD (Liu et al., 2019).

Oltre alle ricadute a livello economico, non sono di minore importanza quelle a livello ambientale. Infatti, la letteratura scientifica ha dimostrato che al calare dell'efficienza produttiva aumenta l'impatto ambientale per unità di prodotto (Knapp *et al.*, 2014).

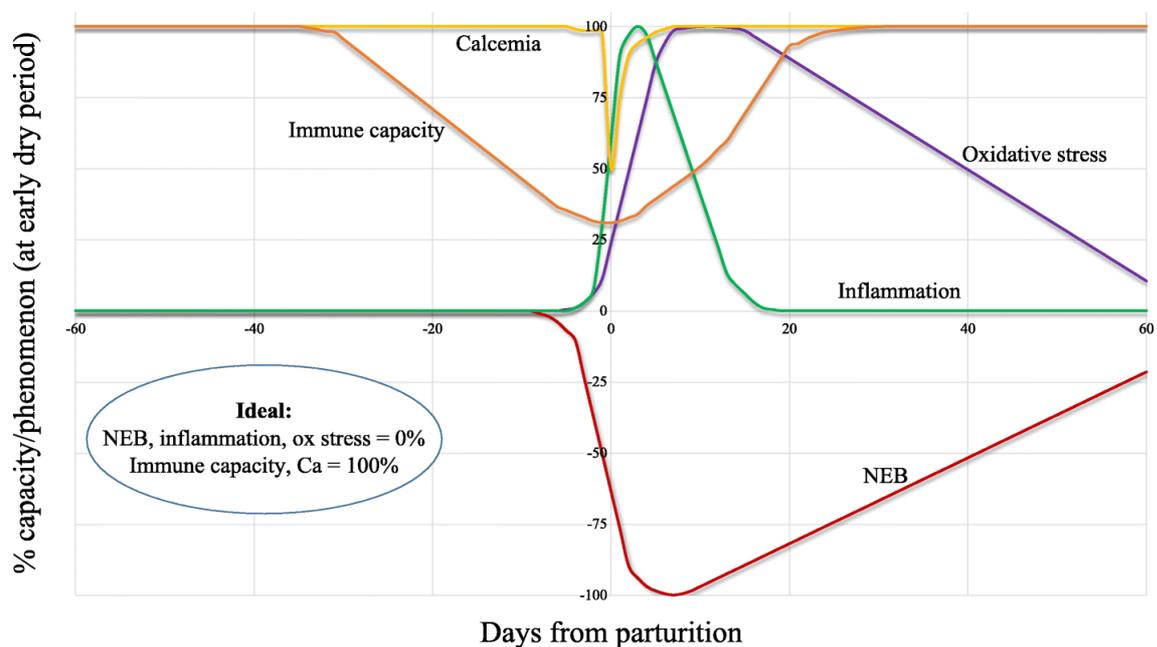
Gli indicatori di resilienza non sono ancora inclusi negli obiettivi di allevamento, nonostante la loro chiara importanza per la salute degli animali e il loro management (nonché per l'uniformità della produzione e l'efficienza produttiva). Ciò è probabilmente dovuto a una scarsa conoscenza su come definire, misurare e pesare gli indicatori di resilienza e i loro valori economici. Sebbene siano stati proposti suggerimenti per misurare la sensibilità ambientale (Knap, 2009b) (cioè la resilienza) e determinarne il valore economico (Knap, 2005), l'adeguata raccolta dei dati e gli strumenti di elaborazione dei dati sono stati considerati le principali sfide per l'attuazione (Knap, 2009b). I recenti sviluppi tecnologici consentono la raccolta di big data e la derivazione di nuovi fenotipi (Mulder, 2017). Questi sviluppi continueranno ad espandersi e diventeranno sempre più importanti in futuro. Sono quindi necessarie nuove idee per esplorare e sfruttare i big data e i nuovi fenotipi.

1.2 Il periodo di transizione

1.2.1 Definizione e caratteristiche

Il periodo di transizione comprende l'arco di tempo tra le tre settimane prima del parto e le prime tre settimane di lattazione. In questi 21 giorni, l'animale è soggetto a cambiamenti relativi alle concentrazioni ormonali, ai fabbisogni nutrizionali e all'immunocompetenza, oltre a trovarsi in una condizione di bilancio energetico negativo (NEB) a partire dalla fase finale della gravidanza (Mezzetti *et al.*, 2021). Si tratta inoltre di un periodo caratterizzato sovente da stress ossidativo, stato infiammatorio e da una condizione di ipocalcemia (Sordillo, Contreras and Aitken, 2009)(Figura 2). Di conseguenza, si verificano profondi cambiamenti metabolici nelle bovine, messi in atto al fine di mantenere l'equilibrio tra produzione di latte e omeostasi dei processi fisiologici (Ingvarstsen, 2006). Qualora l'adattamento alle condizioni del peri-parto risulti difficoltoso, viene compromessa la salute e il benessere animale; la letteratura scientifica dimostra infatti che la maggior parte delle patologie metaboliche (chetosi, ritenzione di

placenta, metrite ed endometrite, steatosi epatica, dislocazione dell'abomaso, mastite) si verificano nel primo mese di lattazione. (Trevisi *et al.*, 2011; Trevisi and Minuti, 2018)



(Trevisi and Minuti, 2018)

Figura 2 – pattern teorico dei cambiamenti nei principali aspetti fisiologici di soggetti sani durante il periodo di transizione.

In particolare, la diminuzione dell'assunzione di sostanza secca al momento del parto, unitamente all'aumentato fabbisogno energetico all'avvio della lattazione, porta all'instaurarsi di un bilancio energetico negativo all'inizio della lattazione, che è probabilmente uno dei principali problemi per garantire l'omeostasi metabolica nelle vacche da latte. L'eccessiva lipolisi e l'aumento dei livelli di acidi grassi non esterificati (NEFA) nel sangue delle vacche da latte durante la condizione di NEB intenso sono associati all'accumulo di trigliceridi (TG) negli epatociti e alla compromissione della funzionalità epatica con conseguente produzione elevata di corpi chetonici (acetoacetato, acetone e β -idrossibutirrato) (Esposito *et al.*, 2014). Questi ultimi, circolanti a livello ematico, vengono utilizzati come substrato energetico dai tessuti periferici, ma, se la loro produzione supera la capacità di utilizzo da parte dei tessuti, si accumulano nel sangue e provocano chetosi. Vengono considerati a rischio nel postparto (Trevisi, 2015) livelli ematici superiori a 1,0 mmol/L per i NEFA, in quanto indicatori di eccessiva

mobilitazione, e valori di oltre 1,2-1,4 mmol/L di β -idrossibutirrato (BHB) ritenuti soglia di chetosi subclinica.

Inoltre, durante il peri-parto, si assiste a una riduzione dell'immunocompetenza, e soprattutto a una "disregolazione" del sistema immunitario. Infatti, alcune funzioni sono ridotte, ma la suscettibilità all'infiammazione, uno dei più importanti meccanismi della difesa innata, è incrementata. Le differenze sono già rilevanti nell'ultima parte della gravidanza, e risultano particolarmente evidenti immediatamente dopo il parto.

Il rapporto tra linfociti TH1 (pro-infiammatori) e TH2 (anti-infiammatori) si abbassa durante la gravidanza e dovrebbe rialzarsi rapidamente al parto. Si registra inoltre un peggioramento della capacità di fagocitosi dei neutrofili e della proliferazione dei linfociti, parallelamente a una chiara riduzione della risposta immunitaria (anche a stimoli aseptici) e a un'intensa risposta infiammatoria sistemica. È evidente che il sistema immunitario in prossimità del parto sia disregolato e ciò può essere dovuto a fattori endocrini e metabolici; tuttavia, rimane da chiarire se la riduzione dell'immunocompetenza sia una condizione fisiologica o un segnale che indica la possibile futura insorgenza di problematiche metaboliche e infettive. Ciò che però è indicato dalla letteratura scientifica è che l'incidenza di una serie di stressori che attivi ripetutamente il sistema immunitario prima del parto causa una sempre maggiore risposta infiammatoria e una sempre minore risposta immunitaria cellulare (Trevisi and Minuti, 2018).

Il processo infiammatorio si verifica tipicamente a seguito di un insulto (es. patogeni, parto, stress metabolico, ...), che induce sia nelle cellule del sistema immunitario, sia - in misura minore - le cellule danneggiate, la sintesi di diversi mediatori biochimici con lo scopo di indurre infiammazione. Essa ha lo scopo di attrarre le cellule immunitarie verso l'area danneggiata, attivando di fatto la risposta immunitaria. I principali mediatori biochimici implicati in questo processo sono l'istamina e le citochine proinfiammatorie (PIC, Pro Inflammatory Cytokines). Le più importanti PIC sono il TNF (Tumor Necrosis Factor), le interleuchine (IL), gli interferoni (IFN) e le chemochine.

A livello sistemico, le citochine pro-infiammatorie promuovono la risposta di fase acuta nel fegato. Quest'ultimo, infatti, reagisce alle PIC dando luogo alla cosiddetta "risposta di fase acuta" (APR, Acute Phase Response), il fegato modifica la sintesi di numerose proteine. In particolare, produce le proteine positive di fase acuta (POSAPP) e riduce la sintesi delle proteine negative di fase acuta (NEGAPP) (Trevisi & Minuti, 2018).

Le principali POSAPP sono proteina C-reattiva, sieroamiloide A, aptoglobina, ceruloplasmina e fibrinogeno. Esse hanno lo scopo di proteggere l'organismo contro eventuali patogeni, agendo secondo diverse modalità: opsonizzando e intrappolando i microrganismi e i loro prodotti, attivando i complementi, legando remnants cellulari, neutralizzando enzimi, eliminando emoglobina libera e radicali, chelando numerosi minerali come Fe e Zn dal sangue riducendone la disponibilità per i possibili patogeni.

Le principali NEGAPP sono albumina, transferrina, enzimi come paraoxonasi, enzimi per la clearance della bilirubina, apolipoproteine, carrier di molecole lipofile, come RBP (Retinol Binding Protein). Esse vengono ridotte per diminuire la competizione per i substrati utili alla sintesi delle POSAPP. È importante sottolineare che, quando si verifica la APR, il fegato non è danneggiato, semplicemente cambia il profilo delle proteine che vengono sintetizzate.

È però rilevante sottolineare che la risposta infiammatoria sistemica che si verifica al momento del parto risulta essere evidente anche in assenza di infezioni o di patogeni. Tra le cause di questa disregolazione si trova una combinazione di fattori endocrini (sessuali, metabolici, comportamentali) e metabolici. A questi ultimi contribuisce l'errata gestione alimentare delle bovine durante la gravidanza. Si è visto infatti che le bovine obese prima del parto subiscono una sovraregolazione dei geni chiave associati con la risposta di fase acuta.

Questa risposta infiammatoria sembra essere correlata alla riduzione ed all'efficienza riproduttiva degli animali nel post-parto (Roche, Mackey and Diskin, 2000), ipotesi avvalorata anche da prove in cui si è evidenziato un rilevante miglioramento della fertilità somministrando acetilsalicilato dopo il parto (G. Bertoni et.al, 2004).

È stato inoltre osservato che durante il periodo di transizione l'insorgenza di stress ossidativo è molto più frequente rispetto ad altre fasi di lattazione. Lo stress ossidativo è uno squilibrio redox che si viene a verificare nel momento in cui è presente un eccesso di sostanze ossidanti rispetto alle sostanze antiossidanti (Bernabucci *et al.*, 2002). In presenza di insulti di varia natura, l'organismo aumenta la produzione di sostanze ossidanti come i radicali liberi dell'ossigeno (ROS) e dei suoi metaboliti (ROM), mettendo in difficoltà il sistema antiossidante nella loro rimozione e portando al fenomeno dello stress ossidativo. La forte incidenza di questo fenomeno nel periodo di transizione è dovuta all'elevata presenza di patologie metaboliche o infettive e agli

squilibri del metabolismo tipici di questa fase per l'avvio della produzione di latte. La maggiore attività metabolica, infatti, implica un aumento delle richieste di ossigeno e della produzione di radicali liberi da parte dei mitocondri come sottoprodotto della intensa respirazione cellulare (Halliwell, 2007). Fisiologicamente i ROS sono anche implicati in numerosi processi della risposta immunitaria, per la produzione di agenti battericidi ossidanti quindi, se si verificano eventi patologici si assiste ad un aumento di molecole ossidanti. Anche in caso di stress d'allevamento risulterà esserci un'aumentata produzione di ROS e ROM, dovuto all'aumentato consumo di ossigeno necessario per i meccanismi di adattamento allo stress.

Un'altra condizione che si verifica nel periodo di transizione è l'ipocalcemia, un disturbo del metabolismo minerale caratterizzato da una diminuzione significativa della concentrazione ematica di calcio nel periodo immediatamente successivo al parto. È infatti fisiologico che la rapidissima montata lattea dopo il parto determini una condizione di ipocalcemia transitoria, di fatto fisiologica; la deriva patologica è dovuta ad un adattamento dell'organismo insufficiente o troppo lento ai nuovi fabbisogni di calcio rapidamente cresciuti dopo il parto. I fattori di rischio per il verificarsi di questa dismetabolia sono diversi. Il rischio di ipocalcemia, infatti, aumenta progressivamente con l'età e con un'alimentazione ricca di calcio e fosforo nel periodo finale dell'asciutta. Questo avviene perché il fabbisogno giornaliero di calcio è totalmente coperto dall'assorbimento passivo intestinale che deprime pesantemente il richiamo attivo dalle riserve endogene (rene, ossa ecc.). Dopo il parto la richiesta urgente di calcio non potrà essere soddisfatta a causa della mobilizzazione molto lenta dalle riserve ossee.

1.2.2 Misurare l'adattamento al peri-parto

Per valutare lo stato di salute della bovina nel periparto possono essere utilizzati vari indicatori ematici. Alcuni forniscono informazioni utili riguardo lo stato metabolico, come glucosio, urea, BHB e NEFA, altri si riferiscono allo stato infiammatorio, come le proteine di fase acuta (APP), sia positive (POSAPP: aptoglobina, proteina C-reattiva, ceruloplasmina) che negative (NEGAPP: albumina, colesterolo, bilirubina, lipoproteine, RBP, paraoxonasi). Inoltre, al fine di meglio comprendere le condizioni delle bovine nel periparto e la capacità di superare tutte le sollecitazioni prima descritte, sono stati proposti indici complessi relativi alla attività e funzionalità epatica (Trevisi, Moscati and Amadori,

2016). Tra questi figurano il Liver Activity Index (LAI) e il Liver Functionality Index (LFI) (Bertoni and Trevisi, 2013a), che includono nel calcolo rispettivamente albumina, colesterolo totale e vitamina A come indicatore del carrier della vitamina stessa (RBP) e albumina, colesterolo e bilirubina totale.

Il LAI è un indice che stima gli effetti dello stato infiammatorio tipico del periparto in ciascuna bovina e fornisce un giudizio sul periodo di transizione e sulla futura lattazione; viene valutato entro allevamento. Si calcola attraverso la somma di tre indici parziali, ossia albumina, lipoproteine (misurate indirettamente dal colesterolo) e RBP (Retinol Binding Protein, misurata come retinolo). Ogni indice parziale viene calcolato sulla base delle concentrazioni ematiche del parametro a 7, 14 e 28 giorni dal parto (GDP) e si calcola sottraendo al dato di ciascuna bovina a 7, 14, 28 GDP il valore medio della popolazione controllata e dividendo il risultato ottenuto per la deviazione standard della popolazione. In seguito, per ogni bovina, si calcola la media dei dati ottenuti nei singoli GDP di ciascun parametro e, poi si sommano i tre indici parziali per ottenere il valore finale di LAI.

Poiché il periodo di transizione è caratterizzato da un aumento rilevante dell'infiammazione, con un incremento delle POSAPP e una diminuzione delle NEGAPP, valutare l'entità della risposta infiammatoria fornisce un'importante informazione sul grado di adattamento dell'animale al peri-parto. Per determinare l'effetto della risposta infiammatoria e quindi della capacità di adattamento della bovina è stato sviluppato il Liver Functionality Index (LFI). (Trevisi *et al.*, 2012) Questo indice definisce la condizione dell'animale sulla base della concentrazione di alcune NEGAPP, cioè albumina, colesterolo e bilirubina. Valori bassi (minori di 0) di LFI sono associati a un'alta risposta infiammatoria e scarso adattamento e viceversa. L'indice LFI è calcolato con la seguente formula:

$$LFI = \frac{(\text{albumin index} - 17,1)}{1,08} + \frac{(\text{cholesterol index} - 2,57)}{0,43} - \frac{(\text{bilirubin index} - 6,08)}{2,17}$$

È stato sperimentalmente confermato che vacche con basso LFI (alta risposta infiammatoria) possono essere chiaramente differenziate da quelle con alto LFI (bassa risposta infiammatoria), in termini di una minore incidenza di patologie dopo il parto e di

una minor concentrazione di citochine proinfiammatorie in prossimità del parto. Quindi è verosimile supporre che una risposta infiammatoria disregolata nelle settimane precedenti il parto determini una sorta di imprinting sulla successiva risposta immunitaria innata.

1.3 Effetto Genetico

1.3.1 Genetica e resilienza

Come spiegato nel precedente capitolo, il periodo di transizione mette a dura prova il metabolismo e il sistema immunitario delle bovine da latte. Per questo motivo, selezionare animali resilienti alle sollecitazioni metaboliche e ambientali comporterebbe evidenti vantaggi a livello di sostenibilità e di benessere animale. La necessità di includere la resilienza negli obiettivi di selezione genetica è stata negli ultimi anni sottolineata anche in risposta ai cambiamenti climatici in atto (Berghof, Poppe and Mulder, 2019). Una delle difficoltà riscontrate nell'avviare una selezione per la resilienza è l'identificazione di marcatori efficaci. La resilienza nel campo degli animali da reddito è infatti una caratteristica ad ampio spettro che coinvolge diversi aspetti, dal management alla nutrizione e alle condizioni climatiche. Tuttavia, il recente progresso tecnologico permette l'acquisizione di big data e da questi la possibilità di derivare fenotipi.

Nel frattempo, la letteratura scientifica ha confermato la presenza di una variabilità genetica che influenzi specifiche patologie nelle bovine da latte (Thompson-crispi *et al.*, 2014). Di conseguenza, nel corso degli anni è aumentato l'interesse per l'inclusione di caratteri legati alla salute ed al comportamento negli indici di selezione. Questi ultimi considerano però solo pochi caratteri legati al benessere animale, spesso in modo indiretto (ad es. conta delle cellule somatiche nel latte come indice di resistenza alle infezioni mammarie). La risposta allo stress è infatti un carattere complesso il cui controllo è esercitato da un largo numero di geni aventi ciascuno basso effetto additivo (controllo poligenico). Poiché la qualità di predizione del modello è strettamente influenzata dall'architettura genetica dei caratteri, quelli a controllo poligenico non sono di facile modellizzazione.

Tuttavia, nello studio di caratteri complessi, una efficace soluzione è la scomposizione del fenotipo finale di interesse (es. risposta allo stress) in specifici processi biologici (es.

metabolismo energetico, funzionalità epatica...) misurabili con bio-marcatori che vengono quindi considerati fenotipi intermedi (o “endo-fenotipi”). Recentemente sono stati sviluppati nuovi strumenti per lo studio della base genetica di caratteri complessi, per accelerare e rendere più efficiente il processo di selezione (precision breeding). Questi strumenti hanno permesso lo sviluppo di strategie di selezione genomica e di associazione tra migliaia di marcatori e caratteri bersaglio negli animali da reddito. Tra questi strumenti rientrano gli studi di associazione genome-wide (GWAS).

1.3.2 Studi di associazione genome-wide (GWAS)

Gli studi di associazione genome-wide (GWAS) vengono utilizzati per identificare varianti genetiche che influenzino il fenotipo di interesse. La prima GWAS fu applicata in medicina umana per studiare la degenerazione maculare correlata all'età, e fu pubblicata nel 2005 (Klein et al., 2005). Nel corso degli anni, il progresso scientifico e tecnologico ha facilitato ulteriormente l'applicazione di questo tipo di analisi, non solo in campo umano. Infatti, sono state rese disponibili le sequenze genomiche di molte specie animali, ed è stato identificato un largo numero di marcatori genetici (SNPs) come risultato del sequenziamento.

L'assunzione alla base delle GWAS è che associazioni significative possono essere identificate grazie al fatto che alcuni SNPs sono in linkage disequilibrium (fenomeno per cui due alleli a due loci adiacenti segregano insieme più frequentemente di quanto atteso se fossero indipendenti) con la mutazione causativa del carattere di interesse. Successivamente, analisi post-gwas possono essere applicate per risalire ai geni causativi. Sebbene le GWAS siano validi strumenti di analisi, è necessario ricordare che per potere raggiungere un adeguato potere statistico, serve procedere su una popolazione di larghe dimensioni, soprattutto se si tratta di caratteri complessi.

La maggioranza delle associazioni studiate negli ultimi anni negli animali da reddito, ha riguardato principalmente caratteri produttivi (es. produzione di latte, accrescimento, qualità della carne...), specifiche patologie oppure caratteri funzionali inclusi negli indici di selezione. Negli ultimi dieci anni, gli studi di associazione sono stati impiegati anche per lo studio di fattori di stress e risposte allo stress in molte specie di interesse economico. Tra questi, gli studi riguardanti lo stress termico sono i più frequenti (Hansen, 2011). Studi GWAS possono essere utili ad identificare marcatori genetici da impiegare, ad

esempio, in processi di selezione assistita da marcatori per la selezione di nuove razze resistenti a certi effetti dello stress; per esempio, identificando QTL e SNP associati alla regolazione della temperatura corporea. Alcuni studi (Howard et al., 2014), hanno già provato l'efficacia di questo approccio. Le analisi GWAS possono anche essere impiegate per migliorare la comprensione della biologia di un certo carattere, identificando geni in prossimità di un QTL (Cole et al., 2011; Berry et al., 2012, Dikmen S et al., 2013). Studi analoghi sono stati effettuati su specie evolutivamente distanti dai bovini come il pollo (Bjorkquist et al., 2014) e il pesce gatto (Jin et al., 2016), validando, quindi, l'approccio in generale.

1.3.3 GWAS sui marcatori della risposta allo stress

In un progetto precedente (PRIN 2011 “*Ricerca delle basi genetiche di nuovi fenotipi legati al benessere, all'efficienza ed alla sostenibilità ambientale delle produzioni dei bovini da latte - GEN2PHEN*”) coordinato da Università Cattolica del Sacro Cuore e pubblicato in (Milanesi et al., 2021), è stato condotto un esperimento di GWAS su diversi biomarcatori associati allo stress ematici (paraoxonasi, ceruloplasmina, GGT, creatinina, acidi grassi liberi, zinco) e nel latte (cortisolo) in bovine di razza Frisona e Pezzata Rossa Italiana. Circa 800 animali sono stati genotipizzati a 777.000 polimorfismi SNP. L'analisi GWAS è stata condotta con metodi tradizionali di associazione tra caratteri e marcatori individuali, correggendo le soglie di significatività in funzione dei test multipli utilizzati. È stata poi condotta un'analisi post-GWAS con il software MUGBAS (Multi species Gene-Based Association Suite) (Capomaccio et al., 2015) che identifica i segnali dei singoli SNP sui geni limitrofi. Questo approccio aumenta la potenza dei test statistici e identifica segnali che rimangono sotto la soglia di significatività con i metodi standard. I risultati del progetto hanno rivelato la presenza di associazioni significative tra marcatori SNP e alcuni biomarcatori ematici (GGT (figura 3), ceruloplasmina (figura 4) e paraoxonasi), alcuni dei quali identificati in entrambe le razze studiate.

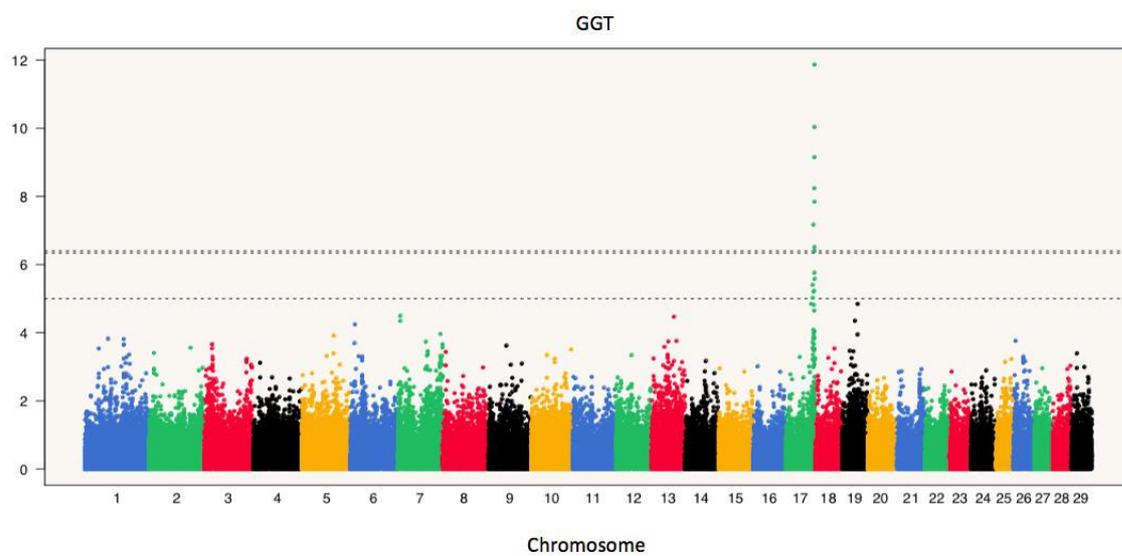


Figura 3 – Manhattan plot della gamma-glutamil transferasi.

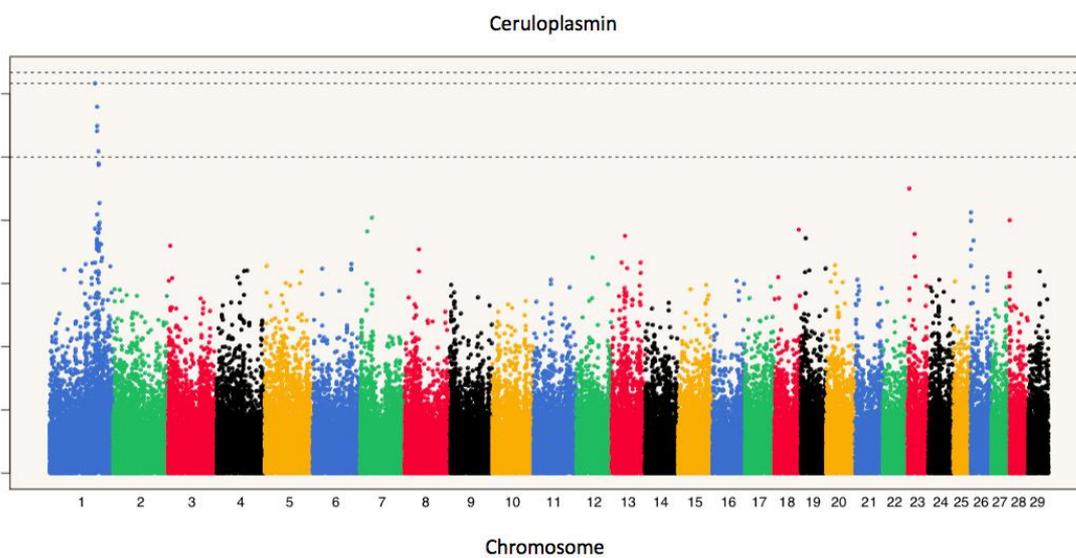


Figura 4 – Manhattan plot della ceruloplasmina.

2. Scopo della ricerca

Le bovine da latte sono esposte a sollecitazioni di tipo fisiologico, ambientale e manageriale nell'arco della loro carriera. Inoltre, i cambiamenti climatici in atto accentuano ulteriormente l'esposizione allo stress degli animali da reddito.

Sebbene nel breve periodo sia possibile individuare soluzioni di tipo manageriale e nutrizionale per migliorare la risposta allo stress degli animali, la genetica può fornire una risposta di lungo termine. In questo scenario, la resilienza alle condizioni stressanti acquisisce un interesse significativo come carattere target per fronteggiare le sfide rivolte al settore zootecnico da latte, tra cui la sostenibilità ambientale ed economica, il benessere animale e la limitazione nell'utilizzo di trattamenti farmacologici, specialmente quelli antibiotici.

Un passo in questa direzione era già stato fatto nel corso di un progetto di ricerca volto a indagare il controllo genetico di alcuni bio-marcatori ematici della risposta allo stress (Milanesi *et al.*, 2021), con l'individuazione di alcune interessanti associazioni per quanto riguarda ceruloplasmina, paraoxonasi e GGT ematiche. Tuttavia, il campione di animali oggetto dello studio aveva dimensioni limitate ed era composto da soli animali sani e in lattazione medio-avanzata.

Il presente lavoro ha quindi un duplice scopo: 1) di validare le associazioni precedentemente individuate in un campione più largo e indipendente, 2) di verificare in un periodo particolarmente stressante nel ciclo produttivo, il periodo di transizione la risposta delle bovine caratterizzate da un differente genotipo per i biomarcatori individuati per la loro implicazione nelle risposte di adattamento allo stress.

3. Materiali e metodi

La presente ricerca si è articolata in due fasi (Figura 5). La prima ha coinvolto animali clinicamente sani in lattazione con lo scopo di validare le associazioni biomarker-marcatore genetico identificate dal lavoro di Milanesi (Milanesi *et al.*, 2021). La seconda si è concentrata su animali nel periodo di transizione, quindi sotto stress metabolico, per verificare se il genotipo comportasse una differenza a livello di risposta allo stress.

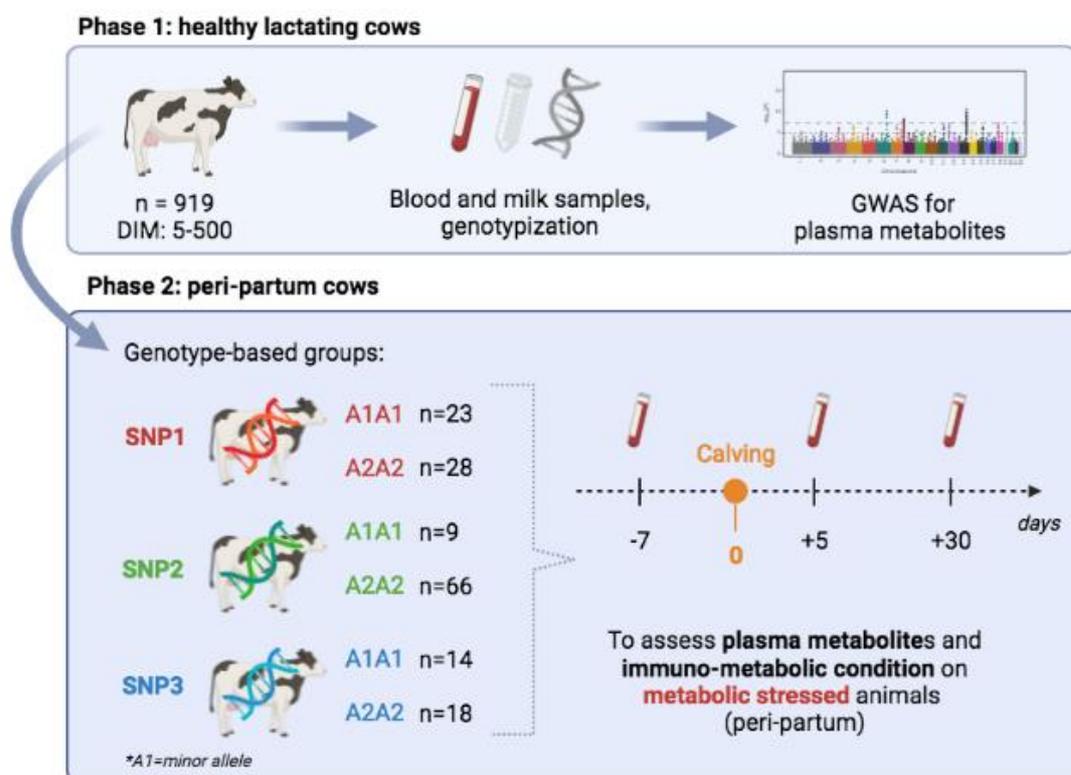


Figura 5 – Schematizzazione delle principali fasi della ricerca.

3.1 Fase 1

3.1.1 Animali

Il set di animali oggetto di studio è composto da 919 bovine di razza Frisone Italiana, tutte provenienti da un'unica azienda zootecnica commerciale sita in provincia di Piacenza. Le bovine, di cui 437 primipare e 482 pluripare, erano clinicamente sane in diversi stadi della lattazione (tra 5 e i 500 giorni di lattazione), ricoverate in una stalla a stabulazione libera, alimentate con unifeed (TMR) una volta al giorno e munte due volte al giorno. Gli animali sono stati campionati per sangue e latte nel periodo di tempo compreso tra settembre 2018 e luglio 2019.

3.1.2 Campionamenti e analisi su sangue e latte

Alla mattina, prima della distribuzione dell'unifeed, dalla vena giugulare sono stati raccolti campioni di sangue in due vacutainers da 10 ml ciascuna, contenenti rispettivamente Li-eparina e EDTA come anticoagulanti. Le provette con Li-eparina sono

state conservate a 6-8°C ed entro due ore dal prelievo e portate in laboratorio per il loro processamento. Una piccola parte del sangue raccolto è stata utilizzata per misurare l'ematocrito, il resto è stato centrifugato a 3,500 x g per 15 minuti a 4°C. Il plasma è stato poi congelato a -20°C in più aliquote, sino al momento delle analisi.

I metaboliti del plasma sono stati quantificati utilizzando il protocollo descritto da Calamari et al. (Calamari et al., 2016) utilizzando lo strumento ILAB 650, autoanalizzatore per biochimica clinica (Werfen, Italia). Sono stati misurati biomarcatori metabolici, del sistema immunitario, della funzionalità epatica e dello stress ossidativo, come descritto nella Tabella 1.

Funzione	Metaboliti
Metabolismo	Glucosio, colesterolo, urea, creatinina, acidi grassi non esterificati (NEFA), β -idrossi-butirrato (BHB), fosfatasi alcalina, calcio, fosforo, magnesio, sodio, potassio, cloro
Immunità e infiammazione	Aptoglobina, ceruloplasmina, globulina, zinco, albumina, paraoxonasi, mieloperossidasi
Funzionalità epatica	Aspartato transaminasi (AST/GOT), γ -glutamyltransferasi (GGT), bilirubina totale
Stress ossidativo	Metaboliti reattivi dell'ossigeno (ROS), prodotti proteici di ossidazione avanzata (AOPP), potere antiossidante ferrico riducente (FRAP)

Tabella 1 - elenco dei metaboliti misurati nel plasma suddivisi in base alla funzione a cui sono associati.

Lo stesso giorno dei prelievi di sangue sono stati raccolti anche campioni di latte, che sono stati analizzati per la conta delle cellule somatiche (SCC) usando la tecnologia NIR (FT-NIR FOSS 6000).

3.1.3 Genotipizzazione e controllo qualità

Il DNA è stato estratto dai campioni di sangue intero raccolto nelle provette con EDTA usando il kit GenElute Mammalian (Sigma Aldrich, Germany). La genotipizzazione è stata realizzata con l'array bovino GGP 100k (Neogen, Lincoln, NE, USA).

I dati genotipici grezzi (919 animali, 95'256 varianti) sono stati poi filtrati per la qualità dell'informazione usando il software Plink v1.9 (Purcell *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2015).

In particolare, sono stati considerati i parametri legati alla missingness per individuo e per marcatore, alla frequenza allelica minore (MAF) e all'equilibrio Herdy-Weinberg.

Il dataset genotipico che ha superato il controllo qualità risulta composto da 821 animali e 88'271 varianti.

3.1.4 Definizione del dataset

La prima fase dello studio si focalizza solo su vacche in salute; quindi, quelle con un valore di SCS maggiore di 400 mila cellule/ml di latte sono state rimosse dal dataset, in quanto questo valore è stato considerato come soglia per l'attribuzione di diagnosi di mastiti subcliniche. La distribuzione fenotipica di ciascuno dei parametri ematici è stata testata per la normalità con un test di Shapiro-Wilk; la rimozione degli outliers o opportune trasformazioni sono state applicate qualora fosse necessario per avvicinarsi a una distribuzione normale.

3.1.5 Studio di associazione genome-wide per singolo marcatore

Il dataset finale con animali caratterizzati sia dall'informazione genotipica che fenotipica è risultato composto da 739 animali. Lo studio di associazione per i metaboliti del plasma è stato realizzato utilizzando il software GCTA v1.93.2 con un modello con approccio:

$$y = \mu + Xb + Sa + Zu + \varepsilon$$

dove y è il vettore del fenotipo, μ è la media complessiva, b è il vettore degli effetti fissati inclusi nel modello, a è l'effetto fissato del genotipo SNP, u è il vettore di effetti random sugli animali e ε è il vettore di effetti random residui. X , S , Z sono le matrici di incidenza relative che mettono in relazione le informazioni fenotipiche rispettivamente con gli effetti fissi, SNPs e l'effetto animale. Gli effetti random si assumono normalmente distribuiti in base a $u \sim N(0, G_{\sigma_a^2})$ e $\varepsilon \sim N(0, I_{\sigma_e^2})$. In particolare, G è la matrice di

parentela genomica; σ_a^2 è la varianza genetica additiva; I la matrice di identità; σ_e^2 è la varianza dell'errore residuale. La matrice G è stata costruita con il software GCTA v1.93.2. Infine, è stata applicata una correzione di Bonferroni con soglia di significatività allo 0,05.

3.1.6 Studio di associazione genome-wide per gene

Studi di associazione per gene sono state testate utilizzando il “fast set-based association test” (fastBAT) del software GCTA v1.93.2, sulla base dei risultati delle GWAS per singolo marcatore e considerando il Linkage Disequilibrium tra gli SNP. In questo studio è stata considerata una regione di 50 kb a monte e a valle del gene. Anche in questo caso la significatività statistica è stata corretta con il test di Bonferroni con soglia allo 0,05.

L'ereditabilità dei caratteri significativi è stata calcolata come percentuale di varianza fenotipica spiegata da tutti gli SNPs. È stato applicato un algoritmo di maximum likelihood estimation (REML) per stimare le componenti della varianza. Successivamente, l'ereditabilità è stata stimata come rapporto tra varianza genetica e fenotipica usando la suite GCTA.

3.1.7 GWAS sui dati imputati

Con lo scopo di affinare l'identificazione della posizione del segnale, il dataset genotipico è stato imputato con il software BEAGLE a un dataset a densità superiore (800k), usando come dataset di referenza dati in-house provenienti da un precedente progetto (INNOVAGEN). I dati imputati sono stati filtrati usando come soglia il valore di $DR2=0.75$, un parametro legato alla qualità dell'imputazione fornito dal software. Le GWAS single-marker e gene-based sono state ripetute sul dataset imputato. Le analisi di GWAS sono state ripetute su questo dataset utilizzando lo stesso modello spiegato nel precedente paragrafo.

3.2 Fase 2

3.2.1 Animali

Le bovine in lattazione che sono state genotipizzate nella prima fase sono state analizzate per il genotipo ai tre SNP risultati significativamente associati rispettivamente con

ceruloplasmina, paraoxonasi, γ -glutamilttransferasi. Tra le 919 vacche, un gruppo è stato selezionato per essere studiato durante il periodo di transizione della lattazione seguente. Gli animali sono stati selezionati in base al loro genotipo al fine di ottenere gruppi di individui omozigoti opposti ad un locus ed eterozigoti agli altri due, per minimizzare gli effetti confondenti. I gruppi sono stati creati in modo da ottenere un numero bilanciato di animali omozigoti opposti; tuttavia, questo non è stato possibile per gli omozigoti opposti della paraoxonasi, a causa della frequenza allelica sbilanciata a quel locus nel campione. In totale sono stati scelti 158 animali, suddivisi in 6 gruppi, come specificato nella Tabella 2. Tutte le vacche erano pluripare, in stabulazione libera e alimentate una volta al giorno con TMR. Circa tre giorni dopo il parto, gli animali sono stati rimessi in gruppo lattazione e munti due volte al giorno.

Genotipo	Carattere associato al locus	N° di animali
A1A1	Ceruloplasmina	23
A2A2	Ceruloplasmina	28
A1A1	Paraoxonasi	9
A2A2	Paraoxonasi	66
A1A1	GGT	14
A2A2	GGT	18

Tabella 2 - dimensione dei gruppi campionati nella seconda fase. A1 è l'allele minore.

3.2.2 Campionamenti e raccolta dati

I campioni di sangue sono stati raccolti dalle 158 vacche scelte a -7 ± 3 , $+5 \pm 3$ e $+30 \pm 3$ giorni dal parto. È stata adottata la stessa procedura di campionamento descritta nella prima fase, ad eccezione dei campioni con le provette con EDTA come anticoagulante, in quanto gli animali erano già stati genotipizzati precedentemente. Il protocollo di analisi di laboratorio e il set di biomarcatori misurati nel plasma sono stati gli stessi della prima fase. Le concentrazioni plasmatiche di albumina, colesterolo e

bilirubina totale a +5 e +30 sono state utilizzate per calcolare il Liver Functionality Index (LFI) (Bertoni e Trevisi, 2013).

Contemporaneamente al prelievo di sangue, è stato valutato il Body Condition Score (BCS) con un metodo di punteggio da 1 a 4 punti (ADAS 1986). Lo stato di salute è stato monitorato nei primi 90 giorni di lattazione. La produzione di latte è stata registrata automaticamente giorno per giorno dal sistema Afimilk. Il tempo di riposo giornaliero è stato reso disponibile utilizzando i podometri Afifarm. I dati relativi al numero di inseminazioni artificiali e ai days open sono stati raccolti direttamente dal software di gestione aziendale.

3.2.4 Confronto tra gruppi

Prima dell'analisi, è stata verificata la normalità dei dati di riposo giornaliero mediante calcolo di indici di curtosi ed asimmetria (Shapiro test). I dati relativi ai livelli dei parametri metabolici e al BCS misurati a -7, +5 e +30 giorni dal parto e alla produzione settimanale dei primi 90 DIM sono stati sottoposti ad ANOVA utilizzando un modello lineare su R. Il modello utilizzato mira a capire se le differenze fenotipiche riscontrate nei valori ematici risultano significative. Le analisi statistiche vengono quindi effettuate facendo confronti tra gruppi di animali con genotipo omozigote opposto (ed eterozigote per gli altri). Il modello statistico applicato ha incluso l'effetto fisso della classe di genotipo (A1A1 e A2A2) (indica se i valori dei due gruppi sono diversi), dei tre time points (-7, +5, +30) (indica se in generale il metabolita varia di concentrazione nel tempo) e la loro interazione (indica se a seconda del tempo i due genotipi differiscono). L'effetto animale è stato considerato effetto random. Solo nel caso in cui l'interazione si sia rivelata significativa si è indagato in quali tempi si avesse questa significatività, in modo da avere un quadro più esplicativo possibile.

Si è considerata una differenza statisticamente significativa solo nel momento in cui l'interazione sia risultata significativa per $P < 0,05$. Si è tuttavia segnalata anche la tendenza alla significatività quando $P < 0,10$.

4. Risultati

4.1 Fase 1

4.1.1. Animali

Gli animali oggetto di studio nella fase uno della ricerca sono stati classificati in 12 classi di giorni di lattazione (ciascuna classe con estensione di 30 giorni) (Figura 6) e 3 classi di ordine di parto (Figura 7) (primipare, secondipare, più di due). Il dataset finale su cui è stato condotto lo studio di associazione è caratterizzato da DIM pari a 182.78 ± 101.67 (media \pm deviazione standard) e ordine di parto pari a 2.11 ± 0.98 (media \pm deviazione standard).

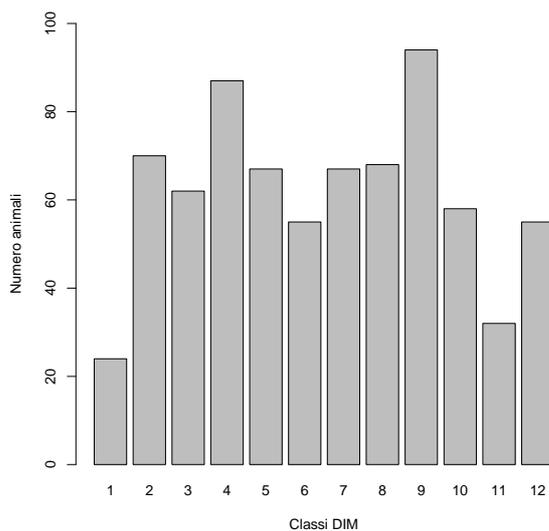


Figura 6 – Classificazione bovine per giorno di lattazione.

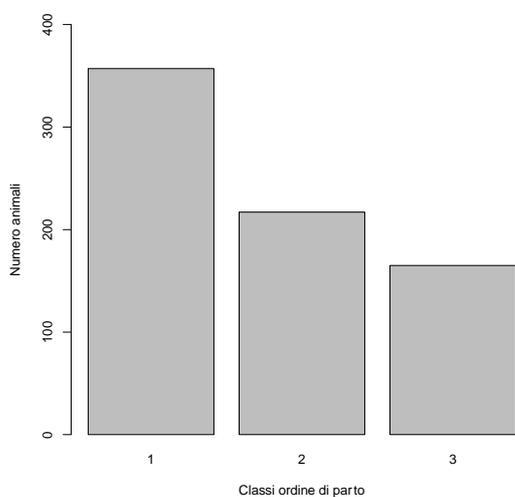


Figura 7 – Classificazione bovine per ordine di parto.

4.1.2 Metaboliti ematici

Le analisi metaboliche sui campioni ematici hanno misurato un set di 29 biomarcatori legati alla risposta allo stress. Una statistica descrittiva dei livelli misurati sul dataset finale (739 animali) è riportata in Tabella 3.

Metabolita	Unità di misura	Media	Deviazione standard
Albumina	mmol/l	37,378	2,125
AOPP	mcmol/l	49,462	8,972
Aptoglobina	g/l	0,304	0,272
BHB	mmol/l	0,532	0,179
Bilirubina	mcmol/l	2,136	1,025
Calcio	mmol/l	2,510	0,110
Ceruloplasmina	mcmol/l	1,849	0,590
Cloro	mmol/l	101,777	2,707
Colesterolo	mmol/l	5,285	1,243
Creatinina	mcmol/l	83,140	6,410
Fosfatasi alcalina	U/l	54,171	20,419
Fosforo	mmol/l	1,987	0,293
FRAP	mcmol/l	203,532	60,726
GGT	U/l	28,810	8,456
Globulina	g/l	43,607	5,388
Glucosio	mmol/l	4,366	0,330
GOT	U/ml	101,744	24,641
Magnesio	mmol/l	1,015	0,092
MPO	U/l	434,614	73,89
NEFA	mmol/l	0,113	0,122
Packaged cell volume	%	0,400	1,600
Paraoxonasi	U/ml	97,610	19,028
Potassio	U/l	4,191	0,383
Proteine totali	g/l	80,985	4,651
ROMt	U/l	12,621	4,024
SHp	mcmol/l	381,584	48,655
Sodio	mmol/l	142,212	2,756
Urea	mmol/l	6,481	1,048
Zinco	mcmol/l	11,662	2,22

Tabella 3 – Elenco dei biomarcatori utilizzati.

4.1.3 Associazioni genome-wide

Su tutti i bio-marcatori riportati in Tabella 3 è stato condotto uno studio di associazione a livello di singolo marcatore e di gene. I risultati hanno identificato associazioni significative per quattro bio-marcatori ematici, in particolare paraoxonasi, GGT, alcalinofosfatasi e zinco.

Il Single-SNP GWAS per la paraoxonasi ha identificato un segnale principale sul cromosoma 4 (BTA4) e uno minore sul cromosoma 16 (BTA16) (Figura 8). Il segnale significativo comprende il principale SNP identificato da Milanesi et al. (BovineHD0400003711) su BTA4. Quest'ultimo si trova in alto linkage disequilibrium (0,89) con il marcatore più significativo dello studio attuale (BovineHD0400003689, p-value= 1,37356e-16). In questo caso, lo SNP più significativo e altri due marcatori sul cromosoma 4 sono stati collocati all'interno di PON1 (*Paraoxonase 1*) (± 50 kb), segnalato come il gene più significativo dalla GWAS gene-based (p-value=3,57774e-15). Inoltre, tra i 21 geni significativi è stato individuato anche PON3 (*Paraoxonase 3*) (p-value=1.80585e-09). La soglia di significatività statistica è stata definita applicando la correzione di Bonferroni per $\alpha=0.05$.

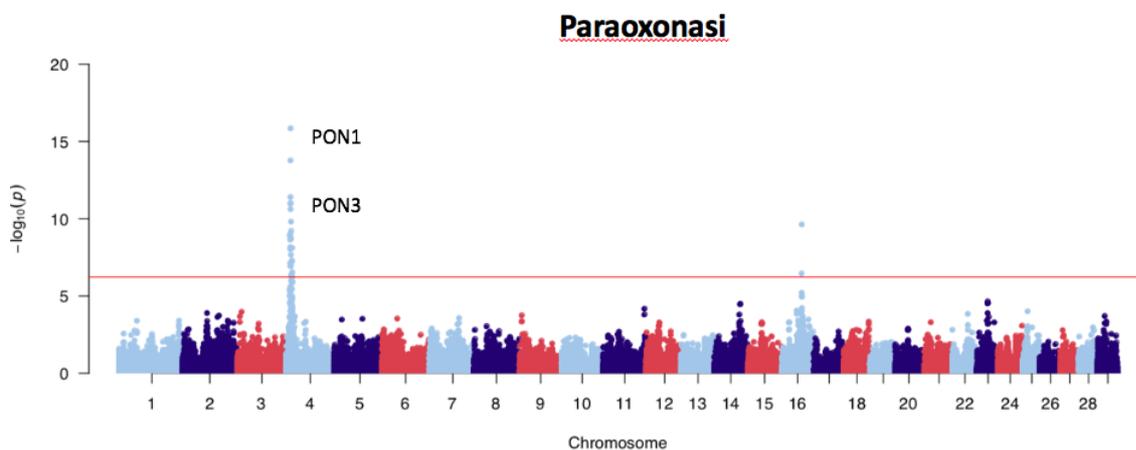


Figura 8 – Manhattan plot della paraoxonasi.

Per quanto riguarda GGT, il segnale significativo è stato identificato dal GWAS a singolo marcatore sul cromosoma 17 (BTA17) (Figura 9). Lo SNP più significativo identificato da Milanesi et al. (BTB-01973064) è il secondo più significativo nell'attuale studio e in alto LD con lo SNP principale (BovineHD1700021462, p-value = 1.21663e-45). Il

GWAS gene-based ha identificato GGT1 (*Gamma-Glutamyltransferase 1*) ($\pm 50\text{kb}$) come il gene associato piú significativo ($p\text{-value}=3,57774\text{e-}15$). Anche GGT5 (*Gamma-Glutamyltransferase 5*) è tra i primi cinque geni significativi, dopo SNPD3 (*small nuclear ribonucleoprotein D3*) e GUCD1 (*guanylin cyclase domain containing 1*).

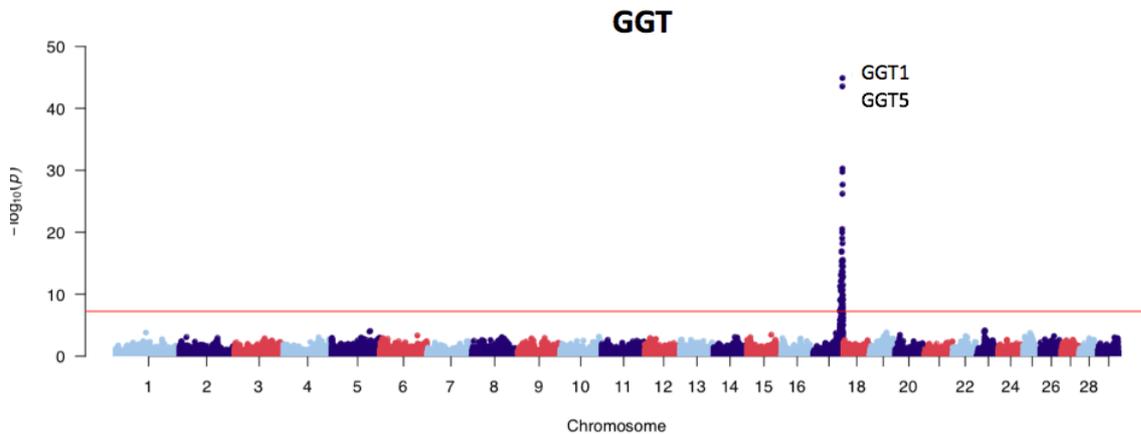


Figura 9 – Manhattan plot della Gamma Glutamil Tranferasi.

Dopo avere confermato i segnali per paraoxonasi e GGT individuati nello studio di Milanesi, la presente ricerca ha individuato due nuove associazioni. In particolare, è stato individuato un segnale significativo per la fosfatasi alcalina e per lo zinco, entrambi sul cromosoma 2 (BTA2) ma con diverse posizioni. Per quanto riguarda la fosfatasi alcalina, la GWAS gene-based ha identificato ECE1 (*Endothelin-Converting Enzyme 1*) ed ECEL1 (*Endothelin Converting Enzyme Like 1*) ($\pm 50\text{kb}$) come i geni piú significativi tra quelli associati, tra cui risulta anche ALPL (*Alkaline Phosphatase*) (Figura 10).

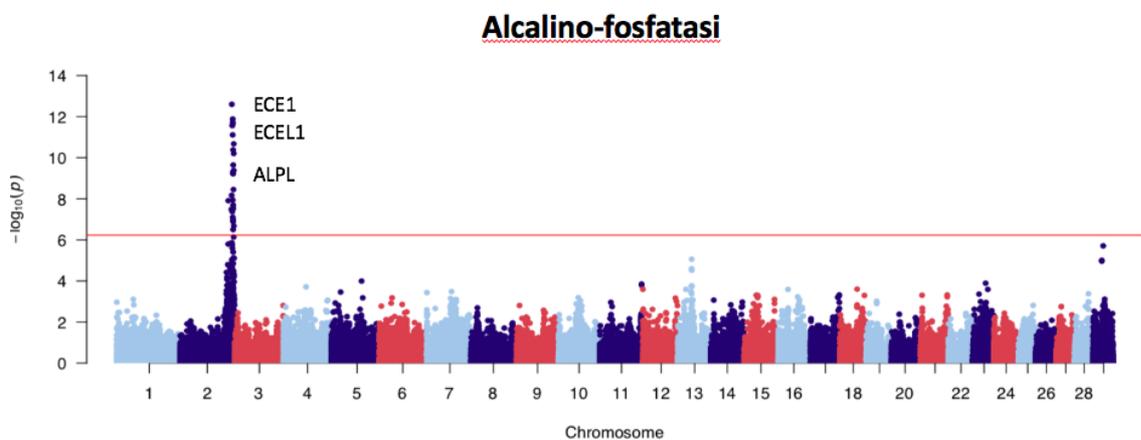


Figura 10 – Manhattan plot dell'Alcalino-fosfatasi.

Infine, il segnale significativo dello zinco individuato su BTA2 (Figura 11) risulta associato al gene TRIM63 (*Tripartite Motif Containing 63*) secondo i risultati della GWAS gene-based.

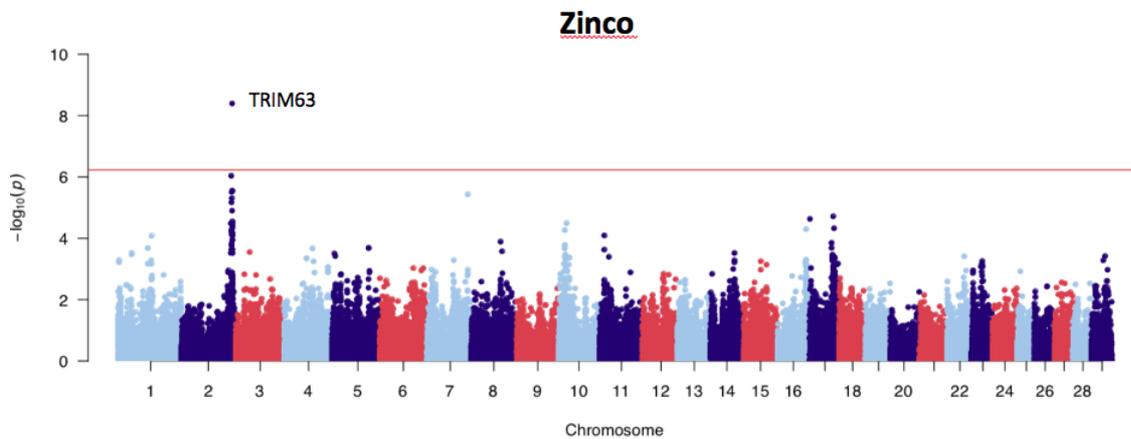


Figura 11- Manhattan plot dello zinco.

L'ereditabilità calcolata per ciascuno dei quattro caratteri varia da un minimo di 0,37 per lo zinco al massimo di 0,57 per la GGT (Tabella 4); questi valori concordano con i risultati individuati dalle analisi GWAS, in cui il controllo genetico sembra essere esercitato da un singolo segnale principale.

Carattere	Ereditabilità	Errore standard
Paraoxonasi	0,5601	0,0711
Gamma-glutamyl transferasi	0,5719	0,0734
Alcalino-fosfatasi	0,4071	0,0722
Zinco	0,3680	0,0751

Tabella 4 – Ereditabilità per i 4 caratteri significativi.

Le GWAS effettuate sui dataset imputati hanno confermato la posizione e i geni individuati sul dataset originale 100k. (Figure 12,13,14,15)

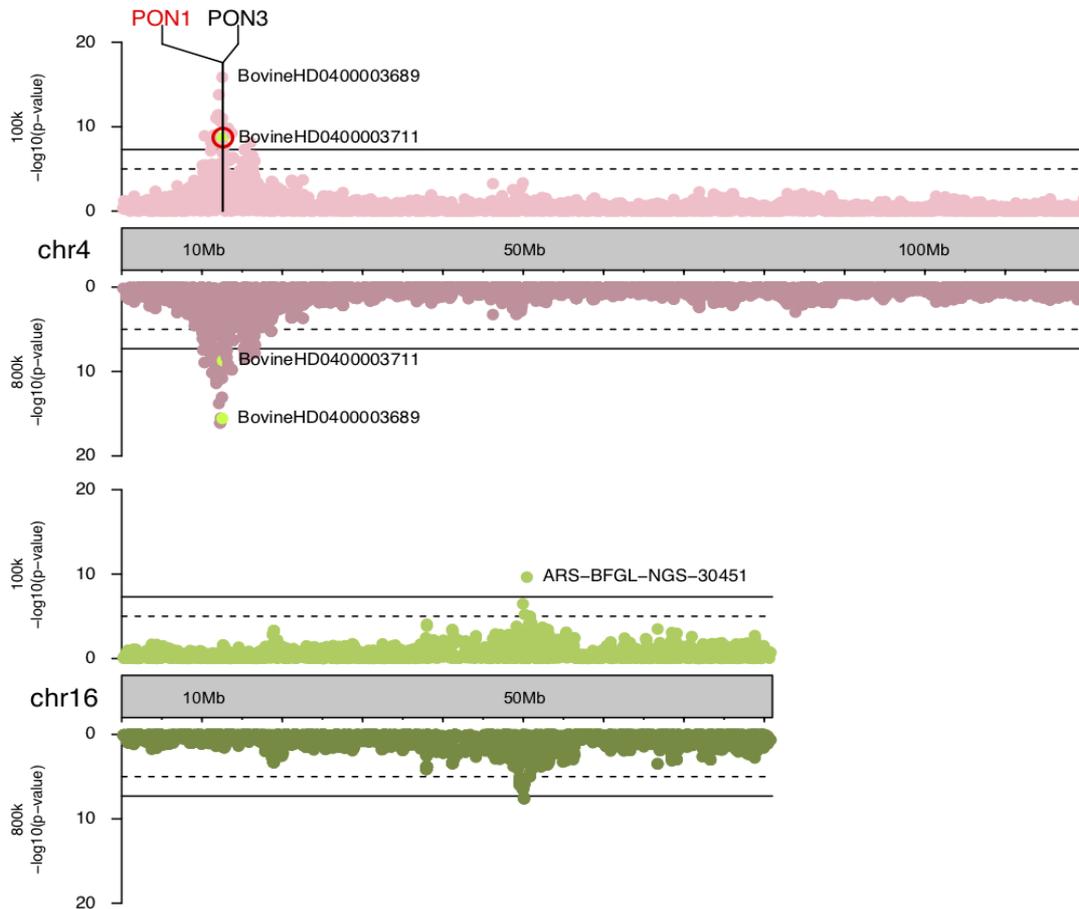


Figura 12 - Manhattan plot dei segnali significativi sul cromosoma 4 e 16 risultanti dalla GWAS single-marker per la paraoxonasi. Le analisi sono state condotte sul dataset genotipizzato (100k, in alto) e imputato (800k, in basso). Sul cromosoma 4, lo SNP *BovineHD0400003711* è il più significativo individuato nello studio di Milanese et al., 2021. I geni riportati sono quelli con significatività più elevata risultanti dall'analisi GWAS gene-based condotta sia sul dataset 100k che 800k.

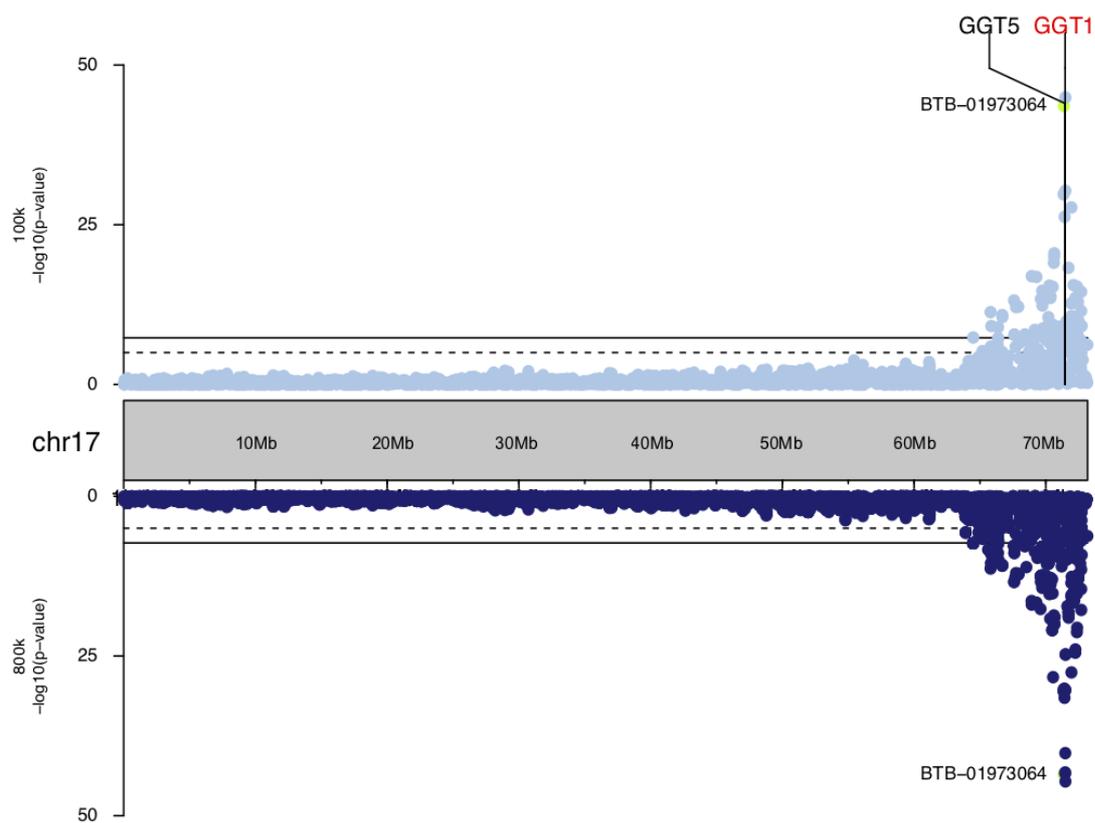


Figura 13 - Manhattan plot dei segnali significativi sul cromosoma 17 risultanti dalla GWAS single-marker per la GGT. Le analisi sono state condotte sul dataset genotipizzato (100k, in alto) e imputato (800k, in basso). Lo SNP BTB-01973064 è il più significativo individuato nello studio di Milanesi et al., 2021. I geni riportati sono quelli con significatività più elevata risultanti dall'analisi GWAS gene-based condotta sia sul dataset 100k che 800k.

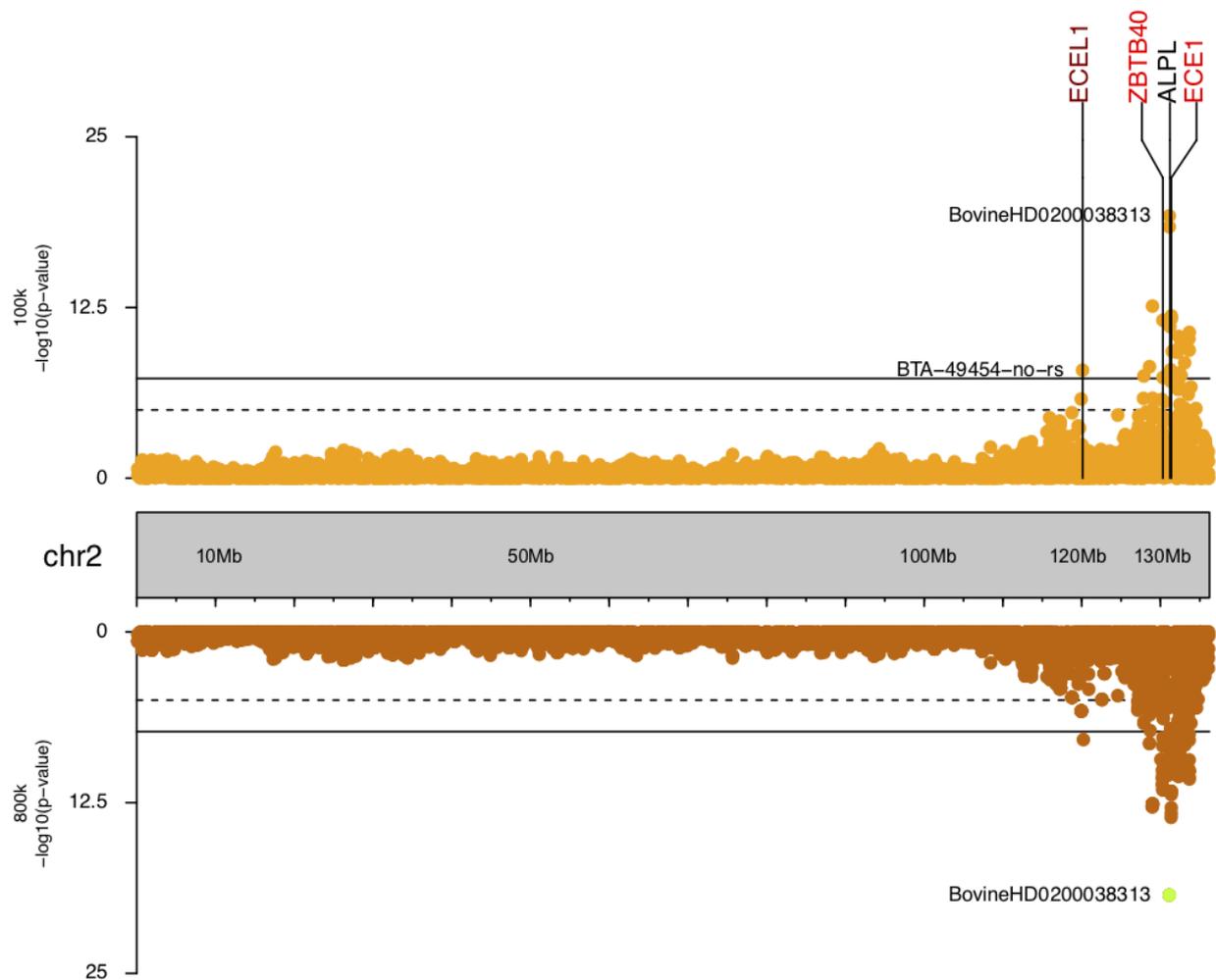


Figura 14 - Manhattan plot dei segnali significativi sul cromosoma 2 risultanti dalla GWAS single-marker per alcalino-fosfatasi. Le analisi sono state condotte sul dataset genotipizzato (100k, in alto) e imputato (800k, in basso). I geni riportati sono quelli con significatività più elevata risultanti dall'analisi GWAS gene-based condotta sia sul dataset 100k che 800k.

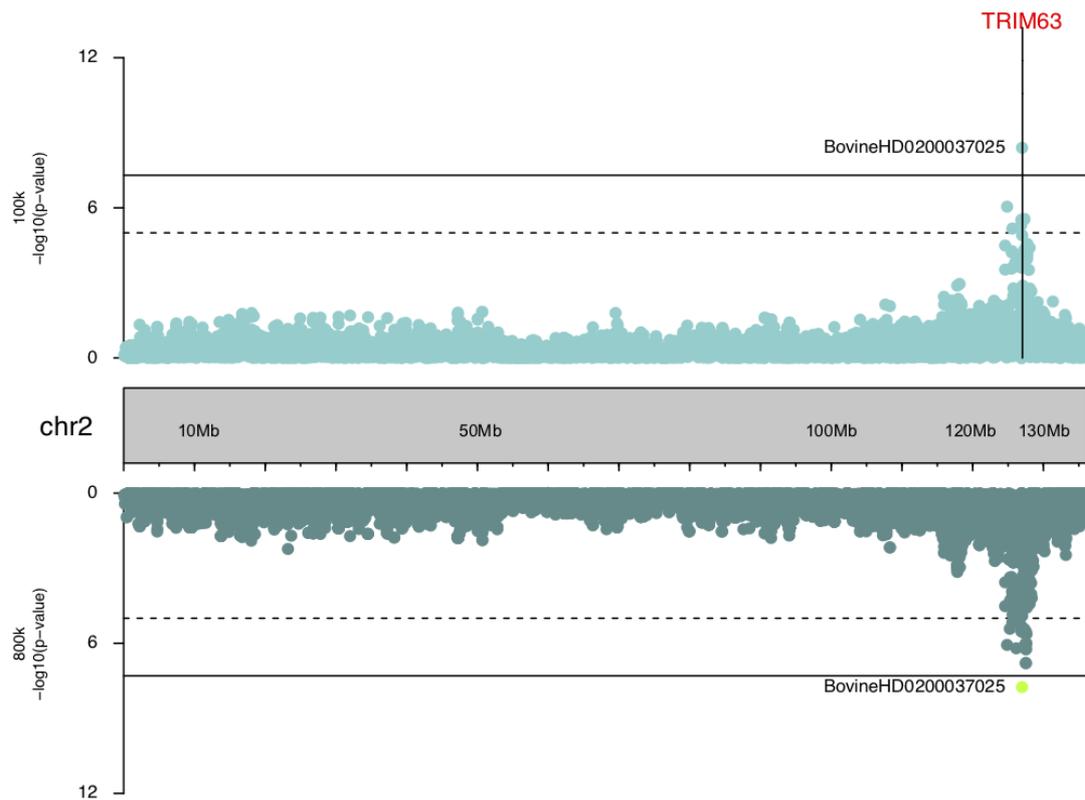


Figura 15 - Manhattan plot dei segnali significativi sul cromosoma 2 risultanti dalla GWAS single-marker per zinco. Le analisi sono state condotte sul dataset genotipizzato (100k, in alto) e imputato (800k, in basso). I geni riportati sono quelli con significatività più elevata risultanti dall'analisi GWAS gene-based condotta sia sul dataset 100k che 800k.

4.2 Fase 2

4.2.1 Animali

Nella seconda fase sono stati valutate le differenze tra le bovine nel corso del loro periparto raggruppate in funzione delle sei classi genotipiche individuate dalla fase 1 della ricerca. Nella tabella n.5 sono rappresentate le sei classi genotipiche, il carattere associato, la numerosità dei soggetti monitorati e l'ordine di parto. Il numero di lattazioni è risultato analogo in tutte le classi, ma si è evidenziata una certa differenza numerica tra i due genotipi associati alla ceruloplasmina, dove il genotipo A1A1 ha mostrato oltre -0,5 parti in meno di A2A2.

Genotipo	Carattere associato al locus	N° animali	Ordine di parto (media ± deviazione standard)
A1A1	GGT	14	3.17 ± 0.94
A2A2	GGT	18	3.13± 1.09
A1A1	Paraoxonasi	9	3.33 ± 0.87
A2A2	Paraoxonasi	66	3.04 ± 1.03
A1A1	Ceruloplasmina	23	2.85 ± 0.99
A2A2	Ceruloplasmina	28	3.43 ± 0.93

Tabella 5 – Suddivisione nelle classi genotipiche degli animali utilizzati nella prova.

4.2.2 Produzione

Nelle figure 18 (genotipo GGT), 19 (genotipo PON), 20 (genotipo CuCp) sono riportati gli andamenti della produzione di latte (in kg) misurata giornalmente nei primi 90 giorni di lattazione nelle bovine utilizzate per la prova. In tutti i gruppi genotipici si è verificato un andamento pressoché analogo, in quanto la produzione è aumentata progressivamente fino al 40° DIM, per poi attestarsi poco al di sotto dei 50 litri/capo/giorno.

Il confronto ANOVA della produzione settimanale tra i gruppi genotipici non ha individuato differenze significative (tabella 6) tra i genotipi.

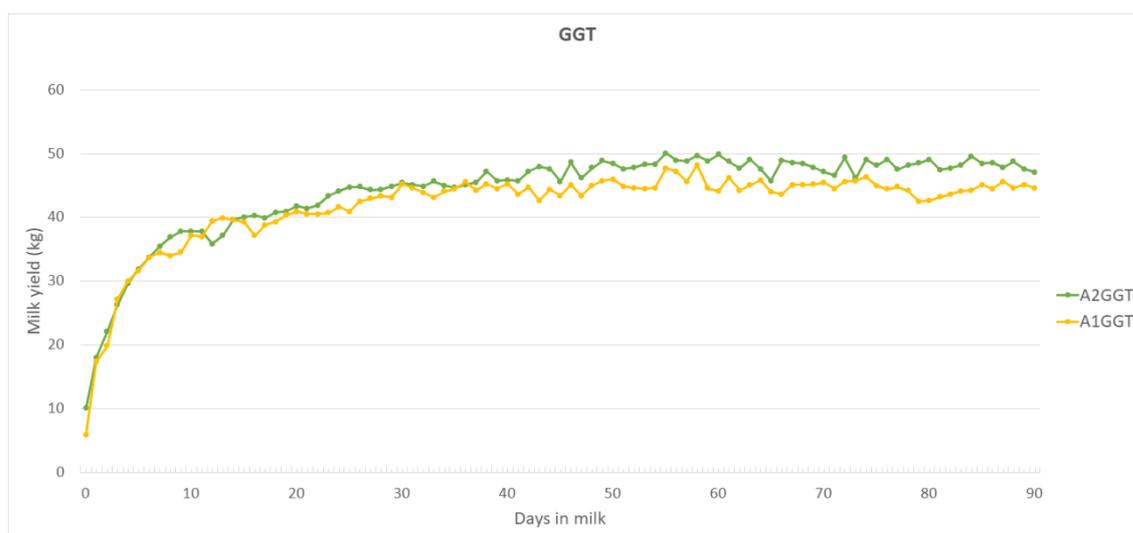


Figura 18 – Grafico dell'andamento giornaliero della media di gruppo per la produzione di latte (Kg) nei due gruppi omozigoti opposti per il genotipo GGT.

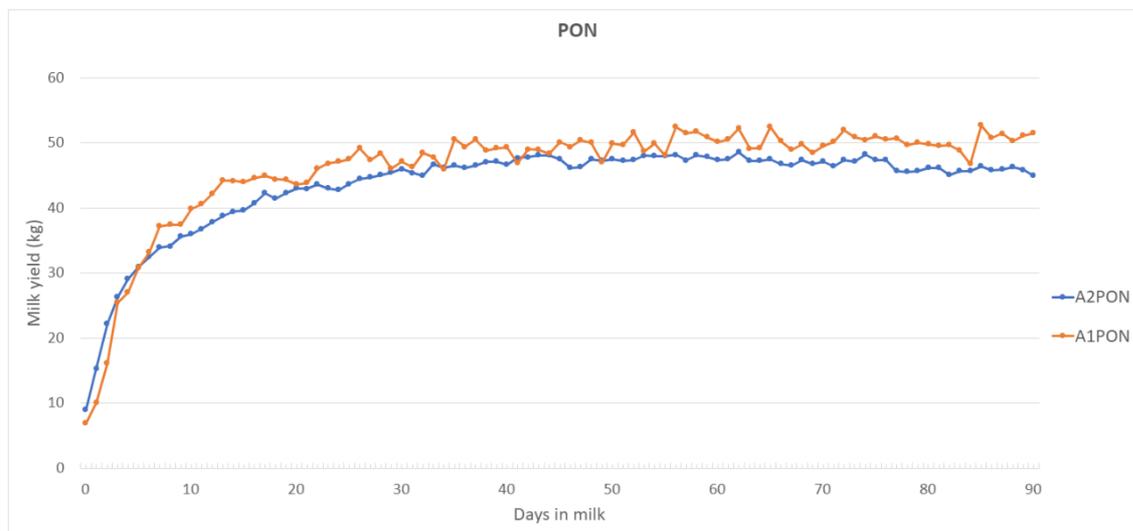


Figura 19 – Grafico dell'andamento giornaliero della media di gruppo per la produzione di latte (Kg) nei due gruppi omozigoti opposti per il genotipo PON.

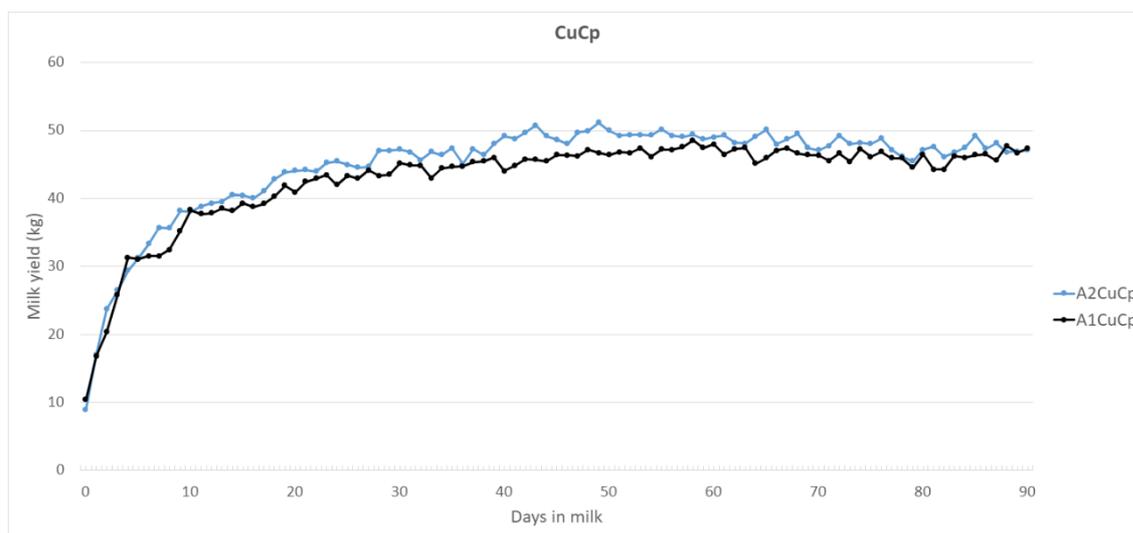


Figura 20 – Grafico dell'andamento giornaliero della media di gruppo per la produzione di latte (Kg) nei due gruppi omozigoti opposti per il genotipo CuCp.

Gruppi	p-values		
	Genotipo	Settimana	Genotipo:Settimana
GGT	0,3418	<2e-16	0,8564
PON	0,2535	<2e-16	0,6369
CuCp	0,4157	<2e-16	0,5542

Tabella 6 – Risultati del confronto ANOVA per testare differenze nella produzione di latte nei gruppi di animali con genotipo omozigote opposto.

4.2.3 Body Condition Score

Nella tabella 7 è stato riportato l'andamento dei Body Condition Score (BCS) rilevati nelle bovine in prova, riportato nella tabella n.7 e nelle figure 21, 22, 23 rispettivamente per GGT, PON e ceruloplasmina. Pur arrivando al parto con piccole differenze nel BCS, si può notare che, tutti i gruppi di animali, presentano un andamento molto simile. Dopo il parto, si verifica una leggera e progressiva diminuzione fino a 30 DIM in tutti i casi. In media nella valutazione effettuata a 30 DIM le bovine hanno ridotto circa 0,3 punti di BCS.

I gruppi sono stati sottoposti ad analisi statistica, e dai confronti dei BCS nei diversi tempi per i diversi genotipi non sono emerse differenze significative (tabella 7).

Parametro	Gruppo	Tempo			SEM	p-values		
		-7	+5	+30		Genotipo	tempo	Genotipo*Tempo
BCS	A1GGT	2,66	2,48	2,39	0,0502		***	
	A2GGT	2,67	2,46	2,35		0,699	1,23E-08	0,8771
	A1PON	2,63	2,5	2,36	0,0556		***	
	A2PON	2,72	2,42	2,4		0,76904	1,64E-09	0,1134
	A1CuCp	2,78	2,48	2,42	0,0391		***	
	A2CuCp	2,74	2,45	2,38		0,2354	<2e-016	0,9599

Tabella 7 – Media dei BCS di ogni gruppo ai 3 tempi del prelievo. Segue il confronto ANOVA per testare differenze nelle variazioni di BCS tra i gruppi di animali con genotipo omozigote opposto.

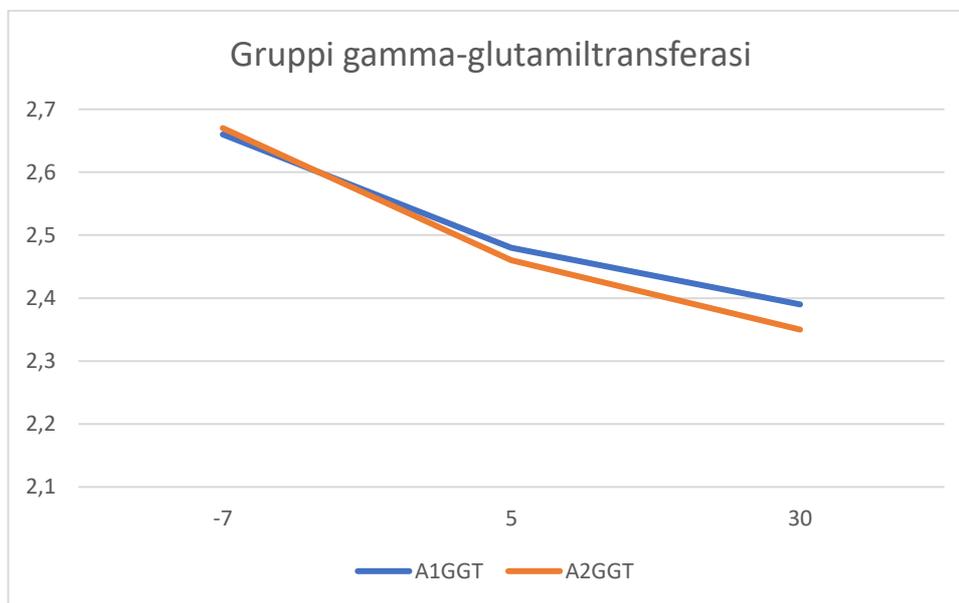


Figura 21 – Grafico dell'andamento dei BCS (media di gruppo) nei due gruppi omozigoti opposti per GGT.

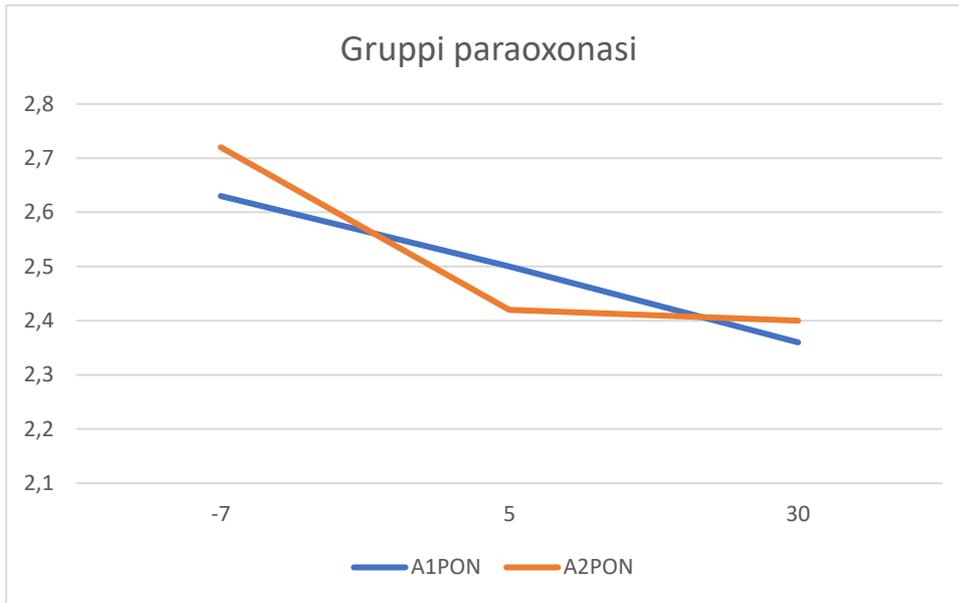


Figura 22 – Grafico dell'andamento dei BCS (media di gruppo) nei due gruppi omozigoti opposti per PON.

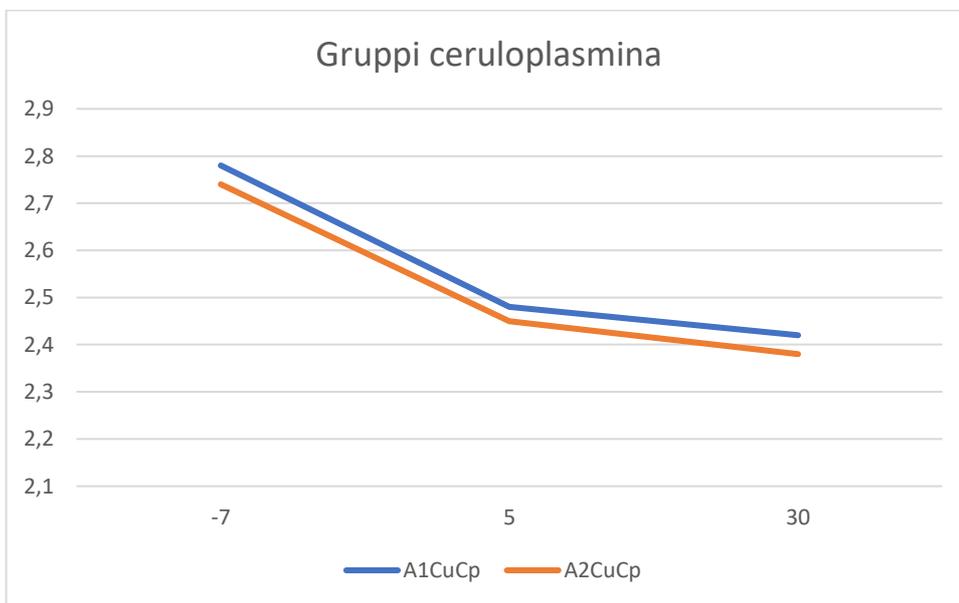


Figura 23 – Grafico dell'andamento dei BCS (media di gruppo) nei due gruppi omozigoti opposti per CuCp.

4.2.4 METABOLISMO

I metaboliti misurati sugli animali campionati nel periparto hanno mostrato i seguenti valori medi riportati in tabella 8.

METABOLITA	MEDIA -7 ± DEV.STD	MEDIA +5 ± DEV.STD	MEDIA +30 ± DEV.STD
Glucosio (mmol/l)	4,14 ± 0,50	3,84 ± 0,62	4,10 ± 0,57
Colesterolo (mmol/l)	2,75 ± 0,71	2,17 ± 0,61	3,93 ± 0,96
Urea (mmol/l)	4,2157 ± 1,13	4,95 ± 1,29	5,84 ± 1,34
Ca (mmol/l)	2,54 ± 0,1659	2,36 ± 0,17	2,43 ± 0,17
P (mmol/l)	1,92 ± 0,30	1,59 ± 0,36	1,61 ± 0,30
Mg (mmol/l)	0,92 ± 0,11	0,84 ± 0,13	0,94 ± 0,13
Na (mmol/l)	148,34 ± 4,46	146,97 ± 3,73	144,87 ± 3,81
K (U/l)	4,27 ± 0,35	3,93 ± 0,35	3,85 ± 0,39
Cl (mmol/l)	109,38 ± 4,10	104,48 ± 3,61	102,17 ± 4,38
Zn (mcmol/l)	12,23 ± 2,41	10,43 ± 2,54	10,62 ± 3,21
CuP (mcmol/l)	1,44 ± 0,64	2,41 ± 0,51	2,39 ± 0,59
Proteine tot (g/l)	75,58 ± 8,81	74,89 ± 6,43	81,24 ± 7,97
Globuline (g/l)	40,71 ± 7,45	41,40 ± 5,84	45,64 ± 7,18
Albumina (g/l)	34,87 ± 3,36	33,50 ± 2,77	35,60 ± 2,83
GGT (U/l)	20,0661 ± 5,2321	20,76 ± 8,48	29,81 ± 23,91
GOT (U/ml)	69,60 ± 18,93	102,20 ± 26,13	86,56 ± 30,31
Bilirubina tot (mcmol/l)	2,61 ± 1,88	6,19 ± 5,14	2,81 ± 3,58
ALP (U/l)	38,47 ± 15,16	39,54 ± 11,26	39,59 ± 12,42
Aptoglobina (g/l)	0,29 ± 0,27	0,76 ± 0,36	0,32 ± 0,26
NEFA (mmol/l)	0,33 ± 0,20	0,56 ± 0,37	0,34 ± 0,28
BHB (mmol/l)	0,35 ± 0,14	0,81 ± 0,76	0,60 ± 0,90
Creatinina (mcmol/l)	98,03 ± 15,08	87,83 ± 11,17	79,64 ± 9,63
AOPP (mcmol/l)	60,93 ± 22,67	44,87 ± 16,38	52,67 ± 13,84
PON (U/i)	76,25 ± 21,67	71,05 ± 23,66	86,74 ± 25,57
FRAP (mcmol/l)	128,30 ± 27,77	162,90 ± 28,71	162,42 ± 61,48
SHp (mcmol/l)	272,73 ± 48,63	268,45 ± 47,48	291,76 ± 52,65
MPO (U/l)	433,60 ± 58,09	464,92 ± 57,33	419,08 ± 61,02
ROM tot (U/l)	6,86 ± 3,35	10,94 ± 3,37	10,13 ± 4,06

Tabella 8 – Statistica descrittiva dei valori medi dei metaboliti riscontrati nel sangue di tutte le bovine in prova.

Di seguito è riportata una descrizione del significato funzionale dei metaboliti misurati nel corso del parto.

Metabolismo

Glucosio

Costituisce un indicatore del metabolismo energetico.

Tipicamente si abbassa lievemente nell'immediato postparto per poi risalire. Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

Colesterolo

Costituisce un indicatore del metabolismo energetico e dell'attività epatica in quanto è un indicatore delle lipoproteine. Tipicamente aumentano in avvio di lattazione per mettere a disposizione dei tessuti i lipidi mobilizzati dal tessuto adiposo come NEFA. La sintesi delle lipoproteine più rappresentate nel plasma bovino avviene nel fegato ed è opportuno sottolineare che la sintesi della componente proteica è ridotta in presenza di problematiche infettivo-infiammatorie. Per cui un livello ridotto di colesterolo nel sangue è spesso la conseguenza della ridotta sintesi epatica di lipoproteine (negapp).

Tipicamente si abbassa nell'immediato postparto per poi risalire (Bertoni and Trevisi, 2013b).

Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

NEFA

Costituiscono un indicatore molto importante e rappresentativo del metabolismo energetico in quanto fungono da indicatori della mobilizzazione del tessuto adiposo.

Tipicamente si innalzano nell'immediato postparto per poi ritornare a livelli molto bassi, solitamente inferiori rispetto a quelli dell'immediato parto.

Questo perché l'animale nella prima fase della lattazione anche quando ricomincia a mangiare in modo consistente non è in grado di coprire i fabbisogni e mobilita riserve corporee per sostenere la produzione di latte.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

BHB

Costituisce un indicatore del metabolismo energetico.

Nel momento in cui l'organismo si trova in una situazione di bilancio energetico negativo vengono mobilizzate le riserve di grasso che il fegato deve ossidare o rimettere in circolo nelle lipoproteine. In carenza di energia, l'ossidazione degli acidi grassi nel fegato è incompleta e si verifica la formazione di corpi chetonici e talora l'accumulo di trigliceridi nel fegato.

Tipicamente si innalzano nell'immediato postparto per poi ritornare a livelli più bassi, ma comunque maggiori rispetto a quelli del parto. (Bertoni and Trevisi, 2013b), anche perché una quota di BHB deriva dall'assorbimento di acido butirrico dal rumine.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

Urea

Indicatore del metabolismo proteico.

Deriva dall'ossidazione a livello del fegato dell'ammoniaca o per deaminazione di aminoacidi utilizzati per la gluconeogenesi (il chetoacido viene utilizzato nel ciclo di Krebs mentre l'ammonio viene liberato e contribuisce al livello ematico di urea). Per questo l'urea è un importante indicatore del metabolismo energetico e proteico.

Tipicamente si innalzano nell'immediato postparto per poi ritornare a livelli inferiori, ma comunque maggiori rispetto a quelli del parto in quanto il consumo di proteine è decisamente maggiore in lattazione.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

Creatinina

Costituisce un indicatore del metabolismo proteico. In particolare, è un indicatore grezzo della massa muscolare dell'animale, ma in presenza di carenza energetica e proteica (nel breve periodo) rappresenta anche una misura del grado di degradazione delle proteine muscolari.

Tipicamente si assiste ad un calo dopo il parto che persiste anche nelle prime fasi della lattazione, per poi innalzarsi lentamente in relazione al recupero della massa muscolare. Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

Calcio

Costituisce un indicatore del metabolismo minerale. Il livello ematico è strettamente controllato endocrinologicamente e non rappresenta un indice della disponibilità del minerale nella dieta. Un calo della sua concentrazione plasmatica al momento del parto è fisiologico per la necessità di riadattare il metabolismo ad una maggiore richiesta del minerale da parte della mammella, ma non va trascurato che un suo calo o valori persistentemente più bassi dei valori fisiologici possono essere dovuti ad una condizione infiammatoria cronica.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

Fosforo

Costituisce un indicatore del metabolismo minerale. Esso è indice della disponibilità alimentare del minerale ma anche grado di mobilitazione del tessuto osseo.

Tipicamente si assiste ad un aumento dopo il parto, ma spesso si verifica un calo in concomitanza di squilibri alimentari ed eventi tossico-infettivi.

Nessuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021) è stata osservata.

Magnesio

Costituisce un indicatore del metabolismo minerale. È un buon indice della disponibilità alimentare del minerale e della funzionalità ruminale, dato che è prevalentemente assorbito a tale livello.

Tipicamente si assiste ad un calo al momento del parto e ad una successiva risalita.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

Sodio

Costituisce un indicatore del metabolismo minerale e come il calcio è strettamente controllato a livello endocrino, per cui non è un indice della disponibilità alimentare del minerale.

La concentrazione rimane invariata nel tempo.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

Potassio

Costituisce un indicatore del metabolismo degli elettroliti, ma non è correlato alla disponibilità alimentare del minerale, che normalmente è ampiamente in eccesso. Anzi eccessi alimentari di K interferiscono con l'assorbimento del calcio, specialmente nel periparto.

La concentrazione diminuisce lievemente dopo il parto.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

Cloro

Costituisce un indicatore del metabolismo minerale non è strettamente correlato alla disponibilità alimentare del minerale, ma all'andamento degli altri due elettroliti principali, Na e K.

La concentrazione rimane invariata nel tempo.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

IMMUNITÀ E INFIAMMAZIONE

Aptoglobina

Costituisce il principale indicatore della risposta infiammatoria nel bovino ed è prodotta dal fegato.

L'aptoglobina è una glicoproteina prodotta dal fegato, la cui funzione consiste nel legare le molecole di emoglobina libera che circolano nel sangue. È una proteina di fase acuta positiva (posAPP) che aumenta in modo repentino a seguito di un fenomeno infiammatorio. Durante l'infiammazione lega l'emoglobina inibendo l'uptake di ferro da parte dei patogeni.

Essendo sintetizzata dal fegato, l'aptoglobina plasmatica diminuisce negli individui con problemi epatici (es con steatosi). La concentrazione di aptoglobina aumenta fortemente dopo il parto. (Bertoni and Trevisi, 2013b)

Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

Ceruloplasmina

Costituisce un indicatore di risposta infiammatoria come l'aptoglobina, ma a differenza di questa mantiene più a lungo il picco dopo un evento infiammatorio, per cui può essere considerato un marcatore di infiammazione prolungata o cronica.

Anche la ceruloplasmina è una posAPP con la funzione di chelare il rame, inibendone l'uptake da parte dei patogeni. Tipicamente si assiste ad un significativo aumento dopo il parto, ma di solito a +30 giorni i livelli si riassessano su valori analoghi a prima del parto (Bertoni and Trevisi, 2013b).

Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

Globuline

Costituiscono un indicatore di risposta immunitaria e infiammatoria, perché tale categoria di proteine contiene posAPP ed immunoglobuline. Si determinano sottraendo le albumine dalle proteine totali.

Quindi la loro concentrazione plasmatica fornisce informazioni utili sulla condizione del fegato. Bassi livelli possono essere indice di danno epatico o renale o immunodepressione, mentre alti valori indicano la presenza di un processo infiammatorio o infettivo.

Tipicamente si assiste ad un aumento dopo il parto.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

Zinco

Costituisce primariamente un indicatore di risposta infiammatoria, ma anche della disponibilità del minerale nell'organismo.

Viene sequestrato nel fegato da specifiche metallothioneine nel momento in cui sia presente una risposta infiammatoria. Un calo in prossimità del parto è fisiologico per la presenza di fatti infiammatori, ma indica patologie se si prolunga.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

Albumine

Costituiscono un indicatore di funzionalità epatica e sono influenzate dalla presenza di eventi infiammatori.

Sono considerate delle proteine negative di fase acuta (negAPP), in quanto la loro concentrazione si riduce (spesso sotto al range di normalità) quando il fegato è impegnato in una risposta di fase acuta o è in presenza di patologie epatiche.

Solitamente la concentrazione cala lievemente al momento del parto anche nei soggetti clinicamente sani.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

Paraoxonasi

Costituisce un indicatore di risposta immunitaria ed infiammatoria, ma offre anche utili indicazioni sull'eventuale presenza di stress ossidativo a livello delle lipoproteine.

La paraoxonasi è un enzima antiossidante di sintesi epatica associata prevalentemente alle lipoproteine HDL al fine di proteggere i lipidi dagli attacchi di ossidanti (ad esempio i ROM).

È considerata anch'essa una negAPP, quindi un calo (o bassi livelli) della sua concentrazione ematica è sintomo di una risposta infiammatoria in atto o di una certa severità. Tipicamente si osserva un calo al momento del parto.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

Mieloperossidasi

Costituisce un indicatore dell'attività immunitaria ed in particolare del sistema innato.

È un enzima prodotto dai neutrofili e monociti che ha funzione antimicrobica. La sua concentrazione ematica può essere utilizzata come indicatore della loro attività, in quanto è rilasciato nel plasma in proporzione all'attività di queste popolazioni leucocitarie. Solitamente l'enzima aumenta quando aumentano posAPP e ROM.

Tipicamente si assiste ad un suo aumento nel periparto, spesso immediatamente dopo.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

FUNZIONALITÀ EPATICA

fosfatasi alcalina

Costituisce un indicatore di funzionalità epatica, ma anche di altri organi.

È un enzima presente principalmente nel fegato, nel tessuto osseo e nell'intestino. Una maggiore concentrazione nel sangue può indicare sofferenza epatica, specie se non sono presenti altre anomalie fisiologiche.

La concentrazione ematica nei soggetti sani risulta pressoché invariata anche in prossimità del parto.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

Aspartato transaminasi (AST/GOT)

Enzima utilizzato come indicatore di danno cellulare del fegato.

È un enzima che appartiene alla classe delle transaminasi, un gruppo di proteine accumulate dalla capacità di regolare la deaminazione e catalizzare la conversione dell'aspartato e dell'alfa-ketoglutarato in ossalacetato e glutammato, e viceversa. La sua concentrazione ematica aumenta nel momento in cui si verifica un danno o una patologia che interessa il fegato.

Tipicamente si innalza al momento del parto per poi tornare a valori basali a +30 DIM.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

GGT

Enzima utilizzato come indicatore di danno cellulare del fegato. E' un enzima epatico coinvolto nel trasferimento del gruppo gamma-glutamilico da un peptide all'altro e nel trasferimento di aminoacidi attraverso le membrane cellulari. La sua produzione può aumentare anche durante la risposta di fase acuta e stress ossidativo. In condizioni di stress ossidativo, la GGT svolge un ruolo chiave nella biosintesi del glutatione, che è un potente antiossidante (Milanesi *et al.*, 2021).

La GGT aumenta anche nel caso in cui si abbiano patologie epatiche (es. steatosi).

È utile confrontare i suoi valori con quelli della fosfatasi alcalina per discriminare se ci si trovi in presenza di problematiche epatiche (aumentano entrambe) o ossee (aumenta solo ALP).

La concentrazione ematica aumenta lievemente dopo il parto di soggetti sani.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

Bilirubina totale

Costituisce un indice di funzionalità epatica.

Il complesso emoglobina-aptoglobina, sfuggito ai reni, viene eliminato dal reticolo endoteliale, dove i macrofagi inglobano il ferro e lo rilasciano alla transferrina. Questa proteina di trasporto convoglia il minerale al midollo osseo, dove sarà utilizzato per

produrre emoglobina da utilizzare nei nuovi globuli rossi. La rimanente parte dell'EME viene degradata a bilirubina indiretta e trasportata al fegato, il quale, dopo averla coniugata con acido glucoronico, la immette nella bile come bilirubina diretta.

Quando la concentrazione della bilirubina aumenta nel plasma significa che il fegato è in sofferenza per cui non la smaltisce con gli acidi biliari a causa di una carenza di sintesi degli enzimi preposti alla sua escrezione. Tendenzialmente questo metabolita aumenta nel sangue al momento del parto per poi riassetarsi ai valori basali per l'intera lattazione (Bertoni and Trevisi, 2013b)

Negli animali oggetto della prova la concentrazione di bilirubina nel preparto è risultata numericamente maggiore rispetto ai valori di riferimento proposti da (Premi *et al.*, 2021), ma ha anche mostrato una amplissima variabilità, specie nel l'immediato postparto.

STRESS OSSIDATIVO

Metaboliti reattivi dell'ossigeno (ROM tot)

Costituiscono un indice di stress ossidativo.

La produzione di radicali liberi è un evento fisiologico e si verifica normalmente nelle reazioni biochimiche cellulari, soprattutto in quelle che utilizzano ossigeno per produrre energia. Se presenti in eccesso, possono comunque alterare il normale funzionamento delle molecole biologiche vitali, conducendo a danno cellulare.

I ROM sono anche prodotti dall'organismo nei neutrofili e nei macrofagi perché consentono di difendersi dai patogeni, ossidandone le varie componenti organiche. La loro concentrazione è correlata quindi sia all'attività metabolica delle cellule sia all'attività delle cellule immunitarie in seguito ad una infezione.

Il loro livello tipicamente si innalza al momento del parto per poi ritornare a valori basali a +30.

Negli animali oggetto della prova la concentrazione di ROM è rivelata numericamente più elevata a -7 e +5 giorni dal parto rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

Prodotti proteici di ossidazione avanzata (AOPP)

AOPP sono degli indicatori specifici dell'ossidazione proteica e come i ROM si innalzano in caso di importanti processi ossidativi.

La loro concentrazione al parto invece cala leggermente per poi risalire a valori più elevati che restano costanti nel corso della lattazione.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

Potere antiossidante ferrico riducente (FRAP)

Costituisce un indicatore della capacità ossidante del plasma, stimata attraverso la reazione di riduzione dello ione ferrico in ione ferroso in presenza di un antiossidante di riferimento (un analogo della vitamina E nel nostro caso).

Tipicamente si innalza in prossimità del parto e rimane elevato anche nella prima parte della lattazione.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

SHp

I tioli sono composti organici caratterizzati dal possedere nella propria molecola un gruppo sulfidrilico (-SH), e rappresentano una componente della barriera antiossidante plasmatica contro i radicali liberi (vi appartiene anche il glutatione).

Tipicamente si innalzano in prossimità del parto e rimangono elevati anche nella prima parte della lattazione.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa rispetto alle concentrazioni di riferimento proposte da (Premi *et al.*, 2021).

4.2.5 Confronti metabolici sui genotipi GGT

I risultati dell'analisi statistica condotta sui due genotipi opposti associati a GGT hanno identificato un effetto significativo del genotipo ($p\text{-value}=0,016$, tabella 10) sulla concentrazione ematica di gamma-glutamyl transferasi; questo risultato conferma dunque il controllo genetico esercitato dallo SNP individuato nella fase 1 anche in animali sotto stress metabolico. In particolare, gli animali omozigoti per l'allele A2 mostrano un livello di gamma-glutamyl transferasi minore rispetto agli animali aventi genotipo opposto per tutti e tre i tempi (figura 24). La significatività della differenza per i singoli tempi è riportata in tabella 10.

I confronti statistici sono stati effettuati per tutti i metaboliti misurati, senza individuare altre differenze significative (tabella 9).

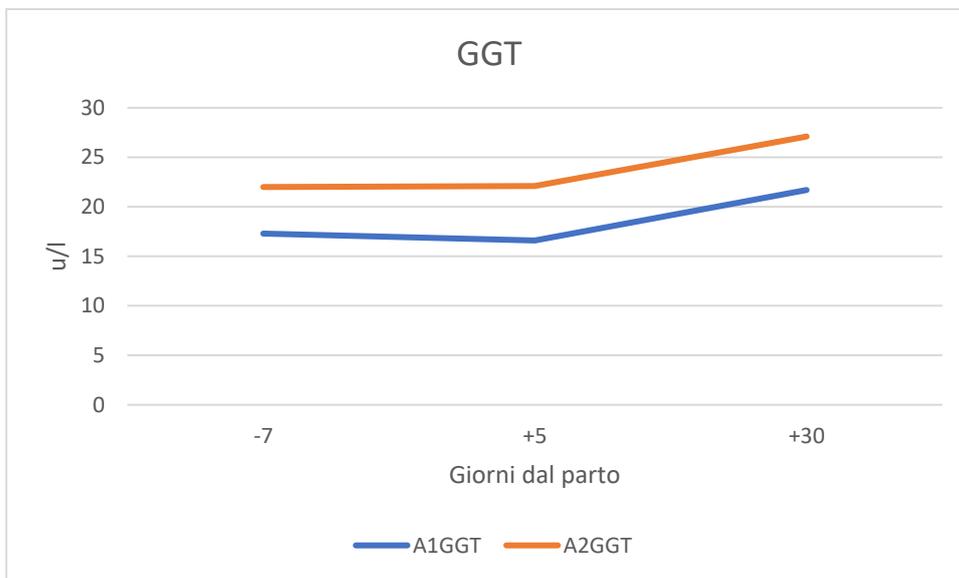


Figura 24 – Grafico dell'andamento dei livelli ematici di GGT negli animali omozigoti opposti per GGT.

4.2.6 Confronti metabolici sui genotipi PON

I risultati dell'analisi statistica condotta sui due genotipi opposti associati a PON hanno identificato un effetto significativo del genotipo sulla concentrazione ematica di PON.

In particolare, gli animali con genotipo PON2 hanno mostrato concentrazioni ematiche di questo enzima maggiori rispetto agli animali con genotipo PON1 (fig. 25).

In questo caso sono poi emerse differenze in altri marcatori plasmatici. In particolare, bilirubina totale, colesterolo, globuline, NEFA, magnesio, Potassio hanno mostrato un effetto significativo dell'interazione tra genotipo e tempo. Gli andamenti per questi metaboliti sono illustrati di seguito rispettivamente nelle figure 25, 26, 27, 28, 29. La significatività della differenza per i singoli tempi è riportata in tabella 12.

I confronti statistici sono stati effettuati anche per gli altri indicatori plasmatici misurati, senza individuare altre differenze significative (tabella 11). È però opportuno sottolineare che i valori di SEM restituiti dall'elaborazione statistica appaiono elevati, a causa del forte sbilanciamento numerico tra i due gruppi confrontati, in gran parte attribuibile alla elevata variabilità nel gruppo a numerosità limitata (A1 PON). Infatti, benchè l'analisi delle varianze (ANOVA) individui un effetto significativo del genotipo ($p\text{-value}=0.033$), il test post-hoc non identifica differenze significative ai singoli tempi, a causa di un errore standard sul gruppo A1A1 PON elevato (-7: SE=10,66; +5: SE=9,25; +30: SE=9,26). I risultati appaiono quindi interessanti ma si consiglia cautela nell'interpretazione a fronte delle limitazioni individuate.

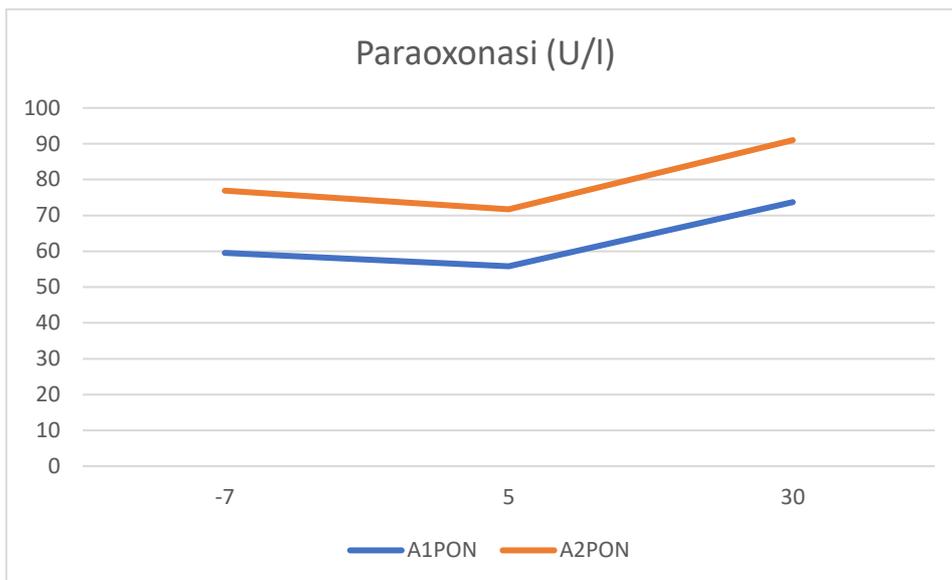


Figura 25 – Grafico dell'andamento dei livelli ematici di PON negli animali omozigoti opposti per PON.

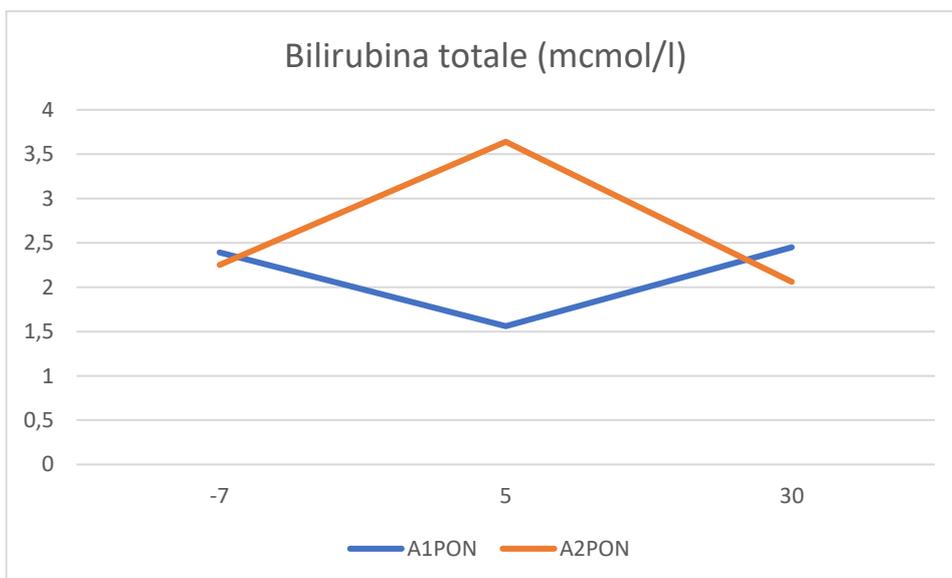


Figura 26 – Grafico dell'andamento dei livelli ematici di bilirubina totale negli animali omozigoti opposti per PON.

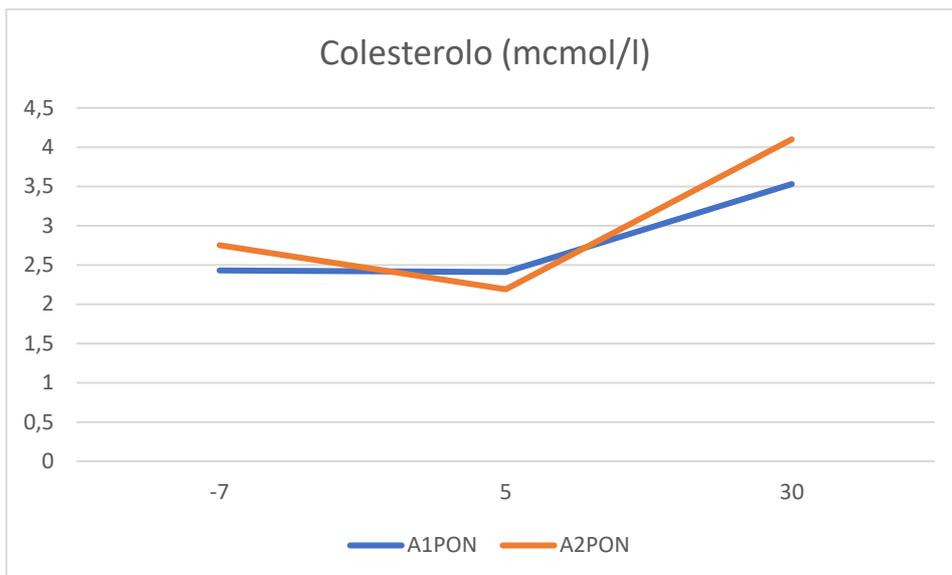


Figura 27 – Grafico dell'andamento dei livelli ematici di colesterolo negli animali omozigoti opposti per PON

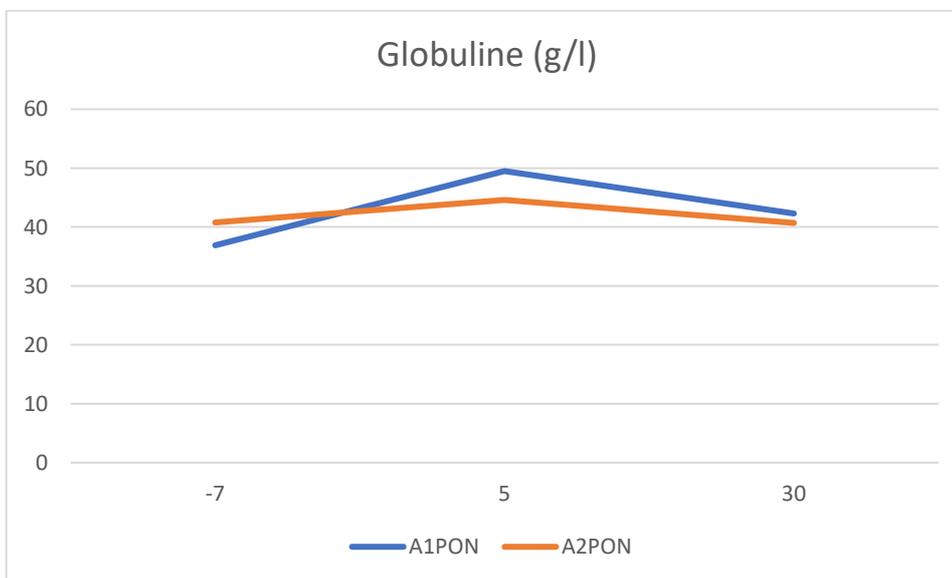


Figura 28 – Grafico dell'andamento dei livelli ematici di globuline negli animali omozigoti opposti per PON

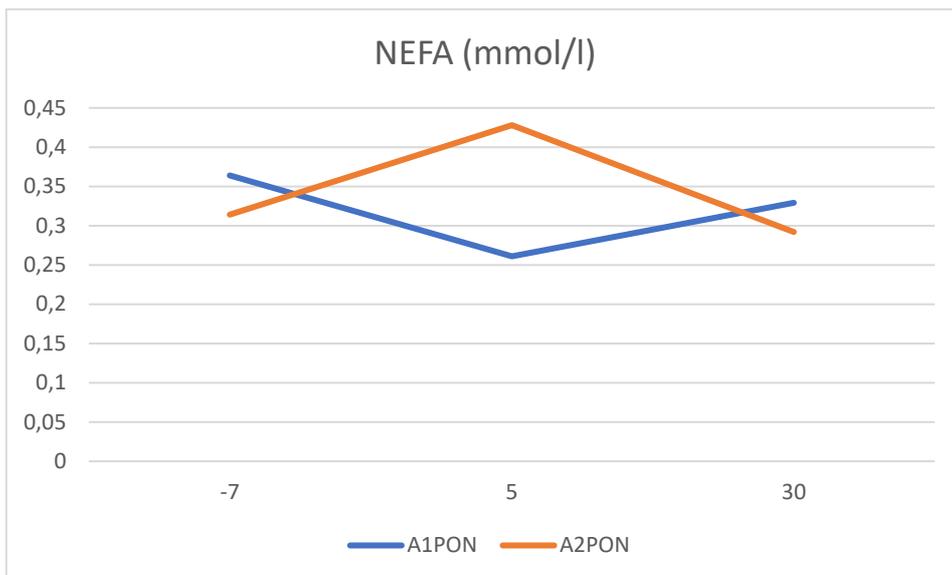


Figura 29 – Grafico dell'andamento dei livelli ematici di NEFA negli animali omozigoti opposti per PON.

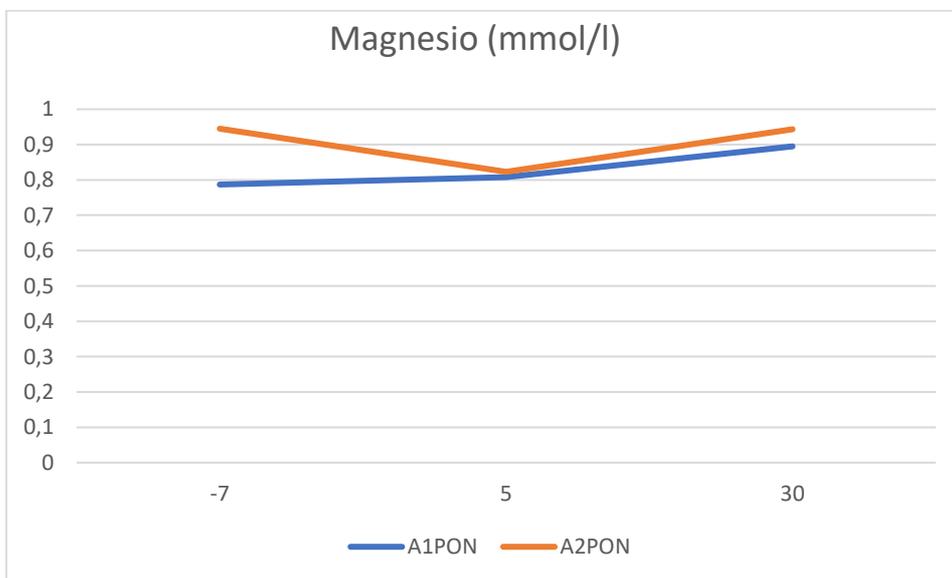


Figura 30 – Grafico dell'andamento dei livelli ematici di magnesio negli animali omozigoti opposti per PON.

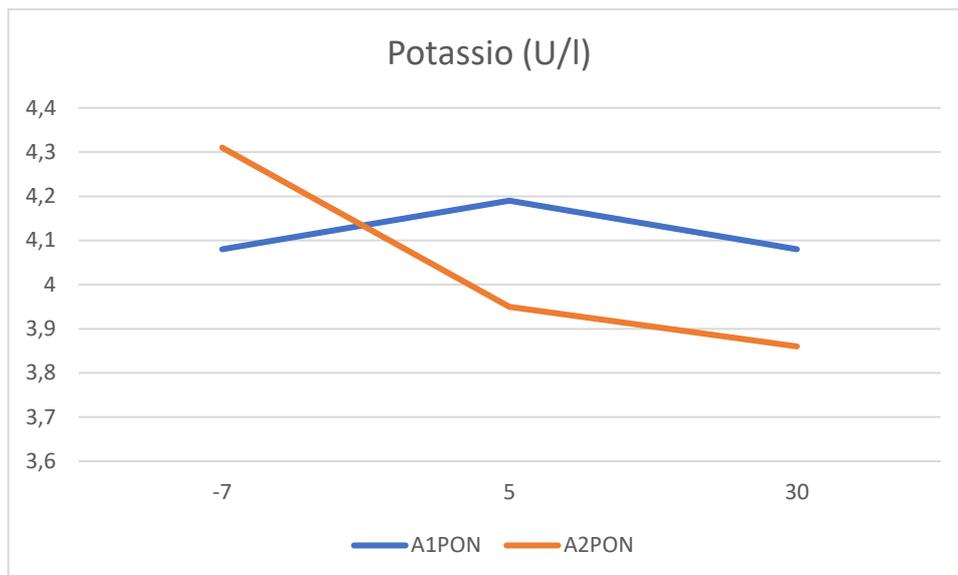


Figura 31 – Grafico dell'andamento dei livelli ematici di potassio negli animali omozigoti opposti per PON.

4.2.7 Confronti metabolici sui genotipi CUCP

Il confronto tra i due genotipi di ceruloplasmina non ha evidenziato una differenza significativa sul contenuto di questa posAPPr nelle bovine sotto stress da parto. I confronti statistici sono stati effettuati anche per tutti gli altri metaboliti ed i risultati sono visibili in tabella 13. I due gruppi erano stati costituiti sulla base della conta allelica al locus individuato dal precedente studio (Gen2phen). Tuttavia, nel presente lavoro, questo locus non ha mostrato di influire significativamente sulla concentrazione ematica di ceruloplasmina. I test statistici effettuati non hanno riportato differenze significative su altri parametri ematochimici, dimostrando ulteriormente il mancato effetto del genotipo.

5. Considerazioni conclusive

Il presente lavoro ha avuto il duplice compito di validare le associazioni precedentemente individuate in un altro campione costituito da bovine di razze Frisona e Simmental e indipendente e quello di verificare in un periodo particolarmente stressante del ciclo produttivo, il periodo di transizione, la risposta delle bovine caratterizzate da un differente genotipo per i biomarcatori individuati e presumibilmente implicati nelle risposte di adattamento allo stress metabolico ed infettivo-infiammatorio che caratterizza le fasi del periparto.

Nella presente tesi sono state trovate associazioni genetiche statisticamente significative per quattro indicatori ematici associati alle risposte di adattamento allo stress, in particolare gammaglutamiltransferasi (GGT), paraoxonasi (PON), alcalino-fosfatasi (ALP) e zinco. Questa associazione, individuata su animali in lattazione, prevalentemente in fase medio-avanzata, è stata quindi testata su animali sottoposti a stress metabolico utilizzando bovine nel periparto per validare se queste associazioni fossero valide anche in questa situazione.

La fase 1 dimostra che i marcatori sopra citati (gammaglutamiltransferasi, paraoxonasi, fosfatasi alcalina e zinco) mostrano un controllo genetico significativo e anche molto semplice. Infatti, i segnali individuati si trovano su un preciso cromosoma e coinvolgono una specifica regione genomica ben definita, che include il gene (o la famiglia di geni) che direttamente codifica per la proteina (famiglia GGT per la Gamma glutamil-transferasi, famiglia PON per la paraoxonasi) con differenze negli alleli.

Il gene codificante per PON è localizzato su BTA4 ed è lungo circa 33Kb. PON è un enzima associato alle lipoproteine ad alta densità (HDL) che protegge le lipoproteine dall'ossidazione. I topi knock-out PON1 con una dieta ricca di grassi e colesterolo sviluppano l'arterosclerosi più rapidamente e l'LDL nelle loro pareti arteriose è maggiormente ossidato rispetto ai controlli; viceversa, i topi che sovraesprimono PON1 presentano una minor ossidazione delle lipoproteine LDL. Si ritiene che lo stress ossidativo, correlato anche alla ridotta attività di PON sia associato a disturbi psichiatrici. È stato dimostrato che la concentrazione di PON è inversamente proporzionale allo stress ossidativo, e che sei polimorfismi nella regione del promotore sono associate a livelli plasmatici di PON nell'holstein brasiliana (Milanesi et al, 2021).

I geni GGT1 e GGT5 sono localizzati su BTA17 e sono lunghi circa 22 Kb. L'enzima GGT è un biomarcatore della funzionalità epatica. La GGT è una glicoproteina legata alla membrana, la cui produzione aumenta, oltre che per facilitare il trasferimento di porzioni delle molecole aminoacidiche, anche durante la risposta di fase acuta (ovvero eventi infiammatori) e al stress ossidativo (spesso conseguente all'evento infiammatorio). In condizioni di stress ossidativo, la GGT svolge un ruolo chiave nella biosintesi del glutathione, che è un potente antiossidante. I topi knock-out GGT1 hanno mostrato carenza cronica di glutathione, ritardo della crescita, cataratta e mortalità precoce. GGT1 è un grande blocco di collegamento contenente numerosi geni, tra cui GGT1, GGT5, GST1 e GST5. I topi knock-out GGT1 non hanno attività del glutathione nella milza, intestino tenue e reni, e questo suggerisce che GGT5 non compensi la mancanza di GGT1 (Milanesi et al, 2021).

Si tratta quindi di caratteri semplici, il cui controllo è esercitato da pochi geni aventi un largo effetto nell'organismo e questo è un fattore positivo sia in fase di studio e modellizzazione, ma soprattutto renderebbe meno complessa un'eventuale implementazione di un programma di miglioramento genetico per questi caratteri, purchè si possano confermare vantaggi in termini metabolici e della risposta immunitaria durante eventi stressanti di tipo metabolico e/o infettivo. Inoltre, l'ereditabilità per questi caratteri risulta essere molto elevata e questo costituisce indubbiamente un ulteriore aspetto positivo.

La fase 2 è stata realizzata proprio per confermare la presenza di vantaggi adattativi in presenza di una delle forme alleliche individuate. A questo riguardo è rilevante il fatto che sia stato confermato l'effetto significativo dei marcatori della GGT e PON anche negli animali sotto stress, ovvero si è dimostrata la possibilità di modulare il livello dei due enzimi per via genetica. Una limitazione di questo studio è sicuramente costituita dalla numerosità delle popolazioni studiate sia per la GGT ma soprattutto per la PON. Oltre ad avere una bassa numerosità di soggetti entro le categorie prescelte, si è avuta una disomogeneità nelle numerosità dei due gruppi a causa della scarsa presenza nella popolazione oggetto di screening. Questo porta ad avere un errore più elevato sul modello utilizzato per l'analisi statistica, una grossa variabilità all'interno del gruppo meno numeroso, fatto che compromette l'affidabilità dei risultati.

Nonostante le limitazioni, il presente lavoro ha dimostrato un significativo controllo genetico per alcuni bio-marcatori associati alla risposta allo stress nelle bovine da latte. Questi bio-marcatori possono portare il livello di informazione oltre la singola funzione biologica ed essere usati come proxy per implementare un programma di selezione genetica per la resilienza. Infatti, nei confronti a gruppi, è emerso che gli animali con genotipo omozigote AA allo SNP associato al GGT hanno un valore di gamma-glutamyl transferasi mediamente inferiore rispetto agli animali con genotipo opposto. Generalmente, valori più bassi di GGT sono associati ad una migliore condizione del fegato, minore infiammazione, minor stress ossidativo.

Similmente, animali con genotipo omozigote AA al locus associato con la paraoxonasi risultano avere mediamente valori di paraoxonasi superiori rispetto agli animali caratterizzati dal genotipo opposto (GG). Generalmente, valori più elevati di PON sono associati ad un minore stato infiammatorio e una minore stress ossidativo. Va rilevato che i valori di paraoxonasi e GGT rilevati nei gruppi con differenti alleli hanno comunque presentato livelli dei due enzimi entro i range di riferimento proposti da (Premi *et al.*, 2021). Non è al momento chiaro quindi se ci sia un effettivo vantaggio adattativo per la presenza di uno di questi alleli in condizioni di stress metabolico.

Pertanto, è lecito chiedersi se l'effetto osservato sia sufficiente per giustificare una selezione di questi caratteri? Per la paraoxonasi, che è un enzima protettivo, un'elevata espressione rappresenta sicuramente un vantaggio; quindi, appare probabile che valga la pena selezionare per un livello di PON più elevato. Per la GGT invece non è chiaro se abbia un senso selezionare bovine che la esprimono meno. Infatti, non siamo ancora in grado di dire se un animale che esprime minori livelli di questo biomarcatore sia meno suscettibile agli stress metabolici oppure se la minore presenza di GGT corrisponda ad una minore funzionalità immunitaria/dell'organismo.

Il presente studio è il primo a nostra conoscenza che ha investigato l'effetto di caratteri coinvolti nella risposta agli stress che si verificano nel periparto, previa individuazione di specifici geni mediante GWAS entro una popolazione. Questo studio ha aperto una nuova modalità di approcciare la risposta di adattamento delle bovine, che va ulteriormente approfondita, in cui la variabilità genetica determina differenze di risposta metabolica che possono avere ripercussioni sul benessere, stato di salute e performance.

6.Appendici

6.1 Metodiche

Analisi del sangue

Il sangue è stato prelevato dalla vena giugulare tramite l'uso di provette sottovuoto contenenti litio-eparina come anticoagulante (Vacumed®, Torreglia (PD)). I campioni immediatamente raffreddati in acqua e ghiaccio sono stati portati in laboratorio dove si è proceduto a processarli per la conservazione.

Presso il laboratorio si è proceduto a prelevare una piccola frazione di sangue intero tramite un capillare di vetro per determinare l'ematocrito, valutato dopo centrifuga in ALC Centrifugette 4203 (15300 G per 12 minuti), mentre il resto della provetta è stata centrifugata (Hettich Universal 16R Centrifuge) a 3500 G per 16 minuti a 6°C. Il plasma ottenuto dalla centrifugazione è stato poi riposto in 3 frazioni da 3 mL e conservato in congelatore a -20°C fino al momento delle successive analisi. Di seguito si allegano le procedure standard delle analisi ematiche effettuate presso il Dipartimento DIANA dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza.

EMATOCRITO [L/L]

Effettuato per la valutazione del volume occupato dagli eritrociti rispetto al volume totale, dopo centrifugazione del sangue in microcapillari di vetro.

Glucosio [mmol/L]

Determinato mediante kit IL (Instrumental Laboratory), che consta in una metodica enzimatica basata su ossidasi [Glucosio Ossidasi (GOD) e Perossidasi (POD)]. L'azione della Glucosio Ossidasi catalizza l'ossidazione del glucosio ad acido gluconico e acqua ossigenata. La Perossidasi invece catalizza la reazione di due molecole di acqua ossigenata con una di fenolo ed una di 4 Aminoantipirina, a formare Chinoneimina (un colorante rosso) e 4 molecole di acqua. La formazione del colorante ed il conseguente aumento di assorbanza registrato a 510 nm è proporzionale alla concentrazione di

glucosio presente nel campione. La metodica prevede l'impiego di 9 μL di plasma, cui vengono aggiunti 150 μL di reattivo (GOD, POD, 4-aminoantipirina, fenolo) e 75 μL di acqua. Dopo 50 secondi, vengono effettuate le letture a 510 e 600 nm (quest'ultima paragonabile al bianco campione) la cui differenza è linearmente correlata alla concentrazione di glucosio. Lo strumento è calibrato mediante l'impiego di un pool di plasma bovino a tenore noto di glucosio.

Acidi grassi non esterificati (NEFA) [mmol/L]

Sono stati determinati con kit WAKO enzimatico-colorimetrico. Dalla reazione, catalizzata dalla Acil-CoA sintetasi (ACS), tra acidi grassi non esterificati del plasma e CoenzimaA (CoA), in presenza di adenosin trifosfato (ATP) e ioni magnesio, si liberano adenosin-monofosfato, pirofosfato e Acil-CoA. Questo è in seguito ossidato dall'enzima acil-CoA ossidasi (ACOD) con liberazione di acqua ossigenata, la quale, in presenza di una perossidasi (POD), favorisce la condensazione tra la 3-metil-N-etil-N-(β -idrossietil)-anilina (MEHA) e la 4-aminoantipirina, a formare un complesso colorato con massimo di assorbanza a 546 nm. La metodica prevede l'impiego di 4 μL di plasma a cui vengono aggiunti subito 75 μL di reattivo 1 (soluzione tampone a pH 6,9 contenente ACS, CoA, ATP, 4-aminoantipirina) e 5 μL di acqua, a 300 secondi 20 μL di acqua, e a 720 secondi il reattivo 2 (MEHA, ACOD, POD) con 5 μL di acqua. Dopo 1270 secondi dall'inizio dell'analisi si effettua la lettura a 546 nm che, depurata del valore del bianco reagente, è linearmente correlata alla concentrazione dei NEFA. La calibrazione dello strumento è effettuata mediante standard di potassio oleato con concentrazione pari ad 1 mmol/L.

β -idrossibutirrato (BHB) [mmol/L]

Determinato mediante Kit Randox (cinetico enzimatico), nel quale l'enzima idrossibutirrato-deidrogenasi (HBDH) catalizza l'ossidazione del β -idrossibutirrato ad acetoacetato. La conseguente riduzione del NAD a NADH comporta un aumento dell'assorbanza a 340 nm. Il metodo impiega 7 μL di plasma cui vengono aggiunti 280 μL di reattivo 1 (Tampone Tris-buffer, acido ossalico.NAD⁺, 3-HBDH) e 10 μL di acqua. Vengono effettuate 2 letture a 340 nm, rispettivamente 118,2 secondi e 243,6 secondi dopo l'aggiunta del reattivo. In relazione alla variazione di assorbanza ed in base alla

curva di taratura dello strumento è calcolata la concentrazione. La calibrazione è effettuata mediante standard, a concentrazione nota contenuto nel Kit.

Colesterolo totale [mmol/L]

Kit IL (enzimatico-colorimetrico). La metodica si basa sulla scissione degli esteri del colesterolo presenti nel plasma in colesterolo ed acidi grassi per effetto dell'acolesterolo esterasi (CHOE). Dalla reazione, catalizzata dalla colesterolo-ossidasi (CHOD) tra il colesterolo libero e l'ossigeno dell'aria si formano colest-4-en-3-one e acqua ossigenata. L'acqua ossigenata, in una reazione catalizzata dalla perossidasi (POD), reagisce con la 4-amminoantipirina (4-AAP) ed il fenolo per dare acqua e chinoneimina, composto colorato rilevabile a 510 nm. Il metodo impiega 5 µl di plasma cui vengono aggiunti 100 µl di reattivo (4-AAP, fenolo, POD, CHOD, CHOE) e 150 µl di H₂O e dopo 490 secondi si effettuano le letture a 510 e 570 nm (la seconda serve come bianco campione). La differenza fra le letture è linearmente correlata con la concentrazione e la calibrazione viene effettuata mediante pool di plasma a valore noto.

Urea [mmol/L]

Determinata con kit IL a determinazione enzimatica, mediante ureasi e glutammato-deidrogenasi (GLDH). L'ammoniaca originata dall'idrolisi dell'urea per azione dell'ureasi è utilizzata dalla GLDH nella conversione dell' α -osso-glutarato a L-glutammato. In tale reazione, la quantità di NADH ossidata, misurata in termini di riduzione di assorbanza a 340 nm, è proporzionale alla concentrazione di urea. L'analisi prevede l'utilizzo 8 µL di plasma, cui vengono aggiunti 270 µL di reattivo (α -ossoglutarato, ADP, ureasi, GLDH, NADH) con 30 µL di acqua e, dopo un'attesa di 45 secondi, vengono effettuate due letture a 340 nm, ad un intervallo di 70 secondi l'una dall'altra. La differenza fra le due letture è linearmente correlata alla concentrazione di urea e la calibrazione è effettuata mediante pool di plasma a tenore noto. Creatinina [μ mol/L] Kit IL (colorimetrico). Il metodo è basato sulla reazione fra acido picrico e la creatinina in ambiente alcalino. La quantità di complesso colorato formato, con massimo di assorbimento a 510 nm, è in relazione alla concentrazione di creatinina. La metodica impiega 12 µl di plasma cui vengono aggiunti 90 µl di reattivo 1 (idrossido di sodio) e dopo 300 secondi 90 µl di reattivo 2 (acido picrico). A 330 e 400 secondi si effettuano 2 letture a 510 e 570 nm (la seconda come

bianco campione). La differenza tra le letture è linearmente correlata alla concentrazione di creatinina e la calibrazione si effettua mediante standard a valore noto.

Calcio [mmol/L]

Anch'esso è stato determinato mediante kit IL. Il metodo, di tipo colorimetrico, si basa sulla formazione di un complesso colorato derivante dalla reazione in ambiente alcalino fra calcio e cresoftaleina complessone, la quale colora la soluzione con una intensità che è proporzionale alla quantità di calcio presente nel campione. Le interferenze da magnesio sono prevenute dalla capacità complessante selettiva della 8-ossichinolina. La metodica impiega 9 µL di plasma, cui vengono aggiunti 180 µL di reattivo 1 (2-amino-2-metil-1-propanolo) e, dopo 300 secondi, 180 µL di reattivo 2 (orto-cresoftaleina complessone e 8-idrossi chinolina). 20 secondi prima e 100 secondi dopo rispetto all'aggiunta del reattivo 2 vengono effettuate le letture a 570 e 670 nm (quest'ultima serve come bianco campione), la cui differenza è linearmente correlata alla concentrazione di calcio. La calibrazione dello strumento è effettuata mediante pool di plasma a valore noto.

Fosforo inorganico (P) [mmol/l]

Kit IL. Il metodo, di tipo colorimetrico, si basa sulla reazione in ambiente acido tra il fosforo inorganico e l'ammonio molibdato senza deproteinizzazione. Dalla reazione si forma il complesso fosfomolibdato non ridotto in quantità proporzionali alla concentrazione di fosforo inorganico. La quantità del complesso formatosi viene determinata misurando l'assorbanza a 340 e 375 nm. L'analisi viene effettuata impiegando 6 µl di plasma cui vengono aggiunti 150 µl di reattivo 1 (acido solforico) e 20 µl di H₂O. Dopo 300 secondi, vengono aggiunti 150 µl di reattivo 2 (molibdato di ammonio) e 20 µl di H₂O. Le letture a 340 e 375 nm (la seconda lettura viene usata come bianco campione) vengono effettuate 360 secondi dopo l'aggiunta del reattivo 2. La differenza fra le letture è linearmente correlata con il livello di fosforo. Per la calibrazione viene utilizzato pool di plasma a tenore noto.

Magnesio (Mg) [mmol/l]

Determinato mediante kit IL. Questo si basa su un'analisi cinetica-enzimatica, nella quale il Magnesio (Mg) contenuto nel campione reagisce con l'adenosina 5' trifosfato (ATP) per formare il complesso Mg-ATP che, in presenza di glucochinasi (GlcK), converte il glucosio in glucosio-6-fosfato (G-6-P) e forma il complesso Mg-ADP. Gli ioni Magnesio, dissociandosi dal complesso Mg-ADP, formano di nuovo il complesso Mg-ATP, che viene utilizzato ripetutamente per la reazione. La cinetica di reazione dipende dalla concentrazione di Magnesio nel campione. Contemporaneamente il Glucosio-6-Fosfato reagisce con la fosfato-nicotinamina-adenina-dinucleotide (NADP) in presenza dell'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G-6-PDH), formando acido-6-fosfogluconico e NADPH. La velocità di incremento dell'assorbanza dovuta alla formazione di NADHP è direttamente proporzionale alla concentrazione del Magnesio nel campione. Il metodo prevede l'impiego di 6 µl di plasma, cui vengono aggiunti 240 µl di reattivo 1 (GlcK, ATP, G-6-PDH) e 10 µl di acqua. Dopo 300 secondi, vengono aggiunti 60 µl di reattivo 2 (glucosio, NADP) e 10 µl di acqua. Le letture alla lunghezza d'onda primaria, di 340 nm, e secondaria, di 405 nm, vengono effettuate 13 secondi e 133 secondi dopo l'aggiunta del reagente 2. Per la calibrazione viene utilizzato pool di plasma a tenore noto.

Zinco (Zn) [µmol/L]

Determinato con kit WAKO, mediante un metodo colorimetrico basato su reattivo cromogeno, il quale dava adito alla formazione di un chelato rosso. La metodica prevede la deproteinizzazione del campione con acido tricloroacetico. Dalla nostra esperienza di laboratorio è emerso che, procedendo all'analisi su plasma senza deproteinizzazione, si ottengono risultati ugualmente accettabili. Questo probabilmente grazie all'autoanalizzatore, che ci consente di fare una lettura a due lunghezze d'onda, e ciò consente l'eliminazione di una parte delle interferenze causate dalla diversa colorazione della matrice. La metodica impiega 30 µL di plasma cui vengono aggiunti 150 µL di reattivo cromogeno e 30 µL di acqua. Dopo 330 secondi, si effettuano le letture a 546 e 660 nm (quest'ultima equiparabile al bianco campione). La differenza fra le letture è linearmente correlata alla concentrazione di zinco e la calibrazione si effettua mediante pool a valore noto.

Ceruloplasmina (CuCp) [$\mu\text{mol/L}$]

Si basa sulla colorazione che trae origine dall'ossidazione dell'orto-parafenilendiammina, operata dalla ceruloplasmina. La metodica impiega 25 μl di plasma cui vengono aggiunti 140 μl di tampone acetato (pH 4.6 addizionato estemporaneamente con parafenilendiammina allo 0.14 %) e 40 μl di H₂O. Dopo 350 secondi, si effettuano le letture a 546 e 660 nm (la seconda funge da bianco campione). La differenza fra le letture è linearmente correlata con la concentrazione di ceruloplasmina. La calibrazione viene effettuata mediante lo standard a titolo noto Human Plasma Ceruloplasmin cod. A50143H della Meridian Life Science, Memphis, USA.

Aptoglobina [g/L]

Determinazione effettuata mediante un test colorimetrico. Per l'analisi si impiegano 12 μL di plasma cui si aggiungono 60 μL di reattivo 1 (metaemoglobina, soluzione fisiologica, acqua bidistillata) e 5 μL di acqua. A 300 secondi si aggiungono 170 μL di reattivo 2 (Guaiacol, acqua ossigenata) e 5 μL di acqua. A 10 secondi dall'aggiunta del reattivo 2 lo strumento esegue una prima lettura (la reazione colorimetrica non è ancora avvenuta, perciò questo valore corrisponde al bianco campione) ed una seconda lettura è effettuata dopo 250 secondi, a reazione colorimetrica avvenuta. La variazione di assorbanza a 450 nm è proporzionale alla concentrazione di aptoglobina presente nel campione.

Proteine totali [g/L]

Determinato mediante kit IL. La metodica, di tipo colorimetrico, si basa sulla reazione in soluzione fortemente alcalina tra polipeptidi che contengono almeno due legami peptidici con il solfato di rame nel reagente biureto. Il prodotto della reazione è un complesso stabile di colore lavanda che assorbe luce intorno a 550 nm. L'analisi utilizza 6 μL di plasma cui vengono aggiunti 200 μL di reattivo (idrossido di sodio, ioduro di potassio, solfato di rame, EDTA) e dopo 190 secondi si effettuano le letture a 546 e 700 nm (la seconda serve come bianco campione). La differenza fra le letture è linearmente correlata alla concentrazione in proteine e, per la calibrazione, si fa riferimento ad un pool a valore noto.

Albumine [g/L]

Determinazione eseguita sfruttando la variazione di colore dovuta alla formazione di un complesso fra le albumine e il verde di bromocresolo, attraverso un kit IL. Per l'analisi si impiegano 5 μ L di plasma, cui vengono aggiunti 230 μ L di reattivo [soluzione di verde bromocresolo e acido succinico (pH 3,8)] e, dopo 45 secondi, si effettuano le letture a 600 e 700 nm (la seconda come bianco campione). La differenza fra le letture è linearmente correlata con la concentrazione di albumine, e la calibrazione è effettuata mediante un pool a valore noto.

Globuline [g/L]

Non sono il risultato di una specifica analisi, ma sono determinate matematicamente sottraendo dalle proteine totali il valore delle albumine.

Paraoxonasi [U/L]

Determinazione di tipo cinetico-fotometrico. Si basa sulla misura dell'idrolisi del Paraoxon da parte dell'enzima Arildialchil-fosfatasi (o Paraoxonasi), con la formazione del fosfo-nitrofenolo. La metodica prevede: si prelevano con pipetta 8 μ L di campione a cui si aggiungono 125 μ L di soluzione substrato (formato da 1 mmol/L di paraoxon e 1 mmol/L di cloruro di calcio, in una soluzione tampone di glicina 0,05 mmol/L) e 125 μ L di acqua ultrafiltrata. Le letture, che avvengono a 420 nm, vengono effettuate a 17 (bianco) e 51 secondi (lettura finale), per poi misurare la differenza di assorbanza tra le due. Si utilizzano, per la correzione dei risultati, 3 standard a valore noto: Precinorm (Roche, Germania), Randox (Randox Laboratories LTD, UK) e pool di plasma bovino.

Aspartato-amino-transferasi (GOT/AST) [U/L]

Determinazione basata sulla trasformazione dell'L-aspartato in ossalacetato ed L-glutammato ad opera dell'enzima GOT/AST, e sulla successiva formazione di L-malato a partire dall'ossalacetato, operata dall'aggiunta di malato deidrogenasi e NADH. La diminuzione di assorbanza dovuta all'ossidazione di NADH a NAD⁺, letta a 340 nm, è direttamente proporzionale alla concentrazione di GOT/AST nel campione.

Operativamente, il campione (14 μ L di plasma) è incubato a 37°C con substrato tamponato (145 μ L, pH 7,4) contenente L-aspartato, NADH, MDH, LDH (reattivo 1).

Dopo un'incubazione di 5,1 minuti, sono addizionati 35 μ L di una soluzione a base di 2-ossoglutarato (reattivo 2). A 45 e 170 secondi dall'aggiunta del reattivo 2, vengono effettuate le due letture a 340 nm. In base ai valori ottenuti lo strumento calcola la regressione ed esprime la variazione di assorbanza per minuto. Tale valore è poi moltiplicato per un fattore che permette di ottenere la concentrazione dell'enzima in U/L. Il fattore è così calcolato:

$$\text{Fattore} = (V_r/V_s) \cdot (1/E) \cdot (1/Pl) \cdot 106$$

Dove:

- V_r = volume totale (mL)
- V_s = volume campione (mL) E = assorbanza molare del NAD (costante, e pari a $6,3 \cdot 10^3$)
- Pl = lunghezza della cella (cm)
- 106 = conversione in U/L

I risultati dell'analisi vengono controllati mediante standard a valore noto.

γ -glutamyl-transferasi (GGT) [U/L]

Analisi cinetica secondo il metodo Szasz/Persijn, eseguita con un kit IL. Il metodo si basa sulla reazione, catalizzata dalla γ -glutamyl-transferasi, tra L- γ -glutamyl-3-carbossi-4-nitroanilide e glicilglicina. Il 5-amino-2-nitrobenzoato, prodotto colorato della reazione, determina una variazione di colore letta a 405 nm. La velocità con la quale aumenta l'intensità di colorazione è proporzionale alla quantità di γ -glutamyl-transferasi presente nel plasma. L'analisi impiega 16 μ l di campione cui vengono aggiunti 175 μ l di reattivo (Tampone Tris, glicilglicina, L- γ -glutamyl-3-carbossi-4-nitroanilide) e 10 μ l di acqua. A 46,5 secondi ed a 172 secondi dall'aggiunta del reattivo viene effettuata la lettura a 405 nm. Lo strumento ricava la regressione e calcola la variazione di assorbanza per minuto che, moltiplicata per il fattore, restituisce la concentrazione in U/l. Il fattore si calcola come per la AST/GOT in cui il valore di E (costante) della L- γ -glutamyl 3-carbossi-4-nitroanilide è pari a 9.5×10^3 . Anche in questo caso si impiegano controlli di qualità a tenore noti di enzima.

Bilirubina totale [$\mu\text{mol/L}$]

Costituisce un marcatore indiretto dell'attività enzimatica epatica, il quale è stato determinato attraverso un kit IL basato su metodo colorimetrico con diazotazione. La bilirubina totale presente nel campione è direttamente proporzionale alla quantità di azobilirubina che si forma in seguito alla reazione, in presenza di litio dodecilsolfato, tra la stessa bilirubina totale e l'acido sulfanilico diazotato.

Per l'analisi si impiegano 40 μL di plasma cui vengono aggiunti subito 105 μL di reattivo 1 (Litio dodecilsolfato) con 35 μL di acqua e, dopo 300 secondi, 75 μL di reattivo 2 (Acido Cloridrico e Acido Sulfanilico). 20 secondi prima e 220 secondi dopo l'aggiunta del reattivo 2 si effettuano le letture a 546 nm. La differenza fra le letture è linearmente correlata alla concentrazione di bilirubina, e la calibrazione è effettuata utilizzando standard a valore noto.

Fosfatasi alcalina (ALP) [U/l]

Determinata mediante kit IL, basato su metodo enzimatico con nitrofenolo. La fosfatasi alcalina catalizza la defosforilazione del p-nitrofenilfosfato (pNPP) in p-nitrofenolo, che assorbe luce a 405 nm. Questa reazione è perfezionata con l'utilizzo di 2-amino-2-metil-1-propanolo (AMP) e ioni metallo (Mg^{2+} , Zn^{2+}). L'analisi viene effettuata impiegando 6 μl di plasma, 180 μl di reattivo 1 (AMP, Mg^{2+} , Zn^{2+} , HEDTA) e 10 μml di acqua. Dopo 300 secondi, vengono aggiunti 30 μl di reattivo 2 (pNPP) e 10 μml di acqua. 208 secondi dopo l'aggiunta del reattivo 1 e 46 secondi dopo l'aggiunta del reattivo 2 si effettuano le letture a 405 nm. La calibrazione viene effettuata con un calibratore a titolo noto di fosfatasi alcalina (ReferrIL E). L'analizzatore automatico calcola l'attività enzimatica della fosfatasi alcalina nel seguente modo:

$$\text{ACT}_s = \Delta A_s * K K = (\text{ACT}_c / \Delta A_c)$$

Dove:

- ACT = attività della fosfatasi alcalina (U/L)
- ΔA = variazione di milliassorbanza per minuto a 405 nm
- s = campione o c = calibrante.

Gruppi tiolici (SHp) [$\mu\text{mol/l}$]

Determinati attraverso kit Diacron (colorimetrico). Il principio del test si basa sulla formazione di un complesso colorato, come prodotto della reazione tra gruppi sulfidrilici e acido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), in un'apposita soluzione tampone (pH 7,6). L'intensità del colore rilevato strumentalmente è direttamente proporzionale alla concentrazione dei gruppi tiolici. Il metodo prevede l'impiego di 10 μl di plasma cui vengono aggiunti 205 ml di reattivo (DTNB e soluzione tampone in rapporto 1:50). Dopo 315 secondi, vengono effettuate le letture a 405 e 600 nm. La differenza tra le letture è correlata con la concentrazione dei gruppi tiolici, e la calibrazione viene effettuata con siero a titolo noto. I controlli di qualità vengono effettuati su di un siero di controllo di origine umana liofilizzato (CONTROL SERUM ROMs della Diacron). Metaboliti reattivi dell'ossigeno (ROM) totali [$\text{mg H}_2\text{O}_2/100 \text{ mL}$] I metaboliti reattivi dell'ossigeno vengono determinati mediante kit colorimetrico (DIACRON, Grosseto). I ROM sono una varietà di radicali liberi caratterizzati da estrema reattività chimica che formano, nel plasma e nelle cellule, dei derivati altrettanto reattivi. Il principio della determinazione dei ROM totali consiste nella misura spettrofotometrica a 510 nm di un complesso colorato che si forma in seguito alla reazione di questi derivati con un cromogeno opportunamente tamponato. Per l'analisi vengono utilizzati 6 μl di plasma e 150 μl di reattivo. Il reattivo è costituito dalla miscela del tampone e del cromogeno in rapporto 100:1. La reazione dura 3 minuti e segue un procedimento cinetico, per cui è misurata la variazione di assorbanza per minuto (DA/min). Le concentrazioni si ottengono moltiplicando le DA/min, relative a ciascun campione di plasma, per il valore del fattore calcolato utilizzando uno standard a concentrazione nota (22.5 mg $\text{H}_2\text{O}_2/100 \text{ ml}$) di ROM totali. L'analisi è eseguita utilizzando la macchina autoanalizzatrice ILab 650 (Instrumentation Laboratory).

FRAP (Ferric reducing antioxidant power) [$\mu\text{mol/L}$]

La determinazione dei FRAP è stata eseguita adattando il metodo colorimetrico di Benzie e Strain (1999, Methods in enzymology. 299:15-23) all'analizzatore automatico ILAB 650 (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA). Il reagente è stato preparato al momento dell'uso miscelando (a) tampone acetato 300 mM, pH 3,6, (b) TPTZ (2, 4, 6-triazina tripiridil-s-) 10 mM in 40 mM HCl e (c) FeCl₃ 20 mM nel rapporto di 10: 1: 1. Il metodo impiega 10 μl di plasma a cui vengono aggiunti 300 μl di reagente. L'assorbanza (600 nm) è stata misurata dopo un'incubazione di 243,6 secondi a 37 °C. La calibrazione dello strumento viene effettuata prima di ogni sessione di analisi utilizzando Trolox (125 $\mu\text{M/l}$) in tampone acetato. I FRAP sono espressi come $\mu\text{M/l TE}$.

Mieloperossidasi [U/L]

Determinata con metodo di tipo colorimetrico, che si basa sulla reazione della mieloperossidasi contenuta nel campione di plasma con l'acqua ossigenata, a formare acqua e ioni O⁻. La o-dianisidina diidrocloreuro, donatore di protoni (H⁺), reagisce con l'O⁻ liberando acqua ed un composto colorato. La metodica impiega 8 μL di plasma, cui vengono aggiunti 250 μL di tampone fosfato 50 mM (pH 6), contenente 0.167 mg/ml di o-dianisidina diidrocloreuro e 0,0005% di perossido di idrogeno. A 10,6 e 82,3 secondi dall'aggiunta del reagente si effettua la lettura 450 nm e, moltiplicando la variazione di assorbanza per minuto per il fattore enzimatico, si ottiene il valore di mieloperossidasi in U/L. Il fattore enzimatico, pari a 2.85 è stato calcolato con la seguente formula:

$$FE = V_r/V_s * 1/E * 1/PL * 10^6$$

Dove:

- FE = Fattore enzimatico
- V_r = Volume totale della reazione (ml)
- V_s = Volume totale del campione (ml)
- E = Coefficiente di estinzione molare (11.3 mM⁻¹cm⁻¹)
- PL = Cammino ottico della cuvetta (il cammino ottico della cuvetta dello strumento utilizzato per l'analisi, ILAB 650 della Instrumentation Laboratory, MA, USA, è 0,5 cm, ma viene convertito automaticamente dall'analizzatore automatico a 1 cm).

Il coefficiente utilizzato nella formula per il calcolo del risultato, è stato diviso per 1000, in quanto lo strumento utilizzato per l'analisi effettua la lettura in milliassorbanza.

Fruttosammina [$\mu\text{mol/L}$]

Determinata con analizzatore automatico, ILAB 650 (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA) utilizzando il kit commerciale Cod. 7080 della FAR Diagnostics, Pescantina, Verona, Italia. Il test colorimetrico si basa sulla capacità del glucosio, legato ai gruppi amminici delle proteine con legame chetoaminico stabile (fruttosamine), di ridurre in ambiente alcalino il blu di nitrotetrazolio a formazano sviluppando un colore violetto, la cui intensità è proporzionale al grado di glicazione delle proteine e quindi alla concentrazione di fruttosammina nel campione.

L'analisi viene effettuata mediante l'impiego di 10 μl di plasma a cui vengono aggiunti 200 μl di reattivo (Tampone carbonato, Nitroblu-tetrazolio, Uricasi). Si eseguono 2 letture a 546 nm rispettivamente 614,4 e 919.1 secondi dopo l'aggiunta del reagente.

La calibrazione viene effettuata con un calibratore a titolo noto contenuto nel kit.

I controlli di qualità vengono eseguiti su di un controllo interno (Pool) e sui seguenti controlli liofilizzati: Fructosamine Control Serum N+P Cod. 7510 della FAR Diagnostics, Pescantina, Verona, Italia, Bov Asy Control 2 Cod. AN1026 della Randox Laboratories Limited, Crumlin, County Antrim, BT29 4QY, UK, SeraChem Control Level 1 Cod. 0018162412 della Instrumentation Laboratory, Viale Monza, Milano, Italia.

Vitamina A [$\mu\text{g}/100\text{ mL}$], Vitamina E [$\mu\text{g}/\text{mL}$], β -carotene [$\text{mg}/100\text{ mL}$]

Si procede all'estrazione delle vitamine da 0,5 ml di plasma a cui sono aggiunti 0,5 ml di etanolo assoluto e dopo agitazione al vortex, si aggiungono 5 ml esatti di n-esano. Le provette vengono poste in agitatore orizzontale oscillante per 15 minuti, al termine dei quali occorre centrifugare i campioni alla temperatura di 5°C e 3520 g per 5 minuti. Si prelevano 4 ml di surnatante e si portano a secco in corrente d'azoto mantenendo le provette a 37 °C. Si riprende il tutto con 0,4 ml di soluzione Metanolo -THF (80:20) e dopo agitazione al vortex si trasferisce la soluzione i vials. Il procedimento di estrazione dovrà essere svolto facendo attenzione di mantenere il campione al riparo dalla luce. I campioni vengono letti con HPLC (LC-4000, Jasco Europe) il quale è composto da 4 moduli: pompa, campionatore, forno e rivelatore UV/Visibile. Si utilizza una colonna ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 x 150 mm, 3.5 μ (Agilent Technologies) dotata di

colonna di guardia ZORBAX 4.6x12.5mm 5 μ m. La fase mobile impiegata è una soluzione Metanolo -THF (80:20) ad un flusso costante di 1 ml/minuto. Il tempo di eluizione è di 2.25 minuti per la vitamina A, 3.70 minuti per la vitamina E e di 8.53 minuti per il β -carotene.

6.2 Tabelle

Tabella 9 – Confronti dei livelli ematici di tutti i biomarcatori negli animali omozigoti opposti per GGT. Nella prima parte della tabella sono riportate le medie di gruppo nei 3 tempi di prelievo, nella seconda parte la significatività statistica dell'effetto di genotipo, tempo e della loro interazione.

PARAMETRO	Gruppo	tempo			SEM	p-values		
		-7	+5	+30		Genotipo	Tempo	Genotipo*Tempo
GGT (U/l)	A1GGT	17,3	16,6	21,7	2,08	*	***	0,103
	A2GGT	22	22,1	27,1		0,01637	2,53E-03	
GOT (U/ml)	A1GGT	81,7	101,8	84,8	7,46		***	0,3307
	A2GGT	70,5	98,3	88,2		0,6392	5,97E-02	
BILIRUBINA TOT (mcmol/l)	A1GGT	2,21	4,6	2,44	0,583		**	0,278937
	A2GGT	2,86	3,77	2,75		0,934477	0,001289	
ALP (U/l)	A1GGT	36,4	39,4	43,1	3,25			0,389
	A2GGT	34,5	36,2	35,7		0,241	0,1874	
GLUCOSIO (mmol/l)	A1GGT	4,04	3,94	4,09	0,142			0,7971
	A2GGT	4,13	3,93	4,04		0,9446	2,91E-01	
COLESTEROLO (mmol/l)	A1GGT	2,78	2,09	3,78	0,222		***	0,9544
	A2GGT	2,8	2,09	3,87		0,8637	1,50E-14	
NEFA (mmol/l)	A1GGT	0,269	0,519	0,272	0,0608		***	0,5537
	A2GGT	0,328	0,485	0,305		0,7445	6,45E-06	
BHB (mmol/l)	A1GGT	0,371	0,546	0,461	0,0601		***	

	A2GGT	0,292	0,585	0,521		0,8906	9,40E-05	0,3147
UREA (mmol/l)	A1GGT	4,1	4,5	5,56	0,424		***	
	A2GGT	3,79	4,93	6,18		0,5595	3,53E-07	0,2881
CREATININA (mcmol/l)	A1GGT	94,6	87,6	82,3	3,86		***	
	A2GGT	93,2	89	78,8		0,7611	9,50E-05	0,667
APTOGLOBINA(g/l)	A1GGT	0,291	0,812	0,3	0,0951		***	
	A2GGT	0,27	0,744	0,273		0,6296	1,83E-08	0,9495
CERULOPLASMINA (mcmol/l)	A1GGT	1,63	2,31	2,3	0,188		**	
	A2GGT	1,56	2,16	2,42		0,135831	5,70E-03	0,191978
PROTEINE TOTALI (g/l)	A1GGT	90,8	74,9	79,3	1,94		**	
	A2GGT	77,5	76,1	82		0,897063	0,002516	0,144155
ALBUMINE (mmol/l)	A1GGT	36	34,1	36,1	1,432		**	
	A2GGT	35,1	34,6	35,7		0,66119	0,006251	0,179
GLOBULINE	A1GGT	44,3	43,9	42,3	1,93			
	A2GGT	42,6	46,3	41,6		0,99649	6,65E-02	0,30623
PARAOXONASI (U/ml)	A1GGT	78,9	67,2	81,9	7,65		*	
	A2GGT	88,1	75,6	90,9		0,20414	1,27E-02	0,99687
MIELOPEROSSIDASI (U/l)	A1GGT	448	477	437	15,1		**	
	A2GGT	438	463	421		0,381372	0,001019	0,961841
CALCIO (mmol/l)	A1GGT	2,47	2,3	2,41	0,0529		**	

	A2GGT	2,55	2,39	2,44		0,169472	3,42E-03	0,799834
FOSFORO (mmol/l)	A1GGT	1,74	1,44	1,52	0,094		***	
	A2GGT	2	1,53	1,63		0,1134	2,28E-06	0,4223
MAGNESIO (mmol/l)	A1GGT	0,879	0,839	0,915	0,0353			
	A2GGT	0,911	0,86	0,948		0,453225	0,001535	0,954588
SODIO (mmol/l)	A1GGT	146	145	146	1,29			
	A2GGT	148	147	145		0,4223	0,2248	0,228
POTASSIO (U/l)	A1GGT	4,1	3,81	3,68	0,123		***	
	A2GGT	4,28	3,87	3,65		0,5878	9,65E-07	0,4835
CLORO (mmol/l)	A1GGT	108	104	103	1,15		***	
	A2GGT	110	105	101		0,9688	3,30E-08	0,287
ZINCO (mcmol/l)	A1GGT	11,1	10,2	10,4	0,963		**	
	A2GGT	13,6	10,7	11,6		0,135831	0,005695	0,191978
AOPP (mcmol/l)	A1GGT	63,8	49,8	58,1	4,97		***	
	A2GGT	64,2	49,5	52,5		0,7394	3,72E-05	0,4965
FRAP (mcmol/l)	A1GGT	138	155	156	7,38		***	
	A2GGT	139	168	161		0,3515	1,26E-04	0,5527
SHp (mcmol/l)	A1GGT	260	273	288	14,6			
	A2GGT	174	267	275		0,9107	0,3816	0,4439
ROM TOT (U/l)	A1GGT	8,37	11,2	9,43	0,885		***	

	A2GGT	6,32	9,07	9,51		0,1119	0,0005494	0,1774
--	-------	------	------	------	--	--------	-----------	--------

Tabella 10 - Confronti dei livelli ematici di GGT negli animali omozigoti opposti per GGT. La presente tabella ha lo scopo di precisare la significatività statistica della differenza tra i livelli ematici di 2 gruppi nei 3 tempi di prelievo.

Metabolita	Gruppo	Medie			SEM	p-values					
		-7	5	30		-7	5	30	Genotipo	Tempo	Genotipo*Tempo
GGT (U/l)	A1GGT	17,3	16,6	21,7	2,08	0,3677	0,1803	0,2049	*	***	0,103
	A2GGT	22	22,1	27,1					0,01637	2,53E-03	

Tabella 11 – Confronti dei livelli ematici di tutti i biomarcatori negli animali omozigoti opposti per PON. Nella prima parte della tabella sono riportate le medie di gruppo nei 3 tempi di prelievo, nella seconda parte la significatività statistica dell'effetto di genotipo, tempo e della loro interazione.

PARAMETRO	Gruppo	tempo			SEM	p-values		
		-7	+5	+30		Genotipo	Tempo	Genotipo*Tempo
GGT (U/l)	A1PON	20,7	22,5	26	2,12	0,7317	***	0,6866
	A2PON	22,1	22,7	25,9			1,79E-06	
GOT (U/ml)	A1PON	75,3	96,4	88,7	6,4	0,2065	***	0,2803
	A2PON	65,8	97,7	80,5			6,43E-09	
BILIRUBINA TOT (mcmol/l)	A1PON	2,39	1,56	2,45	0,558	0,190497	0,610198	**
	A2PON	2,25	3,64	2,06				0,001752
ALP (U/l)	A1PON	34,9	34,1	35,2	3,79	0,3347	0,745	0,7171
	A2PON	35,8	38,2	38,5				
GLUCOSIO (mmol/l)	A1PON	0,1694	0,1486	0,141	0,1694	0,97913	0,1125	0,07981
	A2PON	0,0695	0,0593	0,0586				
COLESTEROLO (mmol/l)	A1PON	2,43	2,41	3,53	0,291	0,31856	***	*
	A2PON	2,75	2,19	4,1			<0,0000000000000002	0,01745
NEFA (mmol/l)	A1PON	0,364	0,261	0,329	0,071	0,56959	0,67716	*
	A2PON	0,314	0,428	0,292				0,02268
BHB (mmol/l)	A1PON	0,414	0,495	0,471	0,0594		**	

	A2PON	0,34	0,552	0,463		0,825479	0,001562	0,258639
UREA (mmol/l)	A1PON	4,61	4,94	5,43	0,482		***	
	A2PON	4,4	5,03	6,02		0,6707	5,97E-05	0,3116
CREATININA (mcmol/l)	A1PON	87,4	84	77	4,4		***	
	A2PON	98,2	87,2	79,7		0,1213	2,90E-08	0,1688
APTOGLOBINA(g/l)	A1PON	0,496	0,527	0,749	0,1204		***	
	A2PON	0,31	0,296	0,749		0,17464	1,04E-06	0,21214
CERULOPLASMINA (mcmol/l)	A1PON	1,67	2,46	2,69	0,2232		***	
	A2PON	1,35	2,42	2,3		0,1479	7,07E-13	0,2318
PROTEINE TOTALI (g/l)	A1PON	74,5	76,4	84,6	3,04		***	
	A2PON	76,5	73,8	80		0,4347	3,93E-07	0,1341
ALBUMINE (mmol/l)	A1PON	35,2	34,1	35,1	1,115		***	
	A2PON	35,3	33,1	35,4		0,8428786	9,52E-04	0,3511869
GLOBULINE	A1PON	36,9	49,5	42,3	2,644		***	**
	A2PON	40,8	44,6	40,7		0,685772	1,45E-08	5,77E-03
PARAOXONASI (U/ml)	A1PON	59,5	55,8	73,7	9,89	*	***	
	A2PON	76,9	71,7	91		0,0337767	3,19E-04	0,9858569
MIELOPEROSSIDASI (U/l)	A1PON	434	460	417	25,17		**	
	A2PON	435	461	409		0,910977	1,89E-03	0,937313
CALCIO (mmol/l)	A1PON	2,49	2,38	2,38	0,062		***	

	A2PON	2,56	2,37	2,44		0,4060834	2,51E-04	0,4515735
FOSFORO (mmol/l)	A1PON	1,83	1,79	1,67	0,1308		*	
	A2PON	1,92	1,65	1,65		0,81842	0,04281	0,37646
MAGNESIO (mmol/l)	A1PON	0,787	0,808	0,895	0,0516		***	*
	A2PON	0,945	0,823	0,943		0,0664865	3,21E-04	0,042312
SODIO (mmol/l)	A1PON	143	148	146	1,544		**	***
	A2PON	149	147	144		0,30495	8,68E-03	1,68E-04
POTASSIO (U/l)	A1PON	4,08	4,19	4,08	0,1467			*
	A2PON	4,31	3,95	3,86		0,41533	0,0734	0,03113
CLORO (mmol/l)	A1PON	106	104	103	1,654		***	
	A2PON	110	104	102		0,41125	9,92E-06	0,05889
ZINCO (mcmol/l)	A1PON	9,99	9	0,73	0,937	**	**	
	A2PON	12,54	10,55	10,59		0,006279	6,15E-03	0,63087
AOPP (mcmol/l)	A1PON	1,67	1,61	1,68	0,0502		***	
	A2PON	1,75	1,6	1,71		0,3911469	2,04E-04	0,2985205
FRAP (mcmol/l)	A1PON	120	148	151	9,84		***	
	A2PON	128	162	160		0,2087	6,01E-09	0,7768
SHp (mcmol/l)	A1PON	264	281	263	18,42		*	
	A2PON	267	293	263		0,67973	4,45E-02	0,8281
ROM TOT (U/l)	A1PON	7,92	12,86	13,18	1,452	*	***	

	A2PON	6,59	10,75	9,74		0,03903	2,06E-07		0,40525
--	-------	------	-------	------	--	---------	----------	--	---------

Tabella 12 - Confronti dei livelli ematici di paraoxonasi, bilirubina totale, colesterolo, globuline, NEFA, magnesio, potassio negli animali omozigoti opposti per PON. La presente tabella ha lo scopo di precisare la significatività statistica della differenza tra i livelli ematici di 2 gruppi nei 3 tempi di prelievo.

Metabolita	Gruppo	Medie			SEM	p-values					
		-7	+5	+30		-7	+5	+30	Genotipo	Tempo	Genotipo*Tempo
PARAOXONASI (U/l)	A1PON	59,5	55,8	73,7	9,89	0,5775	0,5196	0,427	*	***	0,9858569
	A2PON	76,9	71,7	91					0,0337767		
BILIRUBINA TOT (mcmol/l)	A1PON	2,39	1,56	2,45	0,558	0,9999	0,0087	0,9728			**

	A2PON	2,25	3,64	2,06					0,190497	0,610198	0,001752
COLESTEROLO (mmol/l)	A1PON	2,43	2,41	3,53	0,291	0,9115	0,9647	0,2801		***	*
	A2PON	2,75	2,19	4,1					0,31856	<0,00000000000000002	0,01745
GLOBULINE (g/l)	A1PON	36,9	49,5	42,3	2,644	0,7465	0,9869	0,3749		***	**
	A2PON	40,8	44,6	40,7					0,685772	1,45E-08	5,77E-03
NEFA (mmol/l)	A1PON	0,364	0,261	0,329	0,071	0,987	0,1347	0,9914			*
	A2PON	0,314	0,428	0,292					0,56959	0,67716	0,02268
MAGNESIO (mmol/l)	A1PON	0,787	0,808	0,895	0,0516	0,0558	0,9995	0,9178		***	*
	A2PON	0,945	0,823	0,943					0,0664865	3,21E-04	0,042312
POTASSIO (U/l)	A1PON	4,08	4,19	4,08	0,1467	0,6764	0,4485	0,5543			*
	A2PON	4,31	3,95	3,86					0,41533	0,0734	0,03113

Tabella 13 – Confronti dei livelli ematici di tutti i biomarcatori negli animali omozigoti opposti per CuCp. Nella prima parte della tabella sono riportate le medie di gruppo nei tre tempi di prelievo, nella seconda parte la significatività statistica dell'effetto di genotipo, tempo e della loro interazione.

PARAMETRO	Gruppo	tempo			SEM	p-values		
		-7	+5	+30		Genotipo	Tempo	Genotipo*Tempo
GGT (U/l)	A1CuCp	20,1	26,8	20	1,191	0,8804	*** 2,24E-10	0,109
	A2CuCp	21,4	24,7	20,2				
GOT (U/ml)	A1CuCp	65,6	82,9	95,4	4,11	0,328	*** 2,08E-14	0,3837
	A2CuCp	71,8	82,2	102,1				
BILIRUBINA TOT (mcmol/l)	A1CuCp	2,26	2,57	5,3	0,463	0,9401	*** 1,50E-10	0,3883
	A2CuCp	2,8	2,6	4,82				
ALP (U/l)	A1CuCp	40,7	39,4	43,7	3,48	0,7725	0,8196	0,3522
	A2CuCp	39,3	42,1	39,5				
GLUCOSIO (mmol/l)	A1CuCp	4,21	4,23	3,97	0,0846	0,7348	*** 2,81E-05	0,7929
	A2CuCp	4,29	4,24	3,96				
COLESTEROLO (mmol/l)	A1CuCp	2,541	3,548	1,959	2,08	0,3189	*** <0,0000000000000002	0,5047
	A2CuCp	2,911	3,656	2,104				
NEFA (mmol/l)	A1CuCp	0,268	0,348	0,591	2,03E-03	0,9936	*** 8,42E-08	0,2088
	A2CuCp	0,354	0,299	0,545				
BHB (mmol/l)	A1CuCp	0,346	0,466	0,677	0,0413		***	

	A2CuCp	0,34	0,425	0,588		0,2208	2,27E-11	0,5051
UREA (mmol/l)	A1CuCp	4,38	5,41	4,86	0,27		***	
	A2CuCp	4	5,44	4,95		0,7135	3,21E-06	0,5376
CREATININA (mcmol/l)	A1CuCp	104	83,6	90,6	2,49		***	
	A2CuCp	99,7	80,7	87,9		0,1987	<0,0000000000000002	0,8709
APTOGLOBINA(g/l)	A1CuCp	0,239	0,264	0,6	1,182		***	
	A2CuCp	0,218	0,282	0,6		0,9601	2,35E-10	0,842
CERULOPLASMINA (mcmol/l)	A1CuCp	1,31	2,54	2,32	0,134		***	
	A2CuCp	1,61	2,49	2,59		0,1876	<0,0000000000000002	0,1479
PROTEINE TOTALI (g/l)	A1CuCp	75,1	82,3	72,8	1,78		***	
	A2CuCp	77,7	82,6	78,4		0,11936	1,34E-07	0,08913
ALBUMINE (mmol/l)	A1CuCp	35	35,5	33,2	0,698		***	
	A2CuCp	36,3	36,2	34,3		0,1583	1,45E-05	0,8385
GLOBULINE	A1CuCp	40	46,8	39,6	1,62		***	
	A2CuCp	42,2	47,1	44,1		0,1787	1,51E-07	1,11E-01
PARAOXONASI (U/ml)	A1CuCp	69,2	76,8	70,1	4,58			
	A2CuCp	73,9	79,55	69,6		0,56898	6,53E-02	0,78335
MIELOPEROSSIDASI (U/l)	A1CuCp	412	430	467	13,1		***	
	A2CuCp	440	416	467		0,6817	7,72E-05	0,1697
CALCIO (mmol/l)	A1CuCp	2,53	2,45	2,34	0,0397		***	

	A2CuCp	2,57	2,47	2,35		0,5627	1,19E-08	0,8352
FOSFORO (mmol/l)	A1CuCp	2,05	1,57	1,5	0,0784		***	
	A2CuCp	1,96	1,57	1,55		0,8602	2,70E-09	0,7039
MAGNESIO (mmol/l)	A1CuCp	0,941	0,934	0,85	0,0249		***	
	A2CuCp	0,913	0,979	0,851		0,7925	6,20E-07	0,1891
SODIO (mmol/l)	A1CuCp	149	145	147	0,961		***	
	A2CuCp	148	144	147		0,4977	3,05E-05	0,6371
POTASSIO (U/l)	A1CuCp	4,36	3,88	3,94	0,0849		***	
	A2CuCp	4,3	3,9	3,9		0,7385	1,35E-10	0,7337
CLORO (mmol/l)	A1CuCp	109	104	106	0,891		***	
	A2CuCp	109	103	104		0,2223	6,87E-13	0,4991
ZINCO (mcmol/l)	A1CuCp	12,3	11,1	11,1	0,536		***	
	A2CuCp	12,9	10,2	10,5		0,5184	2,31E-05	0,1658
AOPP (mcmol/l)	A1CuCp	57,544	47,863	45,709	1,083		***	
	A2CuCp	58,884	51,286	42,658		0,9235	5,67E-06	0,3353
FRAP (mcmol/l)	A1CuCp	121	160	166	7,1		***	
	A2CuCp	138	170	169		0,2201	7,16E-14	0,282
SHp (mcmol/l)	A1CuCp	270	295	281	12,11			
	A2CuCp	276	290	273		0,7869	1,59E-01	0,7786
ROM TOT (U/l)	A1CuCp	8,89	10,55	11,15	0,926		***	

	A2CuCp	7,84	10,17	11,05		0,632	1,75E-08		0,1732
--	--------	------	-------	-------	--	-------	----------	--	--------

7. Bibliografia

- Berghof, T.V.L., Poppe, M. and Mulder, H.A. (2019) 'Opportunities to Improve Resilience in Animal Breeding Programs', *Frontiers in Genetics*, 9, pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00692>.
- Bernabucci, U. *et al.* (2002) 'Markers of Oxidative Status in Plasma and Erythrocytes of Transition Dairy Cows During Hot Season', *Journal of Dairy Science*, 85(9), pp. 2173–2179. Available at: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74296-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74296-3).
- Bertoni* G., Trevisi E. and Piccioli-Cappelli F. (2004) 'Effects of Acetylsalicylate Used in Post-calving of Dairy Cows', *Veterinary Research Communications*, 28 (2004) 217–219, 2004 Kluwer Academic Publishers [Preprint].
- Bertoni, G. and Trevisi, E. (2013a) 'Use of the liver activity index and other metabolic variables in the assessment of metabolic health in dairy herds', *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 29(2), pp. 413–431. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.04.004>.
- Bertoni, G. and Trevisi, E. (2013b) 'Use of the Liver Activity Index and Other Metabolic Variables in the Assessment of Metabolic Health in Dairy Herds', *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 29(2), pp. 413–431. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.04.004>.
- Calamari, L. *et al.* (2016) 'Assessment of the main plasma parameters included in a metabolic profile of dairy cow based on Fourier Transform mid-infrared spectroscopy: Preliminary results', *BMC Veterinary Research*, 12(1), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0621-4>.
- Cannon, W. (1929) *Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage: An Account of Recent Research into the Function of Emotional Excitement*. New York.
- Chang, C.C. *et al.* (2015) 'Second-generation PLINK: Rising to the challenge of larger and richer datasets.', *GigaScience*, 4.
- Cohen, S., Janicki-Deverts, D. and Miller, G.E. (2007) 'Psychological Stress and Disease', *JAMA*, 298(14), p. 1685. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.298.14.1685>.
- Colditz, I.G. and Hine, B.C. (2016) 'Resilience in farm animals: biology, management, breeding and implications for animal welfare', *Animal Production Science*, 56(12), p. 1961. Available at: <https://doi.org/10.1071/AN15297>.
- Esposito, G. *et al.* (2014) 'Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows', *Animal Reproduction Science*, 144(3–4), pp. 60–71. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.11.007>.
- Halliwell B. (2007) 'Biochemistry of oxidative stress', *Biochemical society transactions* [Preprint].
- Ingvartsen, K.L. (2006) 'Feeding- and management-related diseases in the transition cow', *Animal Feed Science and Technology*, 126(3–4), pp. 175–213. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.08.003>.

- Jordan, E.R. (2003) 'Effects of Heat Stress on Reproduction', *Journal of Dairy Science*, 86, pp. E104–E114. Available at: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)74043-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)74043-0).
- Knapp, J.R. *et al.* (2014) 'Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions', *Journal of Dairy Science*, 97(6), pp. 3231–3261. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7234>.
- Liu, J. *et al.* (2019) 'Effects of heat stress on body temperature, milk production, and reproduction in dairy cows: a novel idea for monitoring and evaluation of heat stress — A review', *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 32(9), pp. 1332–1339. Available at: <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0743>.
- Liu, Y., Wang, Y. and Jiang, C. (2017) 'Inflammation: The Common Pathway of Stress-Related Diseases', *Frontiers in Human Neuroscience*, 11, pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnhum.2017.00316>.
- Mezzetti, M. *et al.* (2021) 'The Transition Period Updated: A Review of the New Insights into the Adaptation of Dairy Cows to the New Lactation', *Dairy*, 2(4), pp. 617–636. Available at: <https://doi.org/10.3390/dairy2040048>.
- Milanesi, M. *et al.* (2021) 'Genetic Regulation of Biomarkers as Stress Proxies in Dairy Cows', *Genes*, 12(4), p. 534. Available at: <https://doi.org/10.3390/genes12040534>.
- Moberg, G.P. (1985) 'Biological Response to Stress: Key to Assessment of Animal Well-Being?', in *Animal Stress*. New York, NY: Springer New York, pp. 27–49. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7544-6_3.
- Premi, M. *et al.* (2021) 'Changes of Plasma Analytes Reflecting Metabolic Adaptation to the Different Stages of the Lactation Cycle in Healthy Multiparous Holstein Dairy Cows Raised in High-Welfare Conditions', *Animals*, 11(6), p. 1714. Available at: <https://doi.org/10.3390/ani11061714>.
- Purcell, S. *et al.* (2007) 'PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses.', *The American Journal of Human Genetics*, 81, pp. 559–575. Available at: <https://doi.org/10.1086/519795>.
- Quan, N. and Banks, W.A. (2007) 'Brain-immune communication pathways', *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(6), pp. 727–735. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.05.005>.
- Roche, J.F., Mackey, D. and Diskin, M.D. (2000) 'Reproductive management of postpartum cows', *Animal Reproduction Science*, 60–61, pp. 703–712. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00107-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00107-X).
- Sordillo, L.M., Contreras, G.A. and Aitken, S.L. (2009) 'Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows', *Animal Health Research Reviews*, 10(1), pp. 53–63. Available at: <https://doi.org/10.1017/S1466252309990016>.
- Tao, S. and Dahl, G.E. (2013) 'Invited review: Heat stress effects during late gestation on dry cows and their calves', *Journal of Dairy Science*, 96(7), pp. 4079–4093. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6278>.
- Thompson-crispi, K.A. *et al.* (2014) 'A genome-wide association study of immune response traits in Canadian Holstein cattle', *BMC Genomics*, 15(559), pp. 1–10.
- Trevisi, E. *et al.* (2011) 'Inflammatory Response and Acute Phase Proteins in the Transition Period of High-Yielding Dairy Cows', in *Acute Phase Proteins as Early Non-*

Specific Biomarkers of Human and Veterinary Diseases. InTech. Available at: <https://doi.org/10.5772/20747>.

Trevisi, E. *et al.* (2012) 'Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows', *Research in Veterinary Science*, 93(2), pp. 695–704.

Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.11.008>.

Trevisi, E. (2015) 'Biomarcatori ematici', *Bianconero*, Gen-Feb, pp. 21–25.

Trevisi, E. and Minuti, A. (2018) 'Assessment of the innate immune response in the periparturient cow', *Research in Veterinary Science*. Elsevier B.V., pp. 47–54.

Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.12.001>.

Trevisi, E., Moscati, L. and Amadori, M. (2016) 'Disease-Predicting and Prognostic Potential of Innate Immune Responses to Noninfectious Stressors: Human and Animal Models', in M. Amadori (ed.) *The Innate Immune Response to Noninfectious Stressors*. The Netherlands: Elsevier, pp. 209–235. Available at:

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801968-9.00009-X>.