



1222-2022
800
ANNI



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Studio delle variazioni dei profili metabolomici attraverso analisi di campioni sierologici di bovine da latte sane ed iperchetonemiche: risultati preliminari del progetto "BOVINE OMICS"

Dott.ssa V.Faillace e Prof. E. Fiore

Università degli studi di Padova – Dipartimento MAPS

Convegno ORUS, 21 Novembre 2019 Legnaro

PROGETTO "BOVINE OMICS"

Introduzione



Chetosi

Definizione

- Abnorme concentrazione nei tessuti e nei fluidi dell'organismo di «**Corpi Chetonici**»:
- Acido Acetoacetico (AcAc),
- Acetone (Ac);
- Beta Idrossibutirrato (BHB).

Eziologia

- La Chetosi è il risultato di un «bilancio energetico negativo» (BEN o NEB) che si verifica nelle prime settimane di lattazione caratterizzato dalla riduzione del glucosio nel sangue e nel fegato, ed un incremento della mobilizzazione dei grassi di deposito.

Chetosi primaria

- Bilancio Energetico Negativo

Chetosi Secondaria

- Lipidosi epatica
- Insulino-resistenza
- Ingestione di corpi chetonici
- Carenza di cobalto (Carenza di B12)

PROGETTO "BOVINE OMICS"

Introduzione

PERDITE ECONOMICHE

Azienda 100 capi = 8000 litri di media

3% Chetosi clinica e 30% Chetosi Sub clinica

Chetosi è associata a patologie metaboliche e riproduttive
(LDA, Rit Placenta, Metrite, Cisti Ovariche, Zoppie)

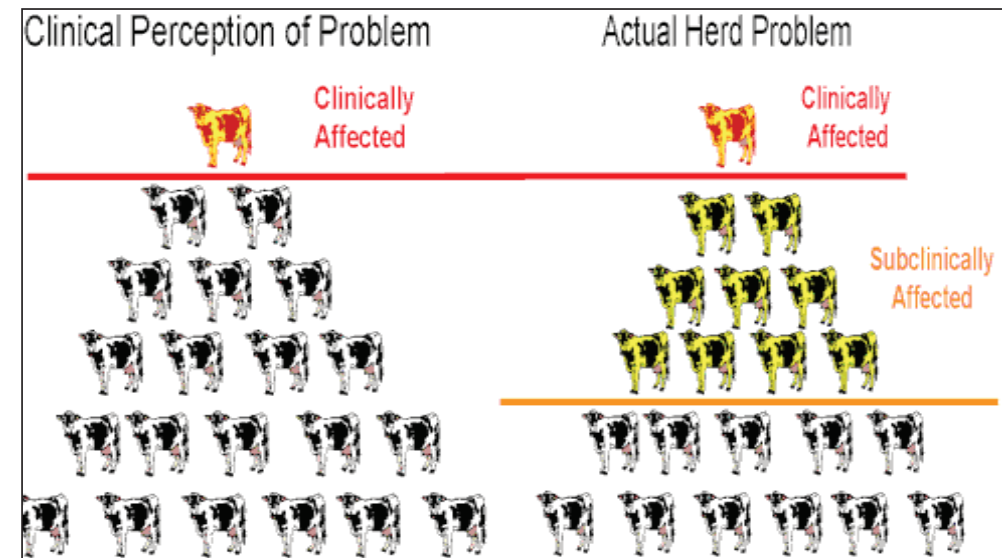
Stima Per Vacca Affetta da Chetosi = 828 – 1.095 Euro

Costi Diretti e Indiretti:

Terapia, Alimentazione/Interparto, Gestione, Rit Placenta, Metrite, Cisti Ovariche, Zoppie ecc.

(Esslemont et al.,2012)

Stima sulla mandria = 27.500 Euro



PROGETTO "BOVINE OMICS"

Introduzione

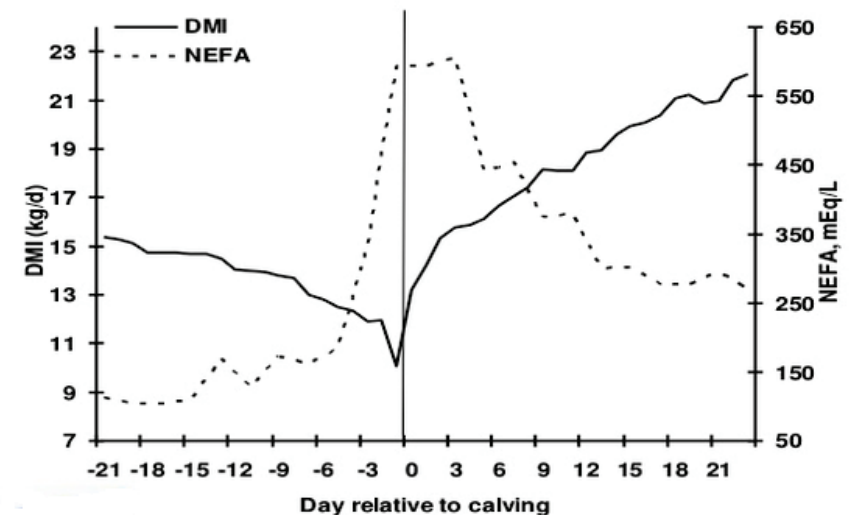
Marker di Chetosi ed Eccessiva Mobilizzazione Lipidica in BEN

NEFA

- Valore più accurato per predire l'instaurarsi di patologie
- Forte indicatore di NEB
- Indipendente dal momento del prelievo
- Aumenta in condizioni di stress

BHB

- Metodo più pratico e meno costoso
- Valutabile su diversi substrati (sangue, latte, urina)
- Concentrazione fluttuante durante il giorno con picco 4-5 h dopo pasto
- Chetone più stabile ma accuratezza minore



PROGETTO "BOVINE OMICS"

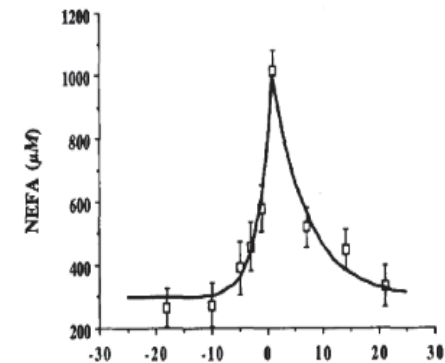
Introduzione

Marker di Chetosi ed Eccessiva Mobilizzazione Lipidica in BEN

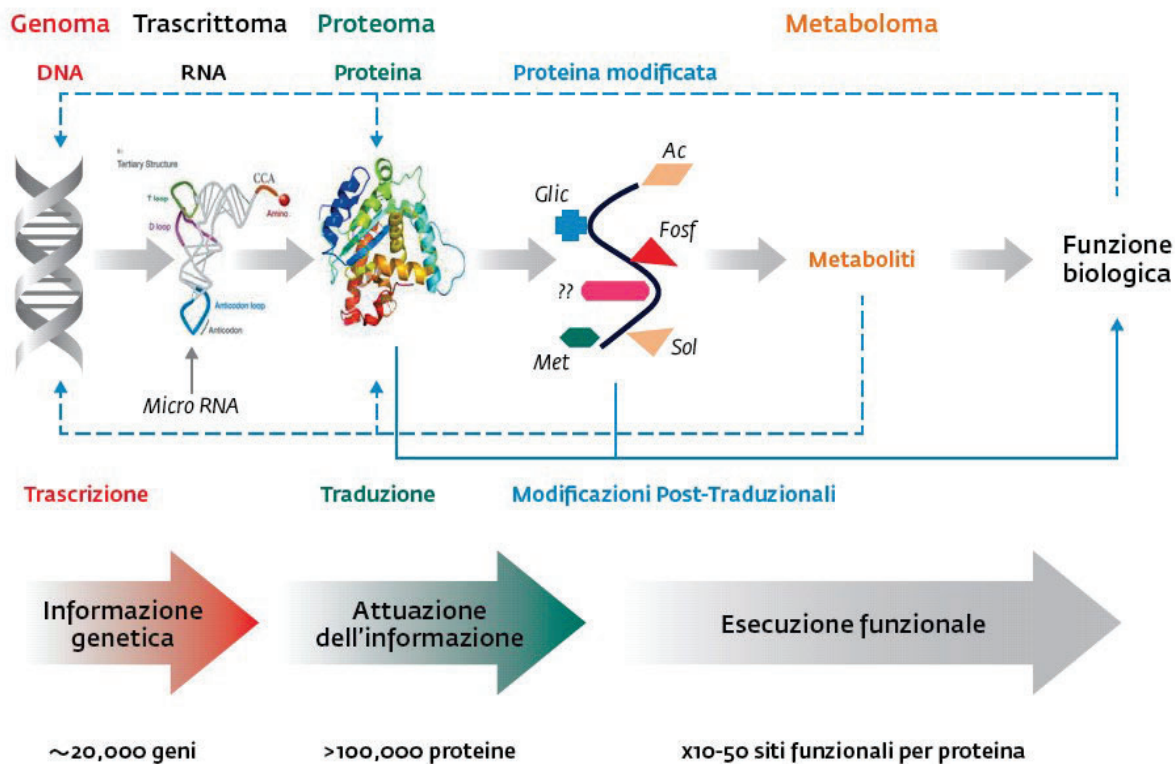
Marker di eccessivo BEN
Oggetto di valutazione clinica

NEFA: indice della mobilizzazione lipidica in pre-parto (2-14 giorni)
normo valore sierico in pre parto < **0,29mEq/L**
normo valore sierico in post parto < **0,56mEq/L**
(Ospina et al., 2010)

BHB: indice dell'ossidazione di NEFA in post-parto (5-50 DIM)
normo valore sierico in post parto < **1,2 mmol/L**
(McArt et al., 2012;Dirksen et al., 2004)
iperchetonemia con sviluppo di **chetosi subclinica**: $1,2 \leq \text{BHB} \leq 1,9 \text{ mmol/L}$
iperchetonemia con sviluppo di **chetosi clinica**: $\text{BHB} \geq 2,0-3,0 \text{ mmol/l}$
(Oetzel, 2004)



SCIENZE «OMICHE»

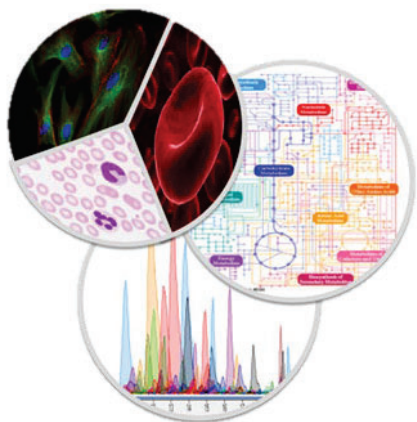


SCIENZE “OMICHE” studiano:

- pool di molecole biologiche (es., ioni, acidi nucleici, proteine, enzimi) in determinati campioni biologici (es., siero, urine, liquor, saliva, tessuti).

Esse analizzano, nel loro insieme:

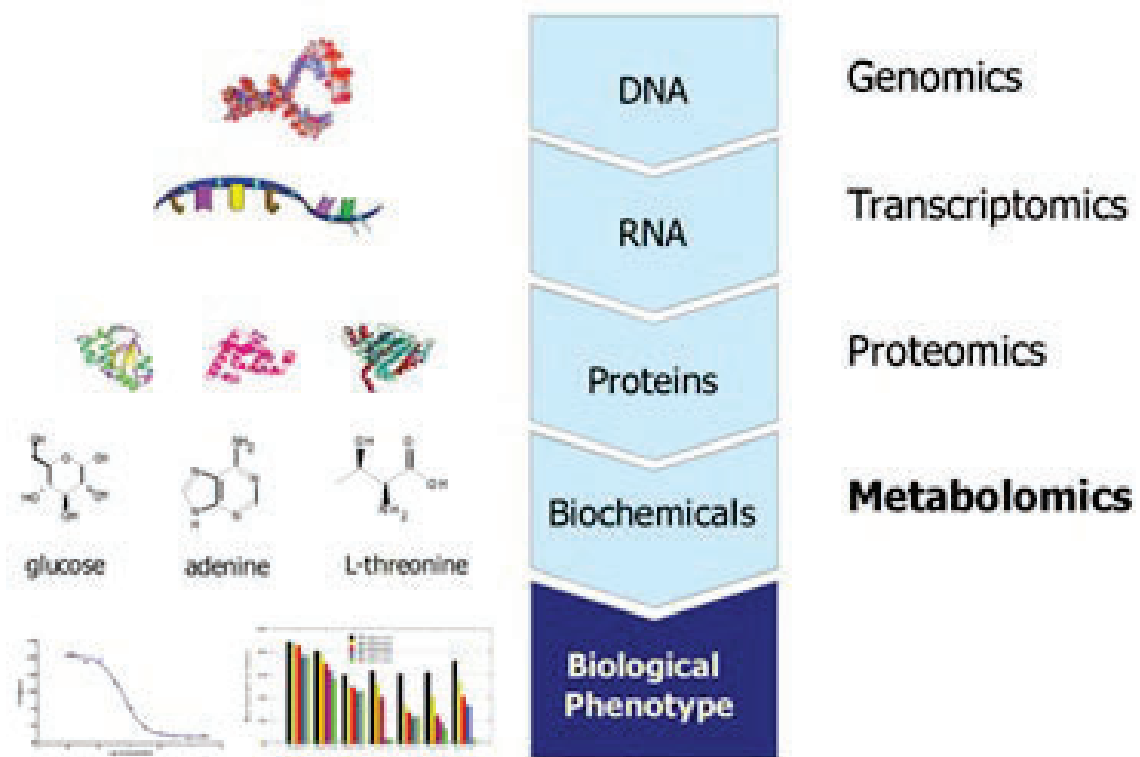
- i geni del DNA (genomica) e le loro funzioni (genomica funzionale);
- i trascritti del DNA, cioè l'RNA (trascrittomica);
- le proteine (proteomica);
- i metaboliti all'interno di un organismo (metabolomica).

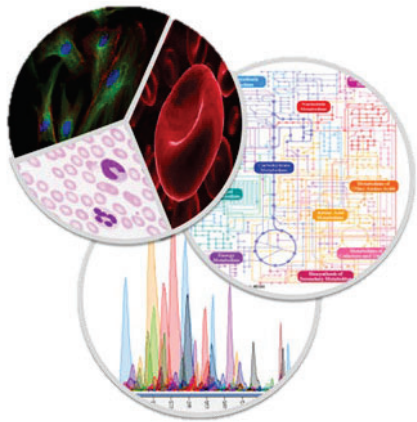


METABOLOMICA

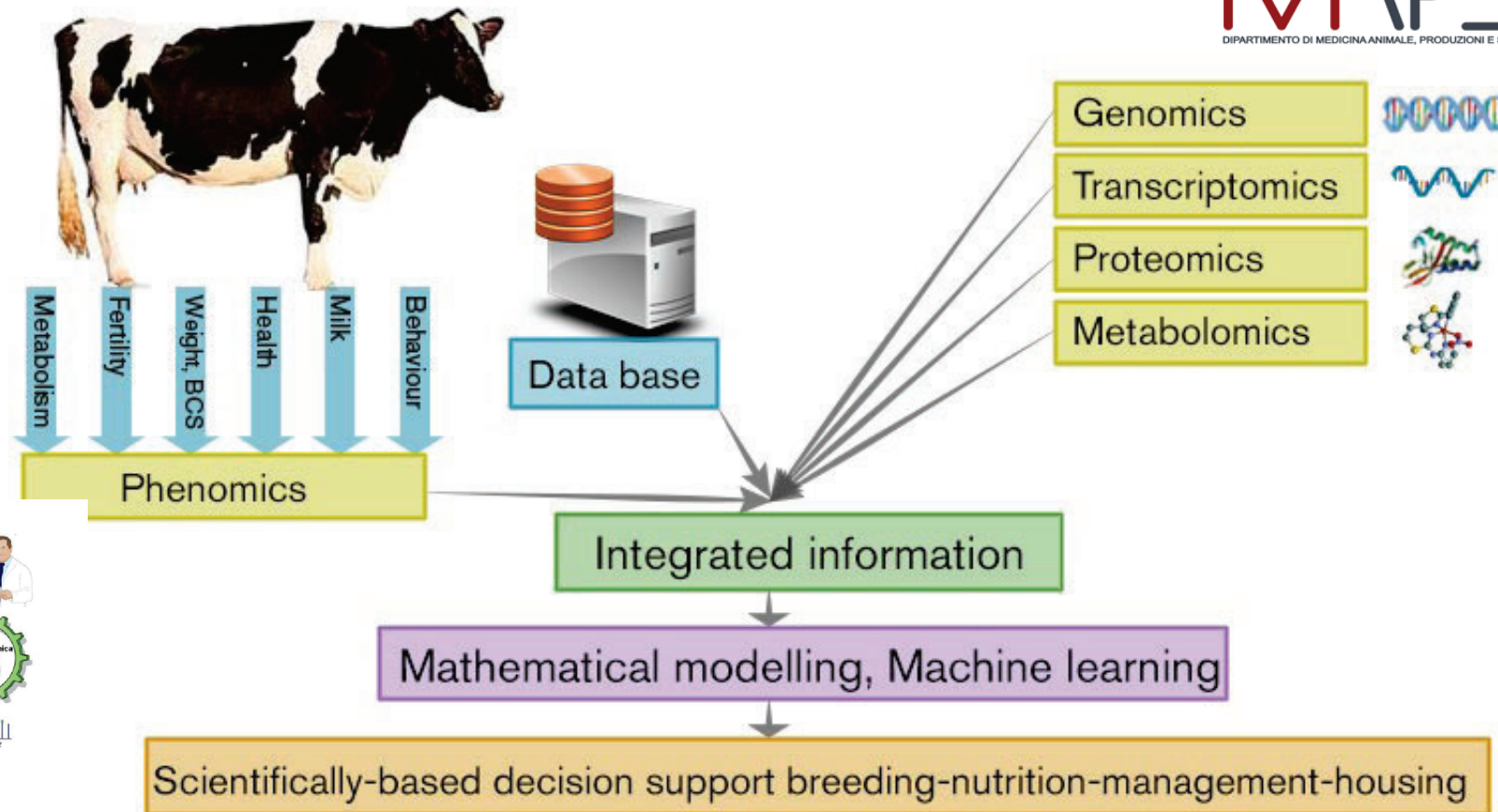
“L’ANALISI GLOBALE E QUANTITATIVA DI TUTTI I METABOLITI” (Fiehn, 2002)

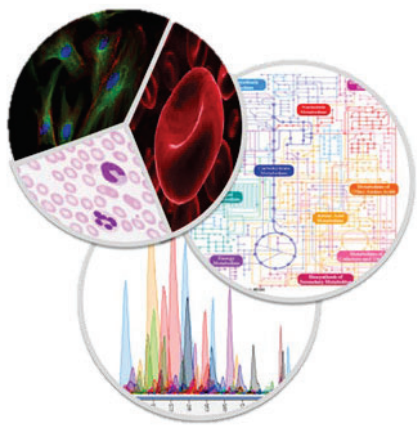
- La più recente tra le scienze «omiche».
- Analizza e interpreta le funzioni dei metaboliti (molecole di basso peso molecolare) di un determinato sistema biologico (cellula, tessuto, sistema, organismo) sotto l’influenza di una serie di condizioni. (Kell et al., 2006; Wikoff et al., 2007).
- Fenotipo → interazione tra geni ed ambiente.





METABOLOMICA

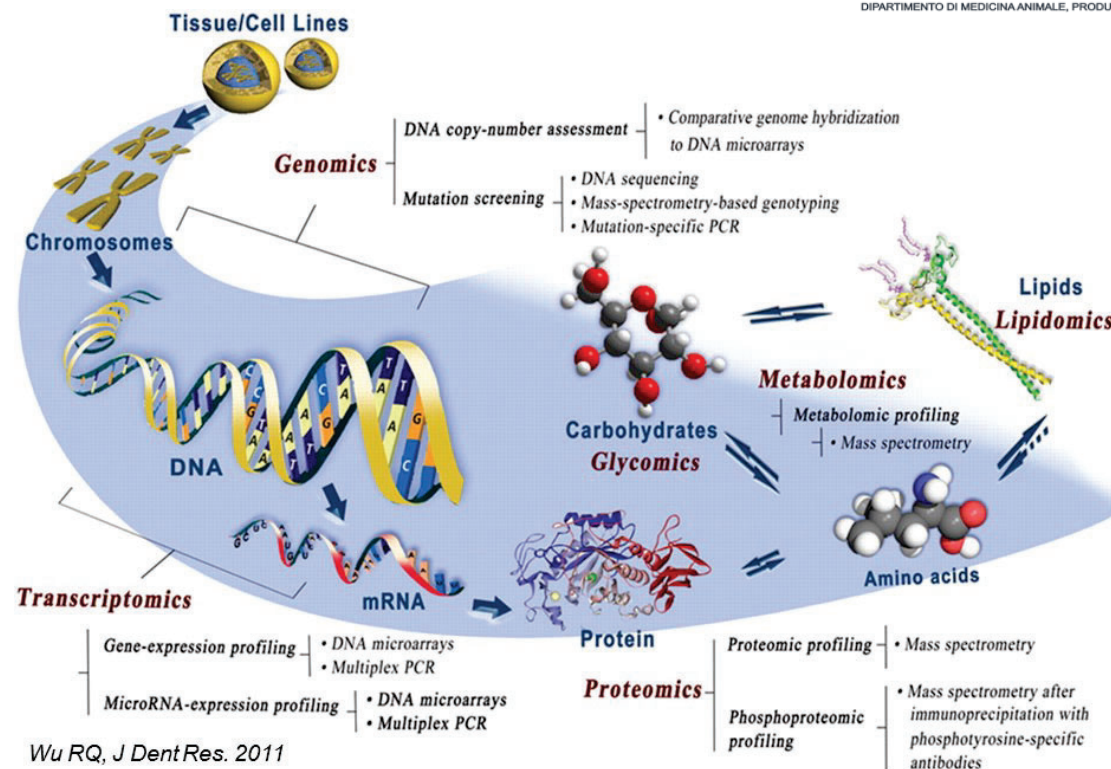


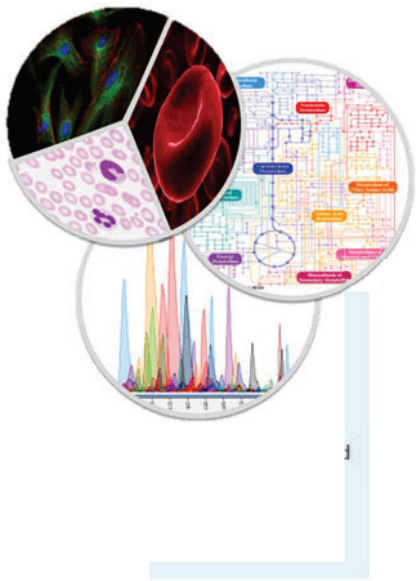


METABOLOMICA

I metaboliti sono piccole molecole con un ruolo molto importante nei sistemi biologici (organismo) e ci aiutano a comprendere numerose malattie.

Secondo la Harvard Medical School, la misurazione dei metaboliti è oggi il modo più semplice ed efficace per valutare la salute di un individuo.





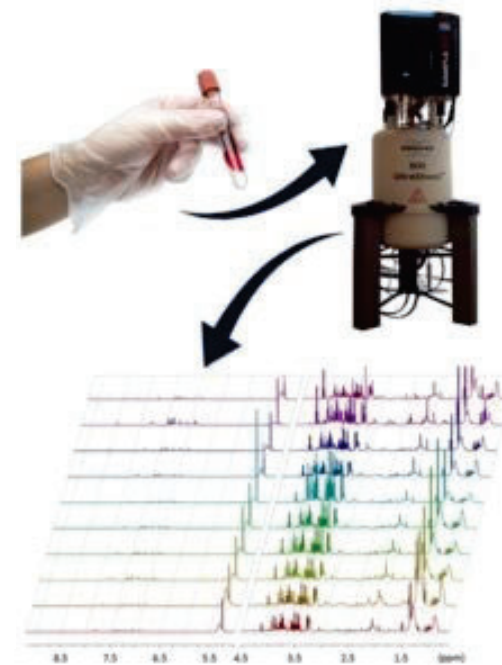
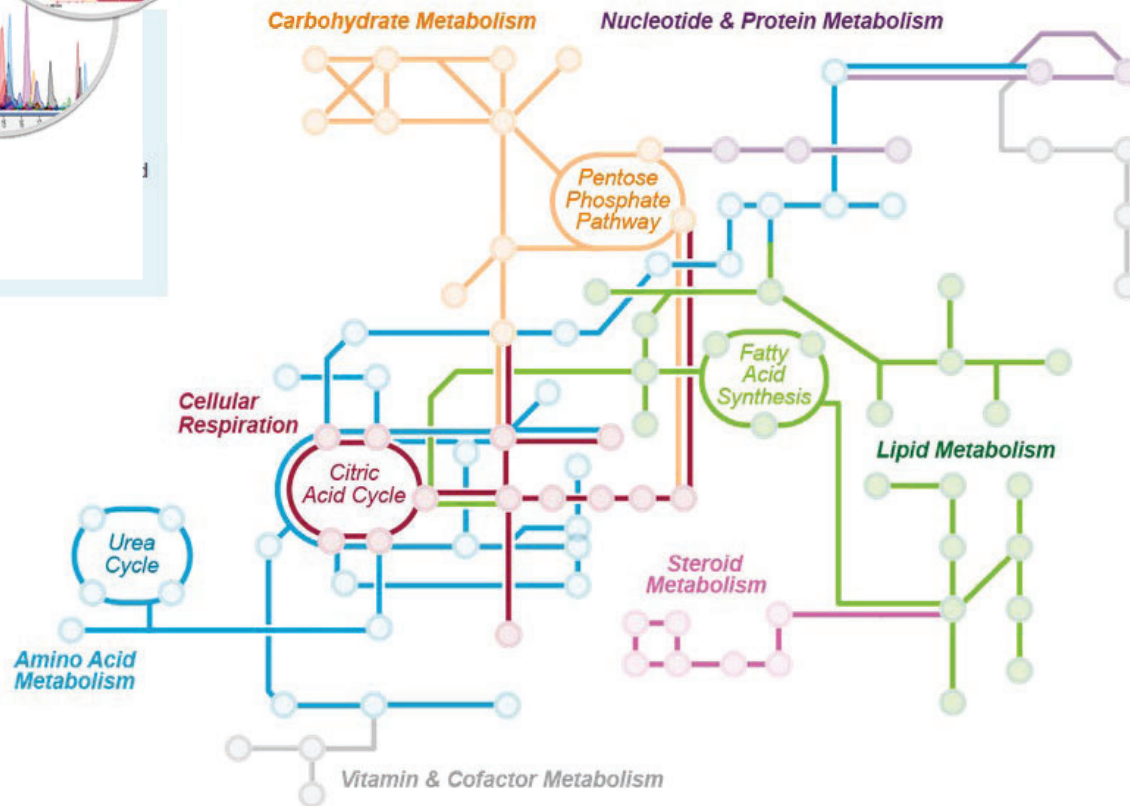
METABOLOMICA

1222-2022
8 ANNI



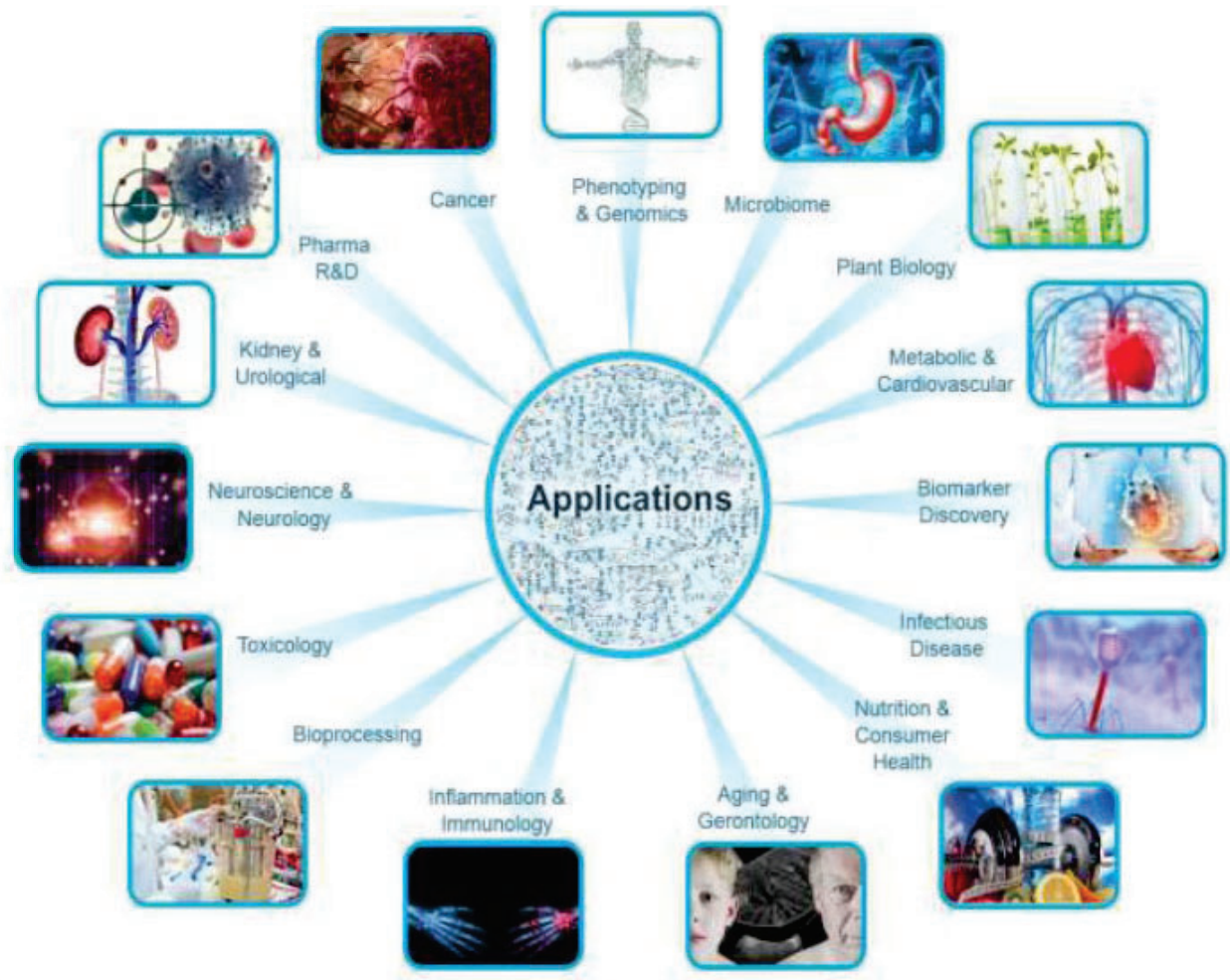
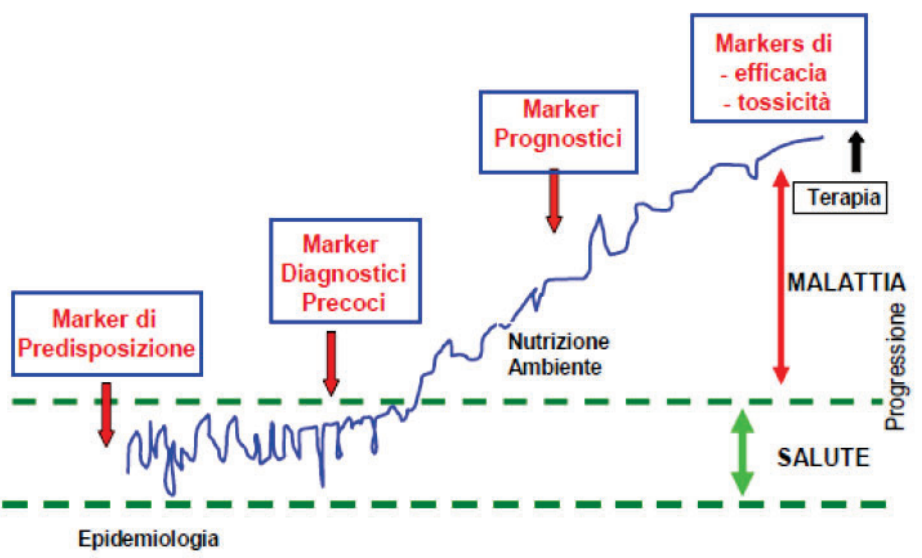
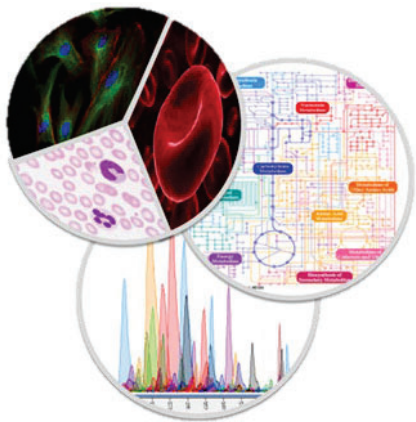
UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

MAPS
DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE



Convegno ORUS, 21 Novembre 2019 Legnaro

METABOLOMICA



PROGETTO "BOVINE OMICS"

Approfondire la conoscenza della chetonemia nella prima fase della lattazione.

Caratterizzare i metaboliti del sangue di bovine sane ed in chetosi e identificare dei possibili biomarkers predittivi di malattia.

Infine si approfondirà in altre specie ruminanti la valutazione del profilo lipidico del plasma di soggetti in chetosi .



progetto FINANZIATO da Budget Integrato per la Ricerca dei Dipartimenti dell'Ateneo di Padova (BIRD 2019)



PROGETTO "BOVINE OMICS"

Materiali e Metodi



50 bovine di razza Frisona

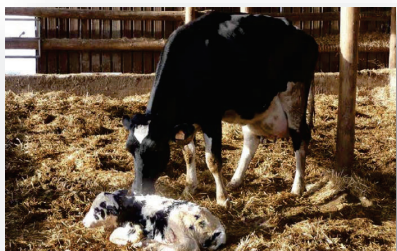
- Stabulazione libera con cuccette dotate di materassino
- Alimentazione UNIFEED
- Media DIM pari a 26,5
- Produzione media di 29,5 Kg/die

Composizione chimica TMR

Lattazione %SS

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

UFL: Unità Foraggiata Latte, Unité Fouragère Lait; CP: proteina grezza, Crude protein; PD: proteina digeribile, protein digestible; PDIN: proteina digeribile nell'intestino quando non vi è disponibilità di azoto per le fermentazioni ruminali, protein digested in the small intestine when rumen-fermentable nitrogen is limiting PDIE: proteine digerite nel piccolo intestino quando l'energia per le fermentazioni ruminali è limitata, protein digested in the small intestine when rumen-fermentable energy is limiting; PDIA: aminoacidi assorbiti nell'intestino provenienti dalle proteine alimentari non degradate nel rumine, dietary protein undegraded in the rumen but truly digestible in the small intestine; NDF: fibra neutra detergente, neutral detergent fiber; ADF: fibra acida detergente, acid detergent fiber; ADL: lignina acida detergente, acid detergent lignin; EE: etere estratto, ether extract; ASH: ceneri, Ashes; ST: amido, Starch; NSC: carboidrati non-strutturali, non-structural carbohydrates; Ca: calcio, calcium; P: fosforo, phosphorus.



PROGETTO "BOVINE OMICS"

Materiali e Metodi

Per ogni capo bovino:

- BCS (*body condition score*)
- PARITY
- DIM (day in milk)
- KG LATTE/ DIE
- VISITA CLINICA

Campionamento:

Prelievo di sangue venoso dalla vena giugulare esterna con sistema vacutainer in provette Venosafe con Clot Activator per le analisi su siero

GUIDA PER STABILIRE L'INDICE DI CONDIZIONE CORPOREA DELLE BOVINE DA LATTE

Primo: guardare la regione pelvica di lato. Controllare la linea che unisce gli ischi. La testa del femore e gli ischi.

Se la linea forma una 'V' schiacciata, allora si può considerare un BCS inferiore a uguale a 2,0. Si può quindi procedere all'analisi delle figure 1-4.

Se gli ischi sono arrotondati, il BCS è 3,0.

Se gli ischi sono arrotondati, la vacca ha un BCS 2,75. Se il petto è pesante, il BCS è 2,50. Se il petto è medio, il BCS è 2,25. Se il petto è leggero, il BCS è 2,00. Se il fasciature è prominente, il BCS è 2,00. Se il fasciature è prominente, il BCS è 2,00.

Se gli ischi sono arrotondati, la vacca ha un BCS 2,75. Se il petto è pesante, il BCS è 2,50. Se il petto è medio, il BCS è 2,25. Se il petto è leggero, il BCS è 2,00. Se il fasciature è prominente, il BCS è 2,00. Se il fasciature è prominente, il BCS è 2,00.

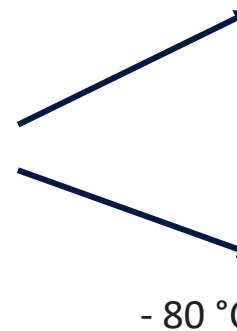
Se la linea trocateri del 4 è completamente piatta, il BCS è 4,0.

Se le estremità del processo travertebrale sono appena visibili, il BCS è 4,25.

Se la linea trocateri del 4 è completamente piatta e gli ischi sono ben ricoperti, il BCS è 4,5.

Se gli ischi sono appena visibili, il BCS è 3,75. Se tutte le estremità sono visibili, il BCS è 3,50. Se le estremità sono visibili, il BCS è 3,25. Se le estremità sono visibili, il BCS è 3,00.

2 aliquote



- 80 °C





PROGETTO "BOVINE OMICS"

Materiali e Metodi



spettrometro
AVANCE III
(Bruker,
Milano, Italia)

In laboratorio

BHB 'gold standard' per la diagnosi di chetosi (Työppönen and Kauppinen 1980).

Analisi 1H-NMR

- Biochimico: valutazione del β -idrossibutirrato mediante analizzatore automatico di chimica clinica (BT1500 Biotechnica Instrument SPA)

3 GRUPPI:

GRUPPO BHB 0: inferiore a 0,50 mmol/L
(media 0.42 mmol/L)

GRUPPO BHB 1: compreso tra 0,50 e 1,0 mmol/L
(media 0.71 mmol/L)

GRUPPO BHB 2: uguale o superiore a 1,0 mmol/L
(media 1.36 mmol/L)

- ✓ Campioni sono stati scongelati a temperatura ambiente e centrifugati per 15 min a 18630 giri a 4°C.
- ✓ A 700 μ L of supernatant estratto sono stati aggiunti a 60 μ L di buffer fosfato per l'analisi degli spettri e NaN₃ (sodio azide) come conservante per assicurare che non venissero generati o consumati metaboliti a causa di batteri presenti.
- ✓ Gli spettri 1H-NMR sono stati registrati a 298 K con uno spettrometro AVANCE III (Bruker, Milano, Italia) che opera a una frequenza di 600.13 MHz, dotato del software Topspin 3.5.
- ✓ Tutti i metaboliti di interesse sono stati assegnati basandosi su spettri monodimensionali già assegnati in letteratura e sui *database* di riferimento, in particolare HMDB (*Human Metabolome DataBase*) e BIOREFCODE (*Bruker BioSpin*).

PROGETTO "BOVINE OMICS"

Statistica



- La matrice di dati ottenuta è stata analizzata mediante metodi chemiometrici, applicati utilizzando R, un *software open source*.
- I dati non normalmente distribuiti sono stati normalizzati tramite Box and Cox (Box & Cox, 2018).
- Le molecole la cui concentrazione variava tra i gruppi nel siero bovino sono state ricercate con ANOVA sfruttando la funzione "lm" del pacchetto R "agricolae" (Mendiburu, 2012).
- Tukey HSD è stato quindi utilizzato come test post-hoc.
- Limite di significatività $P < 0.05$.

PROGETTO "BOVINE OMICS"

Risultati



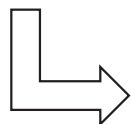
	Gruppo BHB 0	Gruppo BHB 1	Gruppo BHB 2	SEM (ERRORE STANDARD DELLA MEDIA)	P value
BHB mmol/l	0,42	0,71	1,36	0,018	0,0001
DIM giorno	26,9	31,6	20,9	2,987	0,005
BCS	2,75	2,75	2,75	0,049	0,186
N. parti	2,6	2,2	3,4	0,436	0,221
Latte Kg/die	29,2	29,8	29,5	2,157	0,915

PROGETTO "BOVINE OMICS"

57 metaboliti sc



23 metaboliti
significativamente
diversi tra i gruppi



Metaboliti	Median			IQR (o Inter Quartile Range)		
	Gruppo 0	Gruppo 1	Gruppo 2	Gruppo 0	Gruppo 1	Gruppo 2
FORMATE	1,23E-02 ^a	9,44E-03 ^{ab}	8,71E-03 ^b	6,57E-03	3,22E-03	4,35E-03
ALLANTOIN	1,55E-02 ^{ab}	1,74E-02 ^a	1,62E-02 ^b	3,33E-03	4,46E-03	6,56E-03
SERINE	2,10E-02 ^a	1,77E-02 ^b	1,56E-02 ^b	6,96E-03	2,99E-03	5,07E-03
BETAINE	6,67E-03 ^{ab}	7,85E-03 ^a	5,44E-03 ^b	2,86E-03	2,74E-03	2,85E-03
METHANOL	3,05E-03 ^b	3,66E-03 ^{ab}	5,47E-03 ^a	1,72E-03	2,46E-03	1,01E-02
TMAO	8,91E-03 ^b	1,68E-02 ^a	2,21E-02 ^a	6,24E-03	1,27E-02	1,51E-02
GLUCOSE	9,25E-01 ^b	1,00E+00 ^a	8,80E-01 ^b	1,03E-01	1,24E-01	1,67E-01
CHOLINE	1,69E-03 ^{ab}	1,94E-03 ^a	1,13E-03 ^b	1,47E-03	7,45E-04	8,11E-04
DIMETHYL_SULFONE	5,52E-03 ^{ab}	1,08E-02 ^a	5,30E-03 ^b	9,52E-03	8,53E-03	5,05E-03
DIMETHYLGLYCINE	1,80E-04 ^{ab}	1,40E-04 ^b	2,21E-04 ^a	1,23E-04	6,36E-05	1,07E-04
ASPARTATE	2,87E-03 ^a	2,64E-03 ^a	1,91E-03 ^b	7,70E-04	1,19E-03	7,73E-04
DIMETHYLAMINE	4,72E-04 ^b	8,47E-04 ^a	8,02E-04 ^{ab}	3,02E-04	6,54E-04	5,30E-04
SUCCINATE	1,97E-03 ^{ab}	1,68E-03 ^b	2,18E-03 ^a	1,03E-03	7,59E-04	6,80E-04
GLUTAMATE	4,66E-02 ^a	4,58E-02 ^a	4,21E-02 ^b	7,53E-03	4,39E-03	1,18E-02
ACETONE	3,14E-03 ^c	6,52E-03 ^b	1,46E-02 ^a	1,28E-03	2,64E-03	1,97E-02
PROLINE	2,17E-02 ^a	2,12E-02 ^{ab}	1,99E-02 ^b	2,11E-03	2,33E-03	3,67E-03
ARGININE	5,65E-02 ^a	5,16E-02 ^a	4,26E-02 ^{ab}	1,33E-02	2,07E-02	2,43E-02
3-HYDROXYBUTYRATE	4,84E-02 ^c	7,41E-02 ^b	1,09E-01 ^a	1,59E-02	2,90E-02	1,12E-01
ETHANOL	3,06E-03 ^b	3,58E-03 ^b	7,59E-03 ^a	7,68E-04	1,91E-03	7,53E-03
2,3-BUTANEDIOL	9,00E-04 ^b	1,14E-03 ^b	2,20E-03 ^a	7,09E-04	9,40E-04	1,95E-03
METHYLSUCCINATE	7,11E-04 ^b	7,05E-04 ^b	1,04E-03 ^a	2,59E-04	4,10E-04	7,11E-04
3-HYDROXYISOBUTYRATE	3,90E-03 ^b	4,78E-03 ^b	6,76E-03 ^a	1,37E-03	2,74E-03	4,17E-03
ISOVALERATE	7,09E-03 ^a	6,70E-03 ^{ab}	6,19E-03 ^b	1,01E-03	1,52E-03	8,47E-04

ati

Elenco dei metaboliti e delle rispettive intensità relative (mediana e IQR) nei tre gruppi, ed i confronti tra i gruppi (in rosso sono evidenziati quelli statisticamente significativi P < 0.05).

PROGETTO "BOVINE OMICS"

Risultati

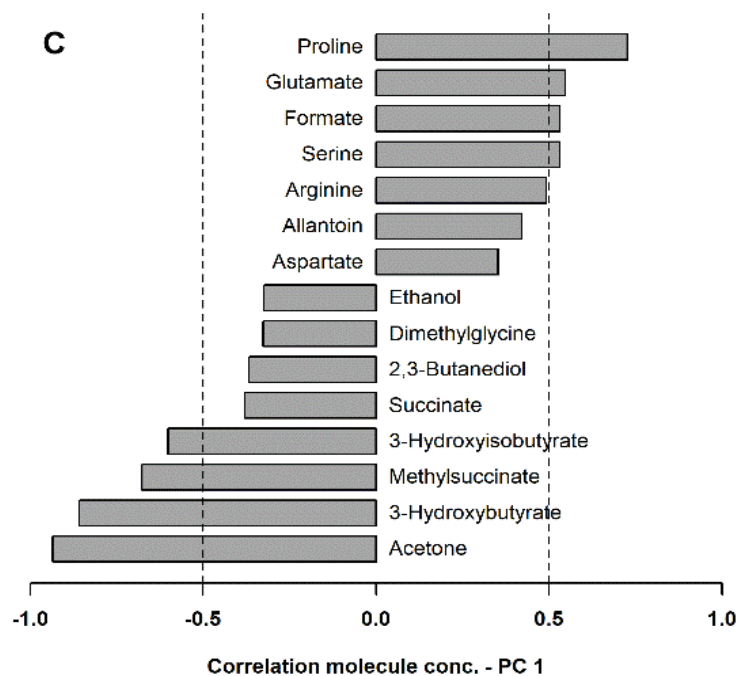
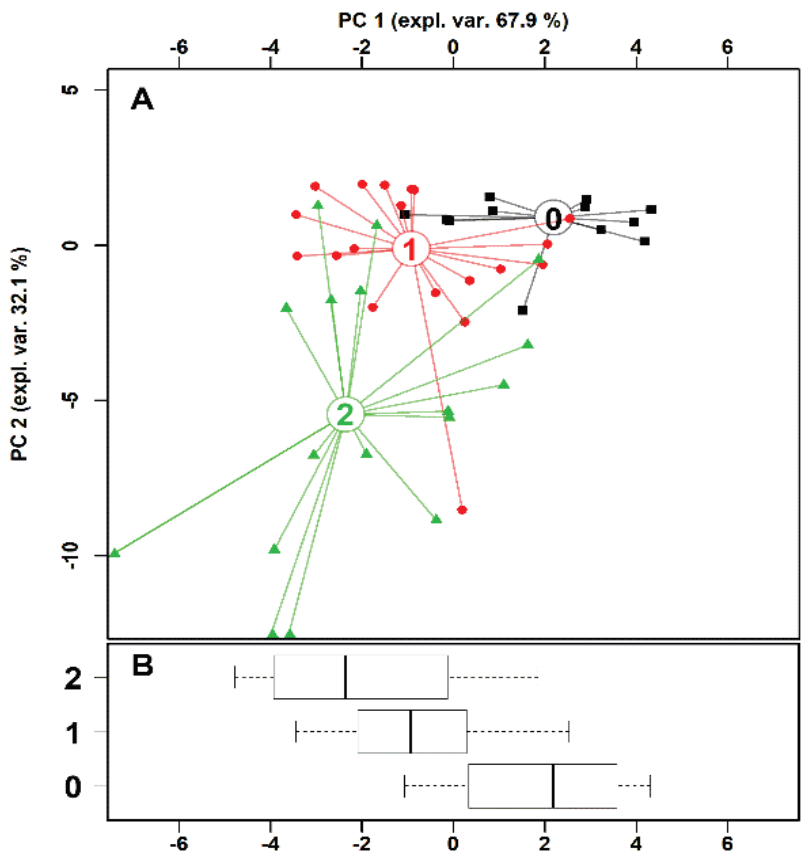


Figura A

3 gruppi:

- ✓ quadrati (Gruppo 0)
- ✓ cerchi (Gruppo 1)
- ✓ triangoli (Gruppo 2)

I cerchi vuoti rappresentano la mediana di ciascun gruppo di campioni.

Figura B

Posizione dei campioni lungo PC1.

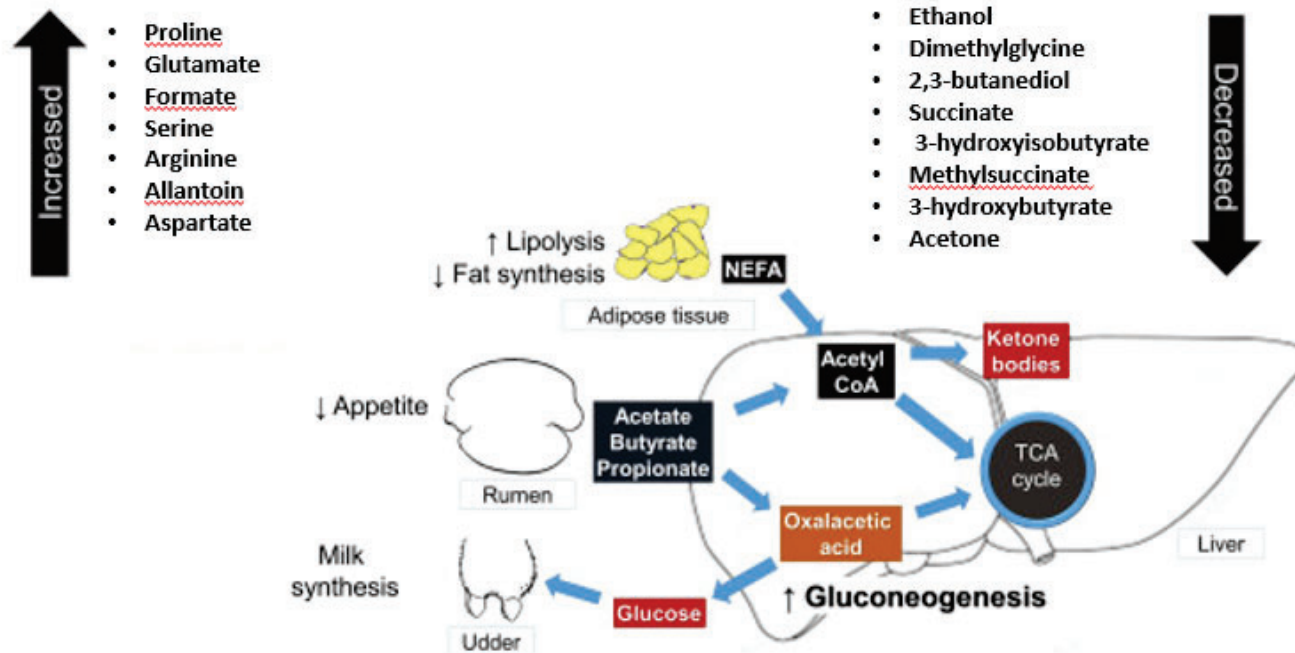
Figura C

Correlazione significativa tra la concentrazione di ciascuna sostanza e la sua importanza sul PC1 ($P < 0.05$).

PROGETTO "BOVINE OMICS"

Risultati

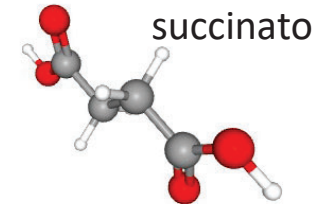
Tendenza dei metaboliti nelle bovine in chetosi



PROGETTO "BOVINE OMICS"

Discussioni e Conclusioni

- Ethanol
- Dimethylglycine
- 2,3-butanediol
- Succinate
- 3-hydroxyisobutyrate
- Methylsuccinate
- 3-hydroxybutyrate
- Acetone



Pathway Name	Match Status	p	-log(p)	Holm p	FDR	Impact	Details
<u>Butanoate metabolism</u>	<u>2/15</u>	0.0024864	5.9969	0.20886	0.20886	0.0	<u>KEGG</u>
<u>Synthesis and degradation of ketone bodies</u>	<u>1/5</u>	0.026211	3.6416	1.0	1.0	0.0	<u>KEGG</u>
<u>Citrate cycle (TCA cycle)</u>	<u>1/20</u>	0.10127	2.2899	1.0	1.0	0.03273	<u>KEGG</u>
<u>Propanoate metabolism</u>	<u>1/23</u>	0.11566	2.1571	1.0	1.0	0.0	<u>KEGG</u>
<u>Glycolysis / Gluconeogenesis</u>	<u>1/26</u>	0.12985	2.0414	1.0	1.0	0.0	<u>KEGG</u>
<u>Alanine, aspartate and glutamate metabolism</u>	<u>1/28</u>	0.1392	1.9719	1.0	1.0	0.0	<u>KEGG</u>
<u>Glycine, serine and threonine metabolism</u>	<u>1/34</u>	0.16671	1.7915	1.0	1.0	0.06742	<u>KEGG</u>
<u>Valine, leucine and isoleucine degradation</u>	<u>1/40</u>	0.19345	1.6427	1.0	1.0	0.02837	<u>KEGG</u>

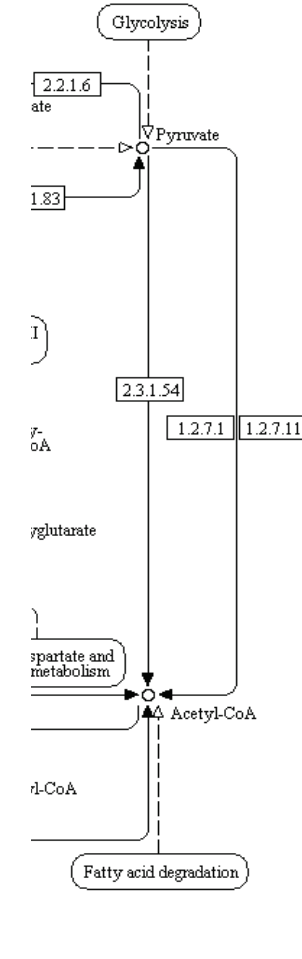
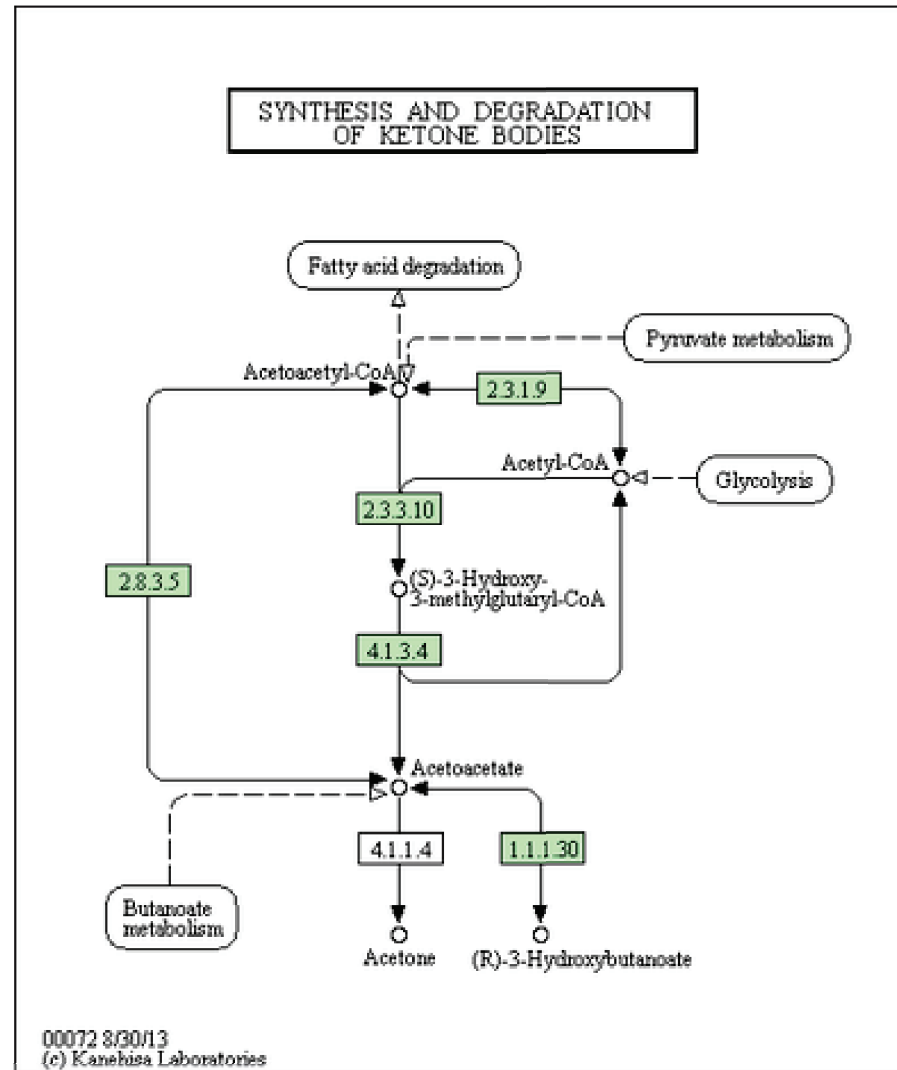
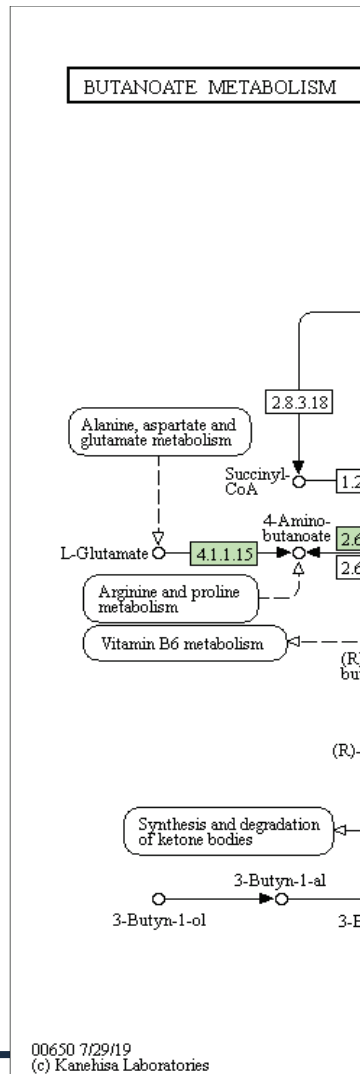
PROGETTO "BOVINE OMICS"

1222-2022
800



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

APS
IN ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE



Convegno ORUS, 21 Novembre 2019 Legnaro

PROGETTO "BOVINE OMICS"

Discussioni e Conclusioni



- La **spettroscopia** di risonanza magnetica nucleare ^1H si è confermata un valido strumento per l'identificazione di metaboliti da molteplici campioni biologici.
- L'analisi della metabolomica sierica ^1H NMR di bovine con chetosi clinica e subclinica può essere interpretata per comprendere meglio i cambiamenti metabolici nella patogenesi della malattia.
- I risultati preliminari hanno mostrato chiaramente che esistono differenze significative negli spettri ^1H NMR nel siero dei 3 gruppi analizzati, distinguendo la chetosi clinica e subclinica da controlli sani.
- I cambiamenti sistemici nei metaboliti endogeni dalla chetosi hanno interessato principalmente il metabolismo energetico, degli aminoacidi, dei lipidi e dei carboidrati. In combinazione con modelli statistici, ^1H NMR ha permesso di identificare i metaboliti caratteristici della chetosi suggerendo che la mancanza di substrati gluconeogenici sono un importante fattore di rischio nella patogenesi della chetosi.
- Basi per biomarkers predittivi di chetosi.

PROGETTO "BOVINE OMICS"

Concludendo.....

L'analisi Metabolomica a ^1H NMR potrebbe diventare un nuovo valido metodo di diagnosi precoce, di ausilio per terapie adeguate e per una migliore gestione clinica della malattia.



1222-2022
800
ANNI



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

MAPS
DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE

GRAZIE PER L'ATTENZIONE



Per Info E Contatti:

**SERVIZIO DI MEDICINA PREVENTIVA E CLINICA
DI ALLEVAMENTO**

049 8272608

ruminanti.ovud@unipd.it

Convegno ORUS, 21 Novembre 2019 Legnaro